



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y ALGUNOS
COMPUESTOS MAYORITARIOS DE INTERÉS MEDICINAL DE PLANTAS
DE *Moringa oleifera* GENERADAS POR DOS DIFERENTES SISTEMAS
DE PROPAGACIÓN: *in vitro* y *ex vitro***

**TESIS QUE PRESENTA:
Jazmin Anai Avila Treviño**

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

COMITÉ TUTORAL:

**Tutor: Dr. José Francisco Morales Domínguez
Asesor: Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Asesor: Dra. Araceli Rodríguez Sahagún**

Aguascalientes, Ags, a 17 de enero del 2017

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante estos 3 años con número de registro 383193.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Centro de Ciencias Básicas por facilitar la realización de mis estudios de posgrado.

A mis tutores y asesores Dr. Francisco Morales Domínguez, Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch, Dra. Araceli Rodríguez Sahagún, Dra. Yenny Gómez Aguirre y el Dr. Gonzalo de Allende Arraras, por haberme brindado su confianza y conocimiento, los cuales fueron fundamentales para fortalecer este proyecto, además de su constante apoyo y consejos en la realización de esta investigación.

A la gran colaboración brindada por el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro Universitario de la Ciénega. Luis Miranda, Víctor Obet Cruz y Fernanda Martínez en el desarrollo experimental de este proyecto, además de su invaluable amistad.

Al Laboratorio de Toxicología y Farmacología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme realizar parte del trabajo experimental de esta investigación, por todas las atenciones prestadas, además de equipos e insumos. De manera especial a Irma Reynoso y Raúl Ponce que sin su amistad y ayuda no hubiera sido posible.

Al Departamento de Fitoquímica del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS), en especial al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, por el apoyo para la realización de algunos objetivos de este proyecto.

Al Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Chihuahua, especialmente al Dr. Samuel Pérez, por todo su apoyo y colaboración en este proyecto. A Yessica Escobedo por su ayuda durante la estancia en esta universidad.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Susana, Nancy, Karina, Josafath, Mario y Carlos, quienes se convirtieron en mis grandes amigos y que hicieron muy gratos estos tres años.

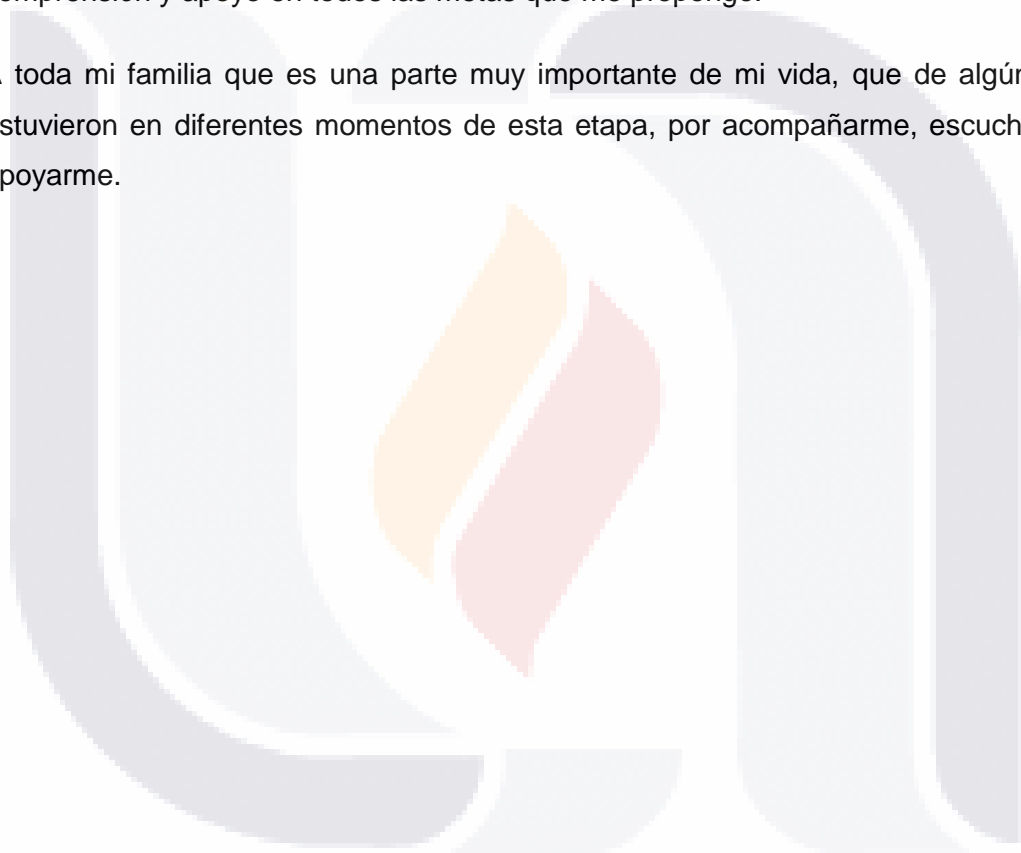


DEDICATORIAS

Principalmente a mis Padres Jorge Avila y Norberta Treviño, quienes con su sacrificio, esfuerzo, y sabiduría me han permitido llegar hasta este punto de mi carrera profesional, y han forjado gran parte de mi camino, apoyándome y alentándome durante todos estos años de estudio.

A mi cómplice, amigo y compañero de vida, David, por acompañarme durante tantos años, primero como amigo y ahora como pareja, por su amor, confianza, paciencia, comprensión y apoyo en todos las metas que me propongo.

A toda mi familia que es una parte muy importante de mi vida, que de algún modo estuvieron en diferentes momentos de esta etapa, por acompañarme, escucharme y apoyarme.






UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO


M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BASICAS
P R E S E N T E


Por medio de la presente, como Comité Tutorial designado de la estudiante **JAZMIN ANAI AVILA TREVIÑO** con ID **184910** quien realizó *la tesis* titulada: **ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y ALGUNOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE INTERÉS MEDICINAL DE PLANTAS DE *Moringa oleifera* GENERADAS POR DOS DIFERENTES SISTEMAS DE PROPAGACIÓN: *in vitro* Y *ex vitro***, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 9 de enero del 2017


Dr. José Francisco Morales Domínguez
Tutor de tesis


Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch
Asesor de tesis


Dra. Araceli Rodríguez Sahagún
Asesor de tesis

c.c.p.- M. en C. Jazmin Anai Avila Treviño
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Dra. Consolación Martínez - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

JAZMIN ANAI AVILA TREVIÑO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA Y ALGUNOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE INTERES MEDICINAL DE PLANTAS DE *Moringa oleífera* GENERADAS POR DOS DIFERENTES SISTEMAS DE PROPAGACION: *in vitro* Y *ex vitro*”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 12 de enero de 2017

“Se lumen proferre”

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

CARTA DE ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO

From: Johannes van Staden

To: FRANCISCO MORALES-DOMÍNGUEZ

Subject: Your manuscript SAJB_2016_161_R1 has been accepted

Ref: SAJB_2016_161_R1

Title: In vitro propagation from buds and apices explants of *Moringa oleifera* and evaluation of the genetic stability with RAMP marker.

Journal: South African Journal of Botany

Dear Dr. MORALES-DOMÍNGUEZ,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to South African Journal of Botany. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Ashwell Ndhlala
Review Board Editor
South African Journal of Botany

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.



Contents lists available at ScienceDirect

South African Journal of Botany

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sajb

In vitro propagation from bud and apex explants of *Moringa oleifera* and evaluation of the genetic stability with RAMP marker



J.A. Avila-Treviño^a, J.M. Muñoz-Alemán^a, E. Pérez-Molphe-Balch^a,
A. Rodríguez-Sahagún^b, J.F. Morales-Domínguez^{a,*}

^a Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, edificio # 60 C.U. Av. Universidad # 940 Fracc. C.U., C.P. 20131 Aguascalientes, Ags., México

^b Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Ciénega, Av. Universidad N° 1115, Col. Lindavista, C.P. 47820 Ocotlán, Jalisco, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 February 2016
Received in revised form 29 June 2016
Accepted 2 October 2016
Available online xxxx

Edited by J Van Staden

Keywords:

Medicinal plant
Somaclonal variation
Regeneration
Explant

ABSTRACT

Moringa oleifera is the best known species of the Moringaceae family attributed with several medicinal uses and a high nutritional value. This plant is native of the western sub-Himalayan and now is distributed worldwide. The conventional way to propagate *Moringa* is by seeds, causing its growth to be slow. An alternative to propagate plants in less time and greater number is through plant tissue culture (PTC), which broadly refers to cultivation of plant cells, tissue and organs on artificial medium under aseptic and controlled environmental conditions. Therefore, in this study, an effective system for mass propagation of *M. oleifera* and the genetic stability with RAMP marker has been implemented. For the propagation, explant of buds and apices of the cotyledon node was used in MS medium and without Plant Growth Regulators (PGR). During indirect regeneration, the best treatment corresponded to the combination of 1 mg L⁻¹ BA and 0.2 mg L⁻¹ AIA, which had a maximum of 14 buds per explant; with the same treatment, but using leaves as explants there was mass production of roots. Acclimatization and ground transference of plants into the soil had 95% survival average. DNA from leaves propagated and regenerated and *ex vitro* plants were used to study genetic variability through Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP); the dendrogram of this assay did not show any significant variation between the plants. The *in vitro* propagation protocols developed here would be useful to obtain mass plants in less time and enhance propagation.

© 2016 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Moringa oleifera Lam. is the best known species of the Moringaceae family. This plant is native of the western sub-Himalayan, India, Pakistan, Asia and Africa, and now is distributed in the Philippines, Cambodia, America, and the Caribbean Islands (Luqman et al., 2012). In Mexico it is mainly introduced throughout the Pacific and Gulf of Mexico (Mohammed et al., 2012), and has been shown to have high adaptation in tropical areas while in extreme climate areas its growth is slow. *M. oleifera* is credited with various medicinal properties; for example, the leaves have a high nutritional value and are an important source of highly digestible protein, calcium, iron, vitamin C, and antioxidants such as flavonoids, phenols, carotenoids and vitamin E (Park et al., 2011; Luqman et al., 2012; Förster et al., 2013) and the seeds are considered as an effective natural coagulant used to purify water, and as a potential source of biodiesel.

Most of the plant has been used as a traditional medicine for the treatment of a variety of disorders such as: respiratory diseases, hypertension, diabetes, anemia and cancer (Park et al., 2011).

The conventional way to propagate *M. oleifera* is by seeds, causing its growth to be slow (Stephenson and Fahey, 2004). Thus, at present with these results it is impossible to cover the growing demands required by this species in order to meet different domestic, nutritional, commercial and medicinal uses (Luqman et al., 2012). A strategy to solve this kind of problems is through Plant Biotechnology, which is based in plant tissue culture (PTC) set of techniques that allows the establishment, maintenance and development of any part of the plant, from an individual cell to a complete plant, under artificial and axenic conditions therefore, the establishment of an *in vitro* tissue culture offers many advantages over the conventional methods of propagation (Yin et al., 2013). In addition tissue culture technique is a powerful tool for the generation of genetically modified plants (Shahzad et al., 2013). There are some *in vitro* propagation studies for *Moringa* from different explants such as: nodal segments (Förster et al., 2013; Saini et al., 2013), indirect organogenesis (Mathur et al., 2014), multiplication using immature seeds (Stephenson and Fahey, 2004) and regeneration of axillary cotyledons and buds (Steinitz et al., 2009).

* Corresponding author.

E-mail addresses: jaat_13@hotmail.com (J.A. Avila-Treviño), muajazmin@hotmail.com (J.M. Muñoz-Alemán), eperezmb@correo.uaa.mx (E. Pérez-Molphe-Balch), aracelicrs@gmail.com (A. Rodríguez-Sahagún), jfmoral@correo.uaa.mx (J.F. Morales-Domínguez).

Among the different paths of *in vitro* cultivation, some of the conditions can be modified to obtain better result. Therefore, changes in these conditions, such as phytohormone composition and concentration or light intensity and temperature, can produce more vigorous plants (Khateeb et al., 2013). In the case of regeneration, different hormone types and concentrations can help in developing callus, when being subjected to dedifferentiation and differentiation processes, which in turn may result in some genetic variation (Roy et al., 2012). Therefore, an important aspect for the regeneration techniques or clonal propagation in order to be successful is that these plants present uniformity compared to the ones that are conventionally propagated (Zhao et al., 2005).

Numerous techniques have been developed to detect variation due to the different effects that may have on the quality of the regenerated plants; the most efficient techniques for this purpose are those which include the use of DNA molecular markers (Roy et al., 2012). These markers provide better opportunities for genetic characterization, biodiversity studies and genetic variability (Sorkheh et al., 2009). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was developed in 1990 (Williams et al., 1990). Since then, RAPD analysis, combined with other molecular techniques such as internal transcribed spacer (ITS), simple sequence repeat (SSR), inter-simple sequence repeat (ISSR), inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP), has been widely used in the various unicellular and multi-cellular organisms across various fields for assessments of genetic diversity and characterization of germplasm, identification and fingerprinting of genotypes, and molecular-assisted breeding in ecological, evolutionary, taxonomical, phylogenetic and genetic studies (Long et al., 2015). Within these markers, the RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) technique is included, which combines the advantages of ISSR and RAPD markers and has shown better results in cultivar genealogies, more faithfully than the RAPDs; besides being particularly suitable for plant species with an ambiguous genetic background (Zhang et al., 2005). This technique has already been used to evaluate the genetic diversity in legumes such as: *Cicer arietinum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., *Tamarindus indica* L. (Valadez-Moctezuma et al., 2005), and *Leymus Hochst* among others, and allows to show the individual variation base (Yang et al., 2006).

In the present study, propagation and *in vitro* regeneration of *M. oleifera* were performed, where the plants generated by these processes were transferred into the soil. Subsequently, leaf samples were taken for DNA extraction and to analyze the genetic variability through a RAMP molecular marker.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and explant preparation

M. oleifera seeds from trees grown in the Santiago Valley, Guanajuato, Mexico (1) and Tuxtepec, Oaxaca, México (2) were used. Seed coats were removed aseptically and seeds were disinfected in a solution of Hi-clean plus Tween 20 (Thermo Scientific, USA) for 2 min, followed by three washes with sterile distilled water. Subsequently, they were washed with a 70% ethanol solution for 3 min, and one with a 10% solution of commercial bleach for 15 min. Finally, the seeds were eventually washed three times with sterile distilled water. Seeds were planted aseptically in MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 3% sucrose and 0.7% agar (w/v) 5.7 pH, and incubated at 25 ± 1 °C in the dark until germination; subsequently they were placed at 16/8 h light/darkness period for seedling development.

2.2. Clonal propagation

Two different experiments were conducted in order to evaluate the potential of sprout induction and mass multiplication. In the first experiment, the apical shoots that emerged from seed germination were cut

and placed in a 100% MS medium without growth regulators to induce new growth development. From new buds, the axillary nodes were cut and placed in a 100% MS at 25 ± 1 °C, and a photoperiod of 16/8 h light/darkness; this process was performed during four propagation cycles. In the second experiment, the seed was germinated and the seedling tip was cut, which led to the creation of new buds in the cotyledonary node. Subsequently, we waited for each bud to develop at least four axillary nodes, and these were propagated as mentioned above; this process was performed for 12 months.

2.3. Indirect regeneration

Stem and leaf segments generated from the propagation methods were used as explants. Ten different treatments using a 100% MS as basal medium, supplemented with different combinations and concentrations of benzylaminopurine (BA), indoleacetic acid (IAA) and indolebutyric acid (AIB) were prepared (Table 1). For each treatment, the stem segments were placed in vertical and horizontal positions and the leaves in an adaxial form until the appearance of callus and buds. The buds were transferred to a 100% MS without growth regulators for rooting. The plantlets obtained from both clonal propagation and regeneration, rooted in the MS basal medium without growth regulators, so it was not necessary to test treatments for this purpose.

2.4. Acclimatization

Rooted plantlets were separated from the medium and washed with distilled water to remove the debris present on the root. Hardening of the rooted plantlet was done in plastic bags containing autoclaved mixture of peat, fertilizer and lime (Peat moos, PROMIX®). Plants were watered, and then covered with transparent polythene bags. The bags were perforated during the first seven days, and thereafter were removed. This procedure was done inside the growing chamber under the same previously described conditions. Finally, the plantlets were placed under natural conditions until their acclimatization.

2.5. Ex vitro germination

Seeds from the two locations were placed and underwent a pretreatment in distilled water for 24 h; then they were seeded in germination trays with a mixture of peat, fertilizer and lime (Peat moos, PROMIX®).

2.6. Statistical analysis

For multiple propagation, the seed germination percentage and the average of buds per seed were recorded. A completely randomized design was used for indirect regeneration with five repetitions of 20 explants each, shoot average per explant, nodal per explant and explant length and the difference between treatments was evaluated with a Duncan multiple range test, using the statistical package GraphPad Prism 6.0.

Table 1
Treatments for inducing indirect organogenesis.

Treatments	BAP mg L ⁻¹	IBA mg L ⁻¹	IAA mg L ⁻¹
T1	1	0.2	–
T2	1	3	–
T3	1	4	–
T4	3	0.2	–
T5	3	3	–
T6	3	4	–
T7	1	–	0.2
T8	1	–	3
T9	3	–	0.2
T10	3	–	3

2.7. DNA extraction

Leaves of 16 propagated seedling samples (from four cycles of propagation), 8 regeneration samples, 2 from *ex vitro* germination and 2 *Lippia graveolens* controls (Table 2), were frozen with liquid nitrogen and pulverized for DNA extraction following the protocol of Murray and Thompson (1980) with some modifications. For genomic DNA quantification, the absorbance of DNA samples was measured at 260 nm on a Nano Drop 1000 (Thermo Scientific). DNA quality was analyzed in 1% agarose gel (w/v) and visualized under ultraviolet light, where an image was taken with a photodocumentor (Gel Logic 212 PRO).

2.8. RAMP analysis

12 ISSR oligonucleotides (Macrogen®) were evaluated from which 4 of them that had the highest number of amplifications were selected; also 15 RAPD oligonucleotides were chosen, from which 3 were selected randomly and 12 were from the B Operon® Series (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, USA). These oligonucleotides were evaluated separately with a randomly taken DNA sample. Subsequently, the ones that showed the greatest number of bands were selected, and the combinations for the RAMP analysis were performed. For the combinations, all RAPDs and 4 ISSR were used with 5 samples of random DNA (Table 3); from these, the ones that had the higher presence of bands were selected.

The amplifications were performed in the Techne TC-412 thermocycler (Barloworld Scientific). PCR reactions were performed in a final volume of 25 µL containing 5 ng of genomic DNA, 2.5 µL of 10× reaction buffer, 1.0 µL of RAPD oligonucleotide type (10 µM), 1 µL of ISSR oligonucleotide (10 µL), 1.25 µL of MgCl₂ (50 mM), 1 µL of dNTP mix (10 mM) and 1 U of Taq polymerase (Invitrogen) and ultrapure distilled water to a final volume of 25 µL. The amplification conditions

Table 2
Plant material used in this study.

Number	Sample	Locality
1	MV1	Valle de Santiago, Gto.
2	PV1-1	
3	PV1-2	
4	PV1-3	
5	MV-2	Parent plant 2
6	PV2-1	
7	PV2-2	
8	PV2:3	Propagation
9	MT3	
10	PT3-1	
11	PT3-2	Tuxtepec, Oaxaca.
12	PT3-3	
13	MT4	
14	PT4-1	Parent plant 4
15	PT4-2	
16	PT4-3	
17	MV2	Parent plant 2
18	MV2-R1	
19	MT3	Parent plant 3
20	MT3-R1	
21	MT3-R2	Regeneration
22	MT4	
23	MT4-R1	Parent plant 4
24	MT4-R2	
25	G1	Germination conventional 1
26	G2	
27	A1	Control 1 <i>Lippia graveolens</i>
28	A2	Control 2 <i>Lippia graveolens</i>

MV: Parent plant.

PV1: Propagation Valle de Santiago (siembra 1).

PV2: Propagation Valle de Santiago (siembra 2).

PT1: Propagation Tuxtepec, Oaxaca (siembra 1).

R: Regeneration.

G: Germination.

Table 3

Selected oligonucleotides for the molecular marker RAMP.

Name	Oligonucleotides RAPD	Name	Oligonucleotides ISSR
A12	5'-TCGGCGATAG-3'	MO18	5'-(GA) ₆ A(AG) ₁₆ -3'
A16	5'-AGCCAGCGAA-3'	MO41	5'-(GA) ₁₀ -3'
A18	5'-AGGTGACCGT-3'	MO46	5'-(AG) ₅ (GA) ₆ -3'
OPB 1	5'-GTTTCGCTCC-3'	MO58	5'-(CT) ₆ T(TC) ₇ TT-3'
OPB 2	5'-TGATCCCTGG-3'		
OPB 3	5'-CATCCCCCTG-3'		
OPB 4	5'-GGACTGGAGT-3'		
OPB 5	5'-TGCCCCCTTC-3'		
OPB 6	5'-TGCTCTGCC-3'		
OPB 7	5'-GGTGACGAG-3'		
OPB 8	5'-GTCCACACGG-3'		
OPB 9	5'-TGGGGGACTC-3'		
OPB 10	5'-CTGCTGGGAC-3'		
OPB 11	5'-GTAGACCCGT-3'		
OPB 12	5'-CCTTGACGCA-3'		

were: a pre-denaturation at 94 °C for 1 min, followed by 45 cycles at 94 °C for 1 min, 40 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and finally an extension at 72 °C for 10 min. Samples were separated by electrophoresis in a 2% agarose gel with a TBE buffer for 3 h. Gels were stained with ethidium bromide and visualized under an UV light. Subsequently, they were photographed using a photodocumentor (Gel Logic 212 PRO).

2.9. Data analysis

All gels were evaluated regarding the number of mono and polymorphic bands. Diffuse or dubious bands were not considered for analysis. It was assumed that bands of the same molecular weight were identical in different individuals. The presence of a band was indicated with one (1) and the absence with a zero (0); with these data a binary matrix was generated and evaluated using the statistical package POPGENE 3.2. The relationship dendrogram between samples was constructed using Jaccard similarity coefficients and the UPGMA clustering method (Unweighted Pair Group Method with an Arithmetic Mean). In order to estimate the polymorphism parameters at population level with the presence/absence data matrix, the POPGENE32 program was used. Genetic parameters evaluated at population level were the percentage of polymorphic loci (P), Shannon index (I), the genetic diversity coefficient between populations (G_{ST}), and the rate of genetic identity (Nei).

3. Results

3.1. *In vitro* germination and clonal propagation

Germination percentage of *in vitro* seeds was 84% and 76% for localities 1 and 2, respectively. Germination began 10 days after the seeds were planted in the MS medium (Fig. 1A). The presence of microorganism was minimal, so this fact did not represent a problem for germination.

The first experiment started with cutting of the apical nodes after 8 days of germination; these were used to generate 4 cycles of propagation for each locality. The best response was observed in the seeds from locality 2, which obtained the highest bud average, reaching 6.5 ± 6 and a maximum of 29 buds per seed, compared to the first locality that presented a 3.6 ± 1 average and a maximum of seven buds per seed (Fig. 1B).

In the second experiment the bud propagation from the cotyledon node was performed, where the best response was observed for locality 2, which reached the highest bud average, presenting 13.6 ± 12 buds per seed; whereas, locality 1 had an average of 6.5 ± 6 buds per seed (Fig. 1C). For this stage, the development of multiple budding was achieved with a maximum of 52 shoots obtained from a single seed in a month. This response was seen during the constant cuts made on the seedlings, from which the apparition of new shoots was



Fig. 1. *Moringa oleifera* stages *in vitro* culture. (A) Seed germination of *Moringa oleifera* to 7 days after sowing; (B) Multiple shoots from explants of apical nodes; (C) Multiple shoots from outbreaks of cotyledon node; (D) Development of callus tissue and shoots; (E) Callus tissue generation from stem explants (vertical position); (F) Development of root from leaf explants.

encouraged; this behavior was extended until 12 months after germination. The buds obtained from previous experiments showed a 100% rooting in 100% MS medium (Fig. 2A).

3.2. Indirect regeneration

The first responses were observed after seven days. The stem explants with an upright position began developing callus at the base of the explant, from which new buds were developed; unlike the stem explants which had a horizontal position, where the callus was generated along the explant (Fig. 1D and E). In the case of the leaves only root development was obtained (Fig. 1F). 30 days post-treatment of subjected to the treatments, measurements were made and a series of significant responses were obtained for the three measured variables: number of shoots ($p < 0.001$), node number per explant ($p < 0.000$), and shoots length ($p = 0.000$). Treatment 7 (BAP 1 mg L^{-1} and AIA 0.2 mg L^{-1}), showed the best significant response in terms of the three variables, reaching a 1.9 average and a maximum of 14 buds per explant, and a 1.9 of internodal segments with a maximum length of 3.5 cm

(Table 4); unlike other treatments which showed a reduction in these results. The sprouts obtained from regeneration showed a 50% rooting.

3.3. Acclimatization

Rooted plantlets were transferred into pots that were placed inside the growth chamber for two weeks; then, they were taken into the greenhouse where a 90% survival rate was obtained (Fig. 2C).

3.4. Ex vitro germination

Seed germination percentage was 56% and 52% for localities 1 and 2, respectively. Seeds germinated fifteen days after planting. They were removed from the seedling and placed in pots which had the same substrate as in the acclimation stage. They remained in the greenhouse until sampling. After 60 days of germination, the seedlings had an average length of 14 cm (Fig. 2B).



Fig. 2. Rooting and acclimatization of *Moringa oleifera*. (A) Rooting plantlets in MS 100% without PGR; (B) *Ex vitro* plants germinated; (C) Plants grown in green house.

3.5. RAMP analysis

From the 15 RAPD oligonucleotides and the 12 ISSR that were evaluated (separately with a single random DNA sample), 12 RAPD and 4 ISSR types were selected, from which a second selection was performed based on the highest number of bands obtained (using 5 randomly DNA samples by combination). Finally, 1 ISSR oligonucleotides and 6 RAPDs (Table 5) were selected, which obtained the highest banding pattern. From the seven oligonucleotides, a total of six combinations were generated and used to characterize the genetic variability of the mother plant, and the propagation and regeneration cycles.

These six combinations were tested with the 28 total samples (Table 2) and generated a total of 58 bands, which had an average of 9.5 bands with a range from 2 to 18 by oligonucleotide combination. Of the 58 bands, a total of 42 polymorphic bands were obtained (72.5%), which occurred between 1 and 18 polymorphic bands by oligonucleotide combination, with an average of seven polymorphic bands (Table 6), a 0.37 of genetic diversity and 0.0677 the genetic diversity coefficient between populations. All bands of the 28 samples were used to calculate the Jaccard similarity coefficient. The similarity value of the 28 individuals ranged between 0.000 and 0.168 with an average of 0.049. The Shannon value rates varied from 0.27 to 0.69 with a mean of 0.54.

Table 4
Moringa oleifera seeds germination *in vitro* (100% MS medium) (sites 1 and 2).

Locality	Germination (%)	Shoots (explant)	Shoots (cotyledonary node)
1	84	3.6 ± 1	6.2 ± 2
2	76	6.5 ± 6	13.6 ± 12

Seed germination percentage of different crops.
Values are expressed as the mean ± standard error of the mean (SE).
Location 1: Valle de Santiago, Guanajuato. Location 2: Tuxtepec, Oaxaca.

In general, there was little genetic difference between the different samples of the four propagation and regeneration cycles regarding the mother plants, whereas there was a genetic difference between these plants and the ones that were germinated conventionally.

The genetic relationships among the 26 *M. oleifera* samples were analyzed using the UPGMA method, just as shown in the dendrogram of Fig. 3, where the different samples of the four propagation and regeneration cycles and the mother plants were mainly related in two clusters; excluding the samples of conventional germination, a propagation from one cycle of locality 1 (Santiago Valley, Guanajuato) and a regeneration that belonged to locality 2 (Tuxtepec, Oaxaca), leaving the controls (*L. graveolens*) as an anchor for the dendrogram.

Table 5
Indirect regeneration from stem and leaf explants of *Moringa oleifera*.

Treatments	Stem				Leaves		
	Callus	Shoots	Node	Length	Callus	Shoots	Root
1	100%	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.1	100%	-	20%
2	100%	0.2 ± 0.1	0	0	100%	-	-
3	100%	0.2 ± 0.0	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.0	100%	1%	40%
4	100%	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.4	0.3 ± 0.1	100%	-	-
5	100%	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	100%	-	50%
6	100%	1.5 ± 0.5	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.0.9	100%	-	80%
7	100%	1.9 ± 0.8	1.9 ± 0.6	0.7 ± 0.02	100%	-	93%
8	100%	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.3 ± 0.1	100%	-	-
9	100%	0.05 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.03 ± 0.02	100%	-	30%
10	100%	0	0	0	100%	-	20%

Values represent the mean ± SE.
Multiple range test of Duncan.
Percentage of callus and root development of stem and leaf explants.
Stem explants positioned vertically only obtained callus development, thus not included in the result table.

Table 6
Oligonucleotide combination list and amplification results.

Combinations	Total bands	Polymorphic bands
A12 + M046	8	3
OPB-2 + M046	10	5
OPB-4 + M046	2	1
OPB-7 + M046	19	18
OPB-8 + M046	12	8
OPB-10 + M046	7	7

4. Discussion

The *in vitro* percentage germination of *M. oleifera* was 84% and 76% for localities 1 and 2, respectively. These results differed from the ones of Förster et al. (2013), who mentioned that, due to the higher degree of contamination, it was not possible to establish an *in vitro* culture of *M. oleifera* seeds using sodium hypochlorite for disinfection. Furthermore, the *in vitro* germination response compared to conventional germination on our study species has not been previously evaluated. However, there are some investigations on related species, where best results are seen when the *in vitro* technique is used, as reported by Bhattacharya and Khuspe (2001), which in their study with *Carica papaya* L. noted the difference between the *in vivo* and *in vitro* seed germination. The *in vitro* conditions increased the rate and speed of seed

germination in all cultivars, achieving a maximum average germination of 95.5% after 7–8 days on a MS medium supplemented with TDZ (1.0 M L^{-1}). In our *in vitro* study, just as Bhattacharya and Khuspe (2001), we used MS as basal medium but with the difference that our medium was not supplemented with growth regulators.

The propagation strategy provides an opportunity to produce clonal populations of this important species. In this study, we established a simple protocol for the *in vitro* propagation of *M. oleifera* using two explant sources: apical buds and sprouts from the cotyledon node. The initiation of axenic cultivars from apex explants ran smoothly; a sprouting average of 6.5 ± 6 and a maximum of 29 buds per explant were achieved. Similarly, the propagation from cotyledonary node buds obtained the highest sprouting average of 13.6 ± 12 with a maximum of 54 buds per seed. The results observed in the number of sprouts by propagation are higher than those reported by Förster et al. (2013), where they were able to develop an average of 4.1 sprouts of different *M. oleifera* ecotypes, but in a MS medium supplemented with different BAP concentrations. Meanwhile, Stephenson and Fahey (2004) in their study of tissue culture methods for the rescue and propagation of *Moringa* endangered species obtained a multiplication average rate of only 4.7 buds by culture in a solid or liquid MS medium supplemented with 1 mg L^{-1} of BAP. In contrast to these results, in this research an average of 13.6 sprouts with a maximum of 54 buds per seed was presented (Fig. 1C). This response was observed during the constant cutting of

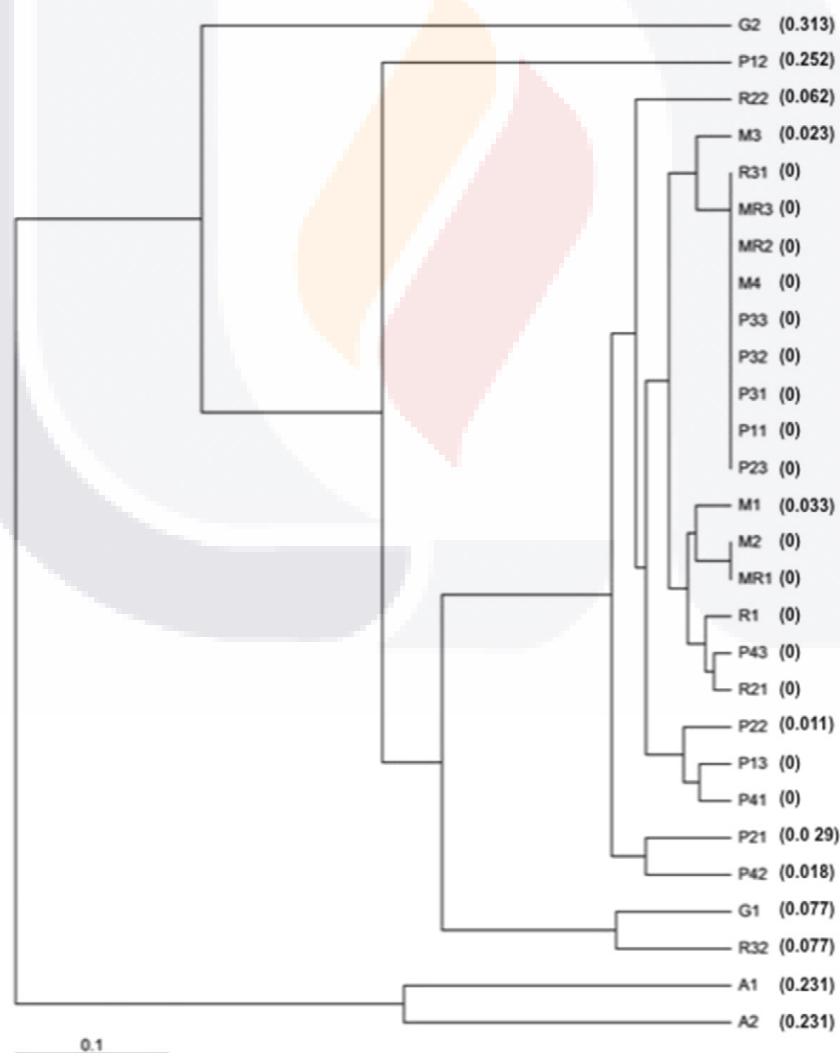


Fig. 3. Dendrogram obtained from statistical analysis to individuals of *Moringa oleifera*. Controls (*Lippia graveolens*) completely separate from clades where observed in grouped samples of the parent plants with four cycles of propagation and regeneration, as well as germinated *ex vitro*.

the seedlings, from which the formation of new sprouts occurred. However, this behavior has a limited action time, which in this case was about 12 months. This behavior was already mentioned by Förster et al. (2013) with the difference that in their study, they mentioned a propagation delay of only 3 weeks.

Plant regeneration was accomplished with a BAP (mg L^{-1}) and AIA (0.2 mg L^{-1}) combination, with a 1.9 mean and a maximum of 14 buds per explant and 1.9 internodal segments with a maximum length of 3.5 cm. These results generally showed a decrease compared to those reported by Gayathri et al. (2015), who evaluated the *in vitro* regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *M. oleifera* Lam. using an extracellular phytohormone treatment of MBDU 515 *Aphanothece* sp., and another one using a MS supplemented with BAP (1 and 2 mg L^{-1}). For the first treatment, they obtained a 90% of sprout induction and for the second a 75%, which represents a higher percentage than the one presented in our results (Treatment 7 with a 45%). The sprouting decline from stem explants (vertical position) could be associated with the different combinations of growth regulators (BAP, IBA and IAA). This response was also reported by Ibrahim et al. (2008), who evaluated the effect of growth regulators on the *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. In the case of the 1 mg L^{-1} of BA implementation, the highest sprout number was recorded, but they were very thin and vitrified, which was not suitable for multiplication. This same response was observed in our treatments, where long and very thin buds that eventually suffered vitrification, developed. Ibrahim et al. (2008) obtained the best results in a nutrient medium MS without growth regulators; or in the IBA case at low concentrations (0.01 mg L^{-1}), or even without auxins. In this experiment, the best regeneration treatment with stem explants was 1 mg L^{-1} BAP with 0.2 mg L^{-1} IAA; however this treatment showed a low production of buds, which would be undesirable to use in the genetic transformation of this plant. In leaf explants subjected to the same treatment, mass production of adventitious roots was observed (Fig. 1E). This is important, since the *in vitro* production of roots in woody species is often difficult, and adventitious roots generated and cultured *in vitro* can be interesting for the study and production of secondary metabolites like of plant-based pharmaceutical compounds (Ahmad et al., 2015).

The most significant drawback that can occur during the *in vitro* propagation is the presence of somaclonal variation among micropropagated plants. Therefore a RAMP molecular analysis was performed to evaluate the genetic stability of the *M. oleifera* *in vitro* multiplication. The results suggest that shoot proliferation could be used for clonal propagation with a minimal risk to produce somaclonal variants. Different analyses of the molecular markers for *M. oleifera* have been used; however, they corresponded to studies mostly directed for wild populations (Saini et al., 2013; Shahzad et al., 2013; Smit et al., 2013; Ganesan et al., 2014). In the case of *M. oleifera* micropropagation, there are no studies evaluating the genetic stability of this species, but only for related species. In the study made by Khateeb et al. (2013) with *Moringa peregrina*, the genetic variability of micropropagated plants was assessed using ISSR, where they found that the amplification products were monomorphic in all crop plants. Likewise, Kaity et al. (2013) in its cryopreservation and regeneration protocol based on a developed *in vitro* vitrification, generated material for performing the randomly DNA amplification analysis (RAF) and polymorphism of the amplified DNA methylation (AMP); they detected only a small number of RAF and AMP variations in some individuals. However, in this study unlike previous investigations, we used a RAMP molecular marker, which has not yet been reported in the analysis of our studied species.

5. Conclusions

A propagation protocol for *M. oleifera* was established using buds and the cotyledon node in MS medium without plant growth regulation

and regeneration system with stem and leaf explants in MS with 1 mg L^{-1} BAP and 0.2 mg L^{-1} AIA. The genetic variability dendrogram did not show any variation between the plants propagated *ex vitro* and *in vitro*.

Acknowledgements

The authors want to thank CONACYT for the Ph.D. scholarship grant number 383193. This project was supported by the Autonomous University of Aguascalientes with grant number PIBT14-1.

References

- Ahmad, N., Fatima, N., Ahmad, I., Anis, M., 2015. Effect of PGRs in adventitious root culture *in vitro*: present scenario and future prospects. *Rendiconti Lincei* 26, 307–321.
- Bhattacharya, J., Khuspe, S.S., 2001. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. *Scientia Horticulturae* 91, 39–49.
- Förster, N., Mewis, I., Ulrichs, C., 2013. *Moringa oleifera*, establishment and multiplication of different ecotypes *in vitro*. *Gesunde Pflanzen* 65, 21–31.
- Ganesan, S.K., Singh, R., Choudhury, D.R., Bharadwaj, J., Gupta, V., Singode, A., 2014. Genetic diversity and population structure study of drumstick (*Moringa oleifera* Lam.) using morphological and SSR markers. *Industrial Crops and Products* 60, 316–325.
- Gayathri, M., Kumar, P.S., Lakshmi, A.M., Muralitharan, G., 2015. *In vitro* regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothece* sp. MBDU 515. *Algal Research* 7, 100–105.
- Ibrahim, I.A., Nasr, M.I., Mohammed, B.I., El-Zefzafi, M.M., 2008. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech* 10, 254–259.
- Kaity, A., Drew, R.A., Ashmore, S.E., 2013. Genetic and epigenetic integrity assessment of acclimatized papaya plants regenerated directly from shoot-tips following short and long-term cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 112, 75–86.
- Khateeb, W.A., Bahar, E., Lahham, J., Schroeder, D., Hussein, E., 2013. Regeneration and assessment of genetic fidelity of the endangered tree *Moringa peregrina* (Forsk.) Fiori using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 19, 157–164.
- Long, Y., Cheng, J., Mei, Z., Zhao, L., Wei, C., Fu, S., Khan, A., Fu, J., 2015. Genetic analysis of litchi (*Litchi chinensis* Som.) in southern China by improved random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR). *Molecular Biology Reports* 42, 159–166.
- Luqman, S., Srivastava, A., Kumar, R., Kumar, A., Chanda, D., 2012. Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antioxidant, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2012, 1–12.
- Mathur, M., Yadav, S., Katariya, P., Kamal, R., 2014. *In vitro* propagation and biosynthesis of steroidal saponin from various morphogenetic stages of *Moringa oleifera* Lam., and their antioxidant potential. *Acta Physiologicae Plantarum* 36, 1749–1762.
- Mohammed, K.A.E.F., Sarmiento, L., Santos, R., Solorio, J.F., 2012. The nutritional effect of *Moringa oleifera* fresh leaves as feed supplement on Rhode Island Red hen egg production and quality. *Tropical Animal Health and Production* 44, 1035–1040.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497.
- Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 4321–4325.
- Park, E.J., Cheenpracha, S., Chang, L.C., Kondratyuk, T.P., Pezzuto, J.M., 2011. Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by 4-[(2'-O-acetyl- α -l-rhamnosyloxy) benzyl]isothiocyanate from *Moringa oleifera*. *Nutrition and Cancer* 63, 971–982.
- Roy, A.R., Sajeev, S., Pattanayak, A., Deka, B.C., 2012. TDZ induced micropropagation in *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. and assessment of genetic variation in the regenerated plants. *Plant Growth Regulation* 68, 435–445.
- Saini, R., Saad, K., Ravishankar, G., Giridhar, P., Shetty, N., 2013. Genetic diversity of commercially grown *Moringa oleifera* Lam. cultivars from India by RAPD, ISSR and cytochrome P450-based markers. *Plant Systematics and Evolution* 299, 1205–1213.
- Shahzad, U., Khan, M., Jaskani, M., Khan, I., Korban, S., 2013. Genetic diversity and population structure of *Moringa oleifera*. *Conservation Genetics* 14, 1161–1172.
- Smit, R., Du-Toit, E.S., Vorster, B.J., 2013. RAPD and SSR genetic diversity analysis of *Moringa oleifera*. *South African Journal of Botany* 86, 182.
- Sorkheh, K., Shiran, B., Kiani, S., Amirbakhhtiar, N., Mousavi, S., Rouhi, V., Mohammady, S., Gradziel, T.M., Malysheva, L.V., Martínez, P., 2009. Discriminating ability of molecular markers and morphological characterization in the establishment of genetic relationships in cultivated genotypes of almond and related wild species. *Journal of Forestry Research* 20, 183–194.
- Steinitz, B., Tabib, Y., Gaba, V., Gefen, T., Vaknin, Y., 2009. Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened *Moringa* species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant* 45, 65–71.
- Stephenson, K.K., Fahey, J.X., 2004. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germplasm. *Economic Botany* 58, 116–124.
- Valadez-Moctezuma, E., Kahl, G., Rubluo-Islas, A., Arreguin-de los Monteros, R., 2005. Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDS y MP-PCR mediante la técnica RAMPNR. *Revista. Chapingo Serie Horticultura* 11, 351–356.

- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531–6535.
- Yang, R.W., Yong, Z., Zhang, Y., Zheng, Y.L., Ding, C.B., 2006. The genetic diversity among *Leymus* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). *Genetic Resources and Crop Evolution* 53, 139–144.
- Yin, Z.F., Zhao, B., Chen, L., Wang, Q.C., 2013. Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerates by ISSR and AFLP markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology: Plant* 49, 333–342.
- Zhang, L.I., Zheng, Y.L., Wei, Y.M., Liu, S.G., Zhou, Y.H., 2005. The genetic diversity and similarities among *Kengyilia* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). *Genetic Resources and Crop Evolution* 52, 1011–1017.
- Zhao, Y., Grout, B.W., Crisp, P., 2005. Variations in morphology and disease susceptibility of micropropagated rhubarb (*Rheum rhabonticum*) PC49, compares to conventional plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82, 357–361.



ÍNDICE GENERAL

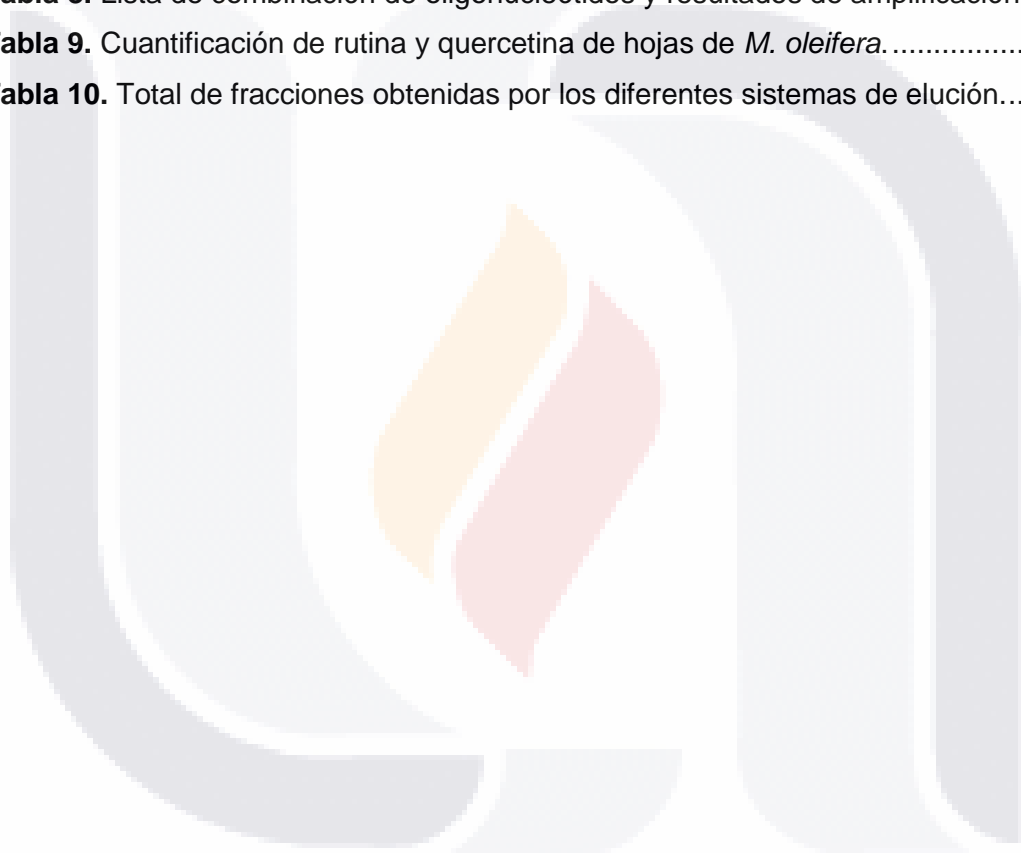
I. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. Taxonomía	9
1.2. Morfología	9
1.3. Distribución.....	11
1.4. Usos <i>domésticos</i>	12
1.5. Propiedades nutricionales	13
1.6. Propiedades medicinales.....	14
1.7. Propiedades fitoquímicas	15
1.8. Propiedades farmacológicas.....	17
1.9. Métodos de propagación	19
1.9.1. Siembra, establecimiento y manejo de la plantación	19
1.10. Variabilidad genética	22
1.11. Marcadores moleculares	23
II. JUSTIFICACIÓN.....	28
III. HIPÓTESIS.....	29
IV. OBJETIVOS.....	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1. Análisis de variabilidad genética entre plantas de <i>M. oleifera</i> cultivadas <i>in vitro</i> y en sustrato.	30
5.1.1. Material vegetal y preparación del explante.....	30
5.1.2. Propagación clonal.....	30
5.1.3. Regeneración indirecta.....	30
5.1.4. Aclimatación.....	31
5.1.5. Germinación <i>ex vitro</i>	31
5.1.6. Análisis estadístico.....	31
5.1.7. Extracción de ADN.....	32
5.1.8. Análisis RAMP.....	33
5.1.9. Análisis de datos.....	34
5.2. Actividad hipolipídica de extractos de hojas de <i>M. oleifera</i>	35
5.2.1. Material vegetal y proceso de extracción.....	35
5.2.2. Condiciones generales del estudio biológico.....	35
5.2.3. Etapa de adaptación.....	35

5.2.4. Inducción de hiperlipidemia.....	35
5.2.5. Dieta a base de <i>M. oleifera</i>	36
5.2.6. Valoraciones químicas sérica.....	36
5.2.7. Obtención de la muestra de sangre.....	36
5.2.8. Análisis estadístico.....	36
5.2.9. Detección de fitoquímicos de <i>M. oleifera</i> relacionados con la disminución de Colesterol y Triglicéridos.....	36
5.2.10. Separación por cromatografía en capa fina (CCF).....	37
5.2.11. Análisis extractos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)....	37
5.2.12. Fraccionamiento de extractos de <i>M. oleifera</i>	38
5.2.13. Obtención del material vegetal.....	38
5.2.14. Proceso de extracción.....	38
5.2.15. Separación por cromatografía en capa fina.....	39
5.2.16. Fraccionamiento por cromatografía en columna.....	39
VI. RESULTADOS.....	40
6.1. Análisis de variabilidad genética entre plantas de <i>M. oleifera</i> cultivadas <i>in vitro</i> y en sustrato.....	40
6.1.1. Germinación <i>in vitro</i> y propagación clonal.....	40
6.1.2. Regeneración indirecta.....	41
6.1.3. Aclimatación.....	43
6.1.4. Germinación en sustrato.....	43
6.1.5. Análisis RAMP.....	44
6.2. Actividad hipocolesterolemica de extractos de hojas de <i>M. oleifera</i> en ratas inducidas con colesterol.....	47
6.2.1. Inducción de hiperlipidemia.....	47
6.2.2. Dieta a base de extractos de <i>Moringa oleifera</i>	48
6.2.3. Separación por CCF.....	48
6.2.4. Evaluación de extracto acuoso por HPLC.....	50
6.2.5. Proceso de extracción y rendimiento de extractos.....	51
6.2.6. Perfil cromatográfico.....	51
6.2.7. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna.....	51
VII. DISCUSIÓN.....	54
VIII. CONCLUSIONES.....	60
IX. GLOSARIO.....	61
X. LITERATURA.....	64

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fitoconstituyentes presentes en <i>M. oleifera</i>	16
Tabla 2. Tratamientos para inducir organogénesis.....	31
Tabla 3. Material vegetal utilizado en este estudio.....	32
Tabla 4. Oligonucleótidos seleccionados para el marcador molecular RAMP	33
Tabla 5. Sistemas de elución, reveladores y estándares utilizados en ccp.	37
Tabla 6. Sistema de gradiente	39
Tabla 7. Regeneración indirecta a partir de explantes de tallo y hoja de <i>M. oleifera</i> . .	43
Tabla 8. Lista de combinación de oligonucleótidos y resultados de amplificación	45
Tabla 9. Cuantificación de rutina y quercetina de hojas de <i>M. oleifera</i>	51
Tabla 10. Total de fracciones obtenidas por los diferentes sistemas de elución.....	52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pina del árbol de <i>M. oleifera</i>	10
Figura 2. Vaina y semillas del árbol de <i>M. oleifera</i>	11
Figura 3. Etapas de la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>M. oleifera</i>	40
Figura 4. Brotación múltiple a partir de explantes ápices de semillas de <i>M. oleifera</i> ..	41
Figura 5. Brotación múltiple a partir del nodo cotiledonar de semillas de <i>M. oleifera</i> .	41
Figura 7. Regeneración vía organogénesis indirecta.....	42
Figura 8. Enraizamiento en plántulas de <i>M. oleifera</i>	43
Figura 9. Plantas de <i>M. oleifera</i> obtenidas mediante germinación convencional..	44
Figura 10. Electroforesis de muestras de ADN de <i>M. oleifera</i>	44
Figura 11. Dendrograma obtenido del análisis estadístico para individuos de <i>M. oleifera</i>	46
Figura 12. Niveles de colesterol total en los diferentes grupos de estudio.....	47
Figura 13. Niveles de triglicéridos en los diferentes grupos de estudio.....	47
Figura 14. Análisis de los flavonoides quercetina (q) y rutina (r).....	48
Figura 15. Análisis de los extractos íntegro (ei), acetato de etilo (ae) y acuoso (a) estándar: ac. ursólico (au).....	49
Figura 16. Análisis de los extractos íntegro (ei), acetato de etilo (ae) y acuoso (a) estándar glucósido de β -sitoesterol ($g\beta$ -s).....	49
Figura 17. Análisis de los extractos íntegro (ei), acetato de etilo (ae) y acuoso (a) estándares: glicina (gi) y glucosa (gu).....	49
Figura 18. Análisis por HPLC de los diferentes extractos: a) extracto integro, b) extracto de acetato de etilo, c) extracto acuoso.....	50
Figura 19. Análisis de los extractos clorofórmico y metanólico.....	51
Figura 20. Análisis de las diferentes fracciones del extracto clorofórmico.....	53
Figura 21. Análisis de las fracciones 6 y 7 del extracto clorofórmico, comparado con el estándar β -sitoesterol.....	53

RESUMEN

Moringa oleifera es la especie más conocida de la familia Moringaceae y se le atribuyen varios usos medicinales y un alto valor nutricional. En este estudio, se implementó un sistema eficaz de propagación masiva de moringa, usando como explantes ápices y yemas del nodo cotiledonal, cultivadas en el medio basal de Murashige y Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Para la regeneración indirecta, se utilizaron como explantes segmentos de tallo y hoja, provenientes de plántulas propagadas *in vitro*, el mejor tratamiento fue MS suplementado con 1 mg L⁻¹ de BA y 0,2 mg L⁻¹ de IAA, con un máximo de 14 brotes por explante. La aclimatación de las plántulas del cultivo *in vitro* obtuvo una tasa de supervivencia del 95%. El estudio de variabilidad genética se llevó a cabo a través del marcador molecular “Polimorfismo de Microsatélites Amplificados al Azar” (RAMP), donde se utilizaron 15 cebadores tipo RAPD y 12 ISSR; el dendrograma no mostró ninguna variación entre las plantas propagadas *in vitro*, estos resultados muestran ser eficaces para la propagación rápida de *M. oleifera* sin el uso de RCV (incluso en pequeñas cantidades), que confirma la fidelidad clonal, ya que no hay riesgo de cambio genético a través de esta metodología. Por otro lado, también se evaluó el extracto acuoso y la fase de acetato de etilo de hojas de *M. oleifera*, sobre ratas hiperlipídica, donde se demostró el efecto hipolipidémico (colesterol total y triglicéridos); y se cuantificaron dos flavonoides: Rutina y Quercetina así como un fitoesterol: β-sitosterol, compuestos relacionados con la disminución de colesterol total y triglicéridos.

ABSTRACT

Moringa oleifera is the best known species of the family Moringaceae and is attributed several medicinal uses and a high nutritional value. In this study, an effective system for mass propagation of moringa has been implemented, using node apices and cotyledonal buds cultured in the Murashige and Skoog (MS) basal medium without plant growth regulators (RCV). For indirect regeneration, stem and leaf segments from *in vitro* propagated on MS medium supplemented with different combinations and concentrations of benzylaminopurine (BA), indoleacetic acid (IAA) and indolebutyric acid (IBA); the best treatment was to the combination of 1 mg L⁻¹ BA and 0.2 mg L⁻¹ IAA, which presented a maximum of 14 buds per explant. The genetic variability study was performed through the molecular marker "Random Amplified Microsatellite Polymorphism" (RAMP), where 15 primers were used RAPD and 12 ISSR; the dendrogram doesn't not show any variation among the plants propagated *in vitro*, these results prove to be effective for the rapid propagation of *M. oleifera* without the use of RCV (even in small amounts), which confirms the clonal fidelity, since there is no risk of genetic change through this methodology. On the other hand, the aqueous extract and the ethyl acetate phase of leaves of *M. oleifera* were evaluated on hyperlipidic rats, where the hypolipidemic effect (total cholesterol and triglycerides) was demonstrated; and two flavonoids were quantified: Rutin and Quercetin as well as a phytosterol: β -sitosterol, compounds related to the decrease of total cholesterol and triglycerides.

I. INTRODUCCIÓN

Moringa oleifera es la especie más conocida de la familia Moringaceae. Esta planta es originaria del oeste de sub-Himalaya, India, Pakistán, Asia y África, y se distribuye en Filipinas, Camboya, América y las islas del Caribe (Luqman *et al.*, 2012). En México se encuentra principalmente en el Pacífico y el Golfo (Mohammed *et al.*, 2012). A esta especie se le atribuyen diversas propiedades medicinales, por ejemplo las hojas tienen un alto valor nutricional y son una fuente importante de proteínas altamente digestibles, calcio, hierro, antioxidantes como flavonoides, fenoles, carotenoides y vitamina C y E (Park *et al.*, 2011; Luqman *et al.*, 2012; Förster *et al.*, 2013). Las semillas se consideran como un eficaz coagulante natural utilizado para purificar el agua, y como una fuente potencial de biodiesel (Ndabigengeserea *et al.*, 1998).

La forma convencional de propagar *M. oleifera* es por semillas, lo que causa que su crecimiento sea lento (Stephenson y Fahey, 2004). Por lo tanto, en la actualidad resulta imposible cubrir las crecientes demandas requeridas para la especie con el fin de satisfacer sus diferentes usos domésticos, nutricionales, comerciales y medicinales (Luqman *et al.*, 2012). Sin embargo, el establecimiento de un cultivo de tejidos *in vitro* ofrece muchas ventajas sobre los métodos convencionales de propagación (Yin *et al.*, 2013). Dentro de este contexto, se ha informado de algunos procesos de micropropagación de *M. oleifera* a través de: segmentos nodales (Saini *et al.*, 2013; Förster *et al.*, 2013), regeneración indirecta de cotiledones axilares y brotes, (Steinitz *et al.*, 2009) organogénesis (Mathur *et al.*, 2014) y la multiplicación utilizando tejidos de semillas inmaduras (Stephenson y Fahey, 2004). Además, las técnicas de cultivo de tejidos es una herramienta importante en la mejora de las plantas a través de la tecnología transgénica (Shahzad *et al.*, 2013), este es el caso de la regeneración directa o indirecta (Saini *et al.*, 2013; Khateeb *et al.*, 2013).

Entre las diferentes vías del cultivo *in vitro*, algunas de las condiciones pueden ser modificados para obtener un mejor resultado. Por lo tanto, los cambios en estas condiciones, como la composición y la concentración de fitohormonas o intensidad de la luz y la temperatura, pueden producir plantas más vigorosas (Khateeb *et al.*, 2013). En el caso de la regeneración, diferentes tipos de hormonas y concentraciones pueden ayudar en el desarrollo de callos, al ser sometidos a procesos de desdiferenciación y la rediferenciación, que a su vez puede dar lugar a alguna variación genética (Roy *et al.*, 2012). Por lo que un aspecto importante para que las técnicas de regeneración o propagación clonal sean exitosas es que estas plantas

presenten uniformidad comparadas con las propagadas convencionalmente (Zhao *et al.*, 2005).

Numerosas técnicas han sido desarrolladas para detectar esta variación genética debido a los diferentes efectos que pueden tener sobre la calidad de las plantas regeneradas; las técnicas más eficientes para este propósito son aquellos que incluyen el uso de marcadores moleculares de ADN (Roy *et al.*, 2012). Estos marcadores proporcionan mejores oportunidades para la caracterización genética, estudios de biodiversidad y la variabilidad genética (Sorkheh *et al.*, 2009). Dentro de estos marcadores, está incluida la técnica RAMP (Random Amplified microsátélites polimorfismo), que combina las ventajas de los marcadores ISSR y RAPD y ha mostrado mejores resultados en las genealogías de los cultivares, con mayor fidelidad que los RAPDs; además de ser particularmente adecuado para especies de plantas con un fondo genético ambiguo (Yang *et al.*, 2006). Esta técnica ya se ha utilizado para evaluar la diversidad genética en las legumbres, tales como: *Cicer arietinum* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L. y *Tamarindus indica* L., *Leymus Hochst* entre otros (Valadez-Moctezuma *et al.*, 2005) y permiten mostrar la base de la variación de los individuos (Yang *et al.*, 2006).

Otra de las propiedades fundamentales con la que cuenta *M. oleifera*, es la farmacológica. Todas las partes de este árbol se considera que poseen propiedades medicinales y se utilizan en el tratamiento de diferentes enfermedades (Goyal *et al.*, 2007), ya que se ha utilizado como remedio de una variedad de trastornos tales como: enfermedades de la piel (Stussi *et al.*, 2002), respiratorias, infecciones del oído y dentales (Fuglie *et al.*, 1999), náuseas y mareos (Park *et al.*, 2011; Bharali *et al.*, 2003), hipertensión (Faizi *et al.*, 1995), diabetes (Fahey, 2005), anemia, y cáncer: actividad anti-tumoral (Guevara *et al.*, 1999), próstata (Fuglie *et al.*, 1999). Además de esto sus hojas son utilizados en medicina herbaria como un agente hipocolesterolémico en pacientes obesos (Ghasi *et al.*, 2000). Esta actividad ya ha sido descrita en diferentes investigaciones; Ara *et al.*, (2008) encontraron que el extracto de hojas de *M. oleifera* con atenolol redujo los niveles de triglicéridos y colesterol sérico en ratas. En otros estudios realizados por Mehta *et al.*, (2003) encontraron que el fruto de moringa disminuye el colesterol sérico, triglicéridos, fosfolípidos, lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Atsukwei *et al.*, (2014), también informaron sobre el efecto hipolipemiante del extracto etanólico de hojas de *M. oleifera* principalmente en términos de reducción de lípidos séricos y la pérdida de peso corporal en ratas. Por su parte, Ghasi *et al.*, (2000) demostraron que los extractos de hojas de moringa poseen

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una actividad hipocolesterolemia importante y provoca una disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos en el suero de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, además atribuyó esta actividad a la presencia de β -sitoesterol (Ghasi *et al.*, 2000). El β -sitoesterol es un importante esteroles vegetal (Jiménez-Escrig *et al.*, 2006; Rosenblat *et al.*, 2013), este esteroles regula los niveles de colesterol en la sangre (Wu *et al.*, 2014). Se ha sugerido que los esteroles vegetales compiten con el colesterol intestinal para la incorporación en micelas mixtas, así como en los quilomicrones, con lo cual se podría ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares, reduciendo la absorción de colesterol a través de diferentes mecanismos o combinaciones de mecanismos (Alemany *et al.*, 2014).

Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó la variabilidad genética de plantas de *M. oleifera* obtenidas por dos diferentes sistemas de propagación: *in vitro* (propagación y regeneración vía organogénesis indirecta) y *ex vitro* (germinación de semillas en sustrato), además del análisis de la actividad hipolípida de los extractos acuosos y de acetato de etilo de hojas de *M. oleifera* en ratas hiperlipídicas, y la cuantificación de Rutina, Quercetina y β -sitoesterol, compuestos que están relacionados con la disminución de colesterol total y triglicéridos.

1.1. Taxonomía

M. oleifera pertenece a la familia Moringaceae, un grupo pequeño de plantas dentro del inmenso orden *Brassicales* que incluye la familia de la col y del rábano, junto con la familia del mastuerzo y de las alcaparras (APG, 2009). Moringaceae comprende únicamente un género, *Moringa*. Dentro de *Moringa* hay 13 especies las cuales abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde hierbas y arbustos hasta árboles grandes. Si bien varían mucho en su forma, es muy fácil distinguir un miembro de moringa de cualquier otra planta (Olson y Fahey, 2011).

1.2. Morfología

La familia Moringaceae se distingue de las otras familias por una combinación única de rasgos (Olson, 2010a). Crece generalmente hasta 10 o 12 m de altura. Cuenta con una corteza gris pálida o marrón claro, finamente lisa o rugosa (Olson, 2010b). Tiene una copa de caída abierta, ramas frágiles y follaje plumoso de hojas tripinnadas (Roloff, 2009).

Raíces: Las plántulas desarrollan una raíz pivotante tuberosas cuando son jóvenes, y leñosa en la madurez (Olson, 2010b). Presenta un color blanco que tiene un olor

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pungente característico, y las raíces laterales son muy dispersas (Roloff, 2009). El xilema secundario de la raíz muestra bandas de fibras libriformes, este predominio de fibras hacen que las raíces de estos árboles sean las más duras del género (Olson, 2001).

Hojas: Las láminas son brillantes de color verde oscuro, distribuidas en 4 a 8 pares de pinnas; las pinnas más grande se disponen cerca de la base de la hoja (Olson, 2010b). Las hojas presentan hasta 45 cm de largo, estas están compuestas con foliolos de 1 o 2 cm de largo. Los foliolos son finamente vellosos con márgenes enteros (Figura 1), y se redondean de punta roma en el ápice y de punta corta en la base (Roloff, 2009).

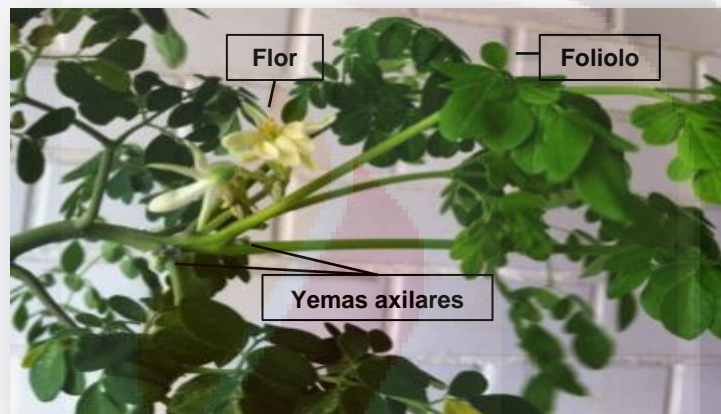


Figura 1. Estructura de la pina del árbol de *M. oleifera* donde se muestran las yemas axilares, los foliolos y la flor.

Flores: Son bisexuales, flores de color blanco amarillento, los tallos tienen vellosidad y racimos axilares caídos (panículas) de 10 a 25 cm de largo (Fig. 1). Las flores individuales son de aproximadamente 0.7 a 1 cm de largo y 2 cm de ancho, con cinco pétalos desiguales, tienen cinco estambres y un pistilo compuesto de un 1 ovario y un estilo (Roloff, 2009).

Fruto: Son cápsulas trilobuladas, llamadas frecuentemente vainas. Las vainas son colgantes, de color marrón, de forma triangular, y así se divide en tres partes (a lo largo) cuando se seca. La producción de frutos se presenta principalmente en marzo y abril. Cada fruto contiene alrededor de 26 semillas durante su fase de desarrollo (Roloff, 2009). Las vainas forman una cápsula larga y leñosa que cuando alcanza la

madurez se abre lentamente en 3 valvas que se separan la una de la otra por su longitud, quedando pegadas sólo en la base del fruto (Olson y Fahey, 2011).

Semillas: Son redondas de 1 cm de diámetro, con una cáscara semipermeable. Los cascos de las semillas son de color marrón a negro, pero pueden ser blancas si los núcleos son de baja viabilidad. Las semillas viables germinan en 2 semanas aproximadamente. Tienen alas blancas en el casco que corren de arriba a abajo (Fig. 2). Cada árbol puede producir alrededor de 15.000 a 25.000 semillas al año. El peso medio es de 0.3 g por semilla (Roloff, 2009).

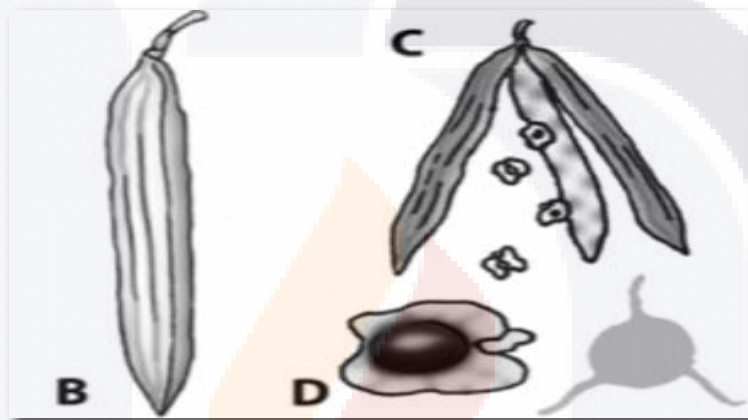


Figura 2. Vaina y semillas del árbol de *M. oleifera* (Olson y Fahey, 2011).

La combinación de hojas pinnadas, frutos trivalvados y semillas con 3 alas hace que sea muy fácil reconocer una moringa. Para asegurar la identificación, se pueden buscar las glándulas foliares características de esta familia, las cuales se encuentran en ambos lados flanqueando la base o en el ápice del pecíolo y en la mayoría de las articulaciones del raquis (Olson y Fahey, 2011). Otras características únicas de la familia, pero menos fáciles de observar, incluyen el estilo hueco y las anteras con 2 esporangios o cámaras para el polen en vez de los 4 que suelen presentar las plantas con flor (Olson, 2003). Características aún menos aparentes incluyen los ductos de goma en la médula de los tallos y elementos de vaso con placas de perforación sin bordes (Olson y Carlquist, 2001; Olson, 2002).

1.3. Distribución

M. oleifera es autóctona del sur de Asia, noreste de Pakistán (33 ° N, 73 ° S) hasta el norte, del estado de Bengala Occidental en la India y el noreste de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Bangladesh, donde se encuentra comúnmente desde el nivel del mar hasta 1.400 m. Se cultiva y se ha naturalizado en otras partes de Pakistán, la India y Nepal, así como en Afganistán, Bangladesh, Sri Lanka, el sudeste de Asia, Asia occidental, la península Arábiga, África oriental y occidental, a lo largo de las Indias Occidentales y el sur de Florida, en América central y del Sur de México a Perú, así como en Brasil y Paraguay (Gupta, 2010).

Uno de los problemas que enfrenta esta especie es el conocimiento de su historia natural, ya que, como muchas plantas de importancia económica, se sabe muy poco en su estado silvestre (Olson y Fahey, 2011). Cuando se habla de la distribución de moringa es esencial hacer la distinción entre términos como “nativo”, “silvestre” y “naturalizado”; varios autores que escriben sobre los usos de este árbol se refieren a la planta como “naturalizada” o hasta “silvestre” cuando se observa en países fuera de su lugar de origen. Esta terminología es incorrecta, pues el proceso de naturalización biológica implica que un organismo se establezca en una región en donde no es nativo y logre sobrevivir y reproducirse por muchas generaciones sin asistencia humana (Villaseñor y Espinoza, 1998). En México ya es parte de la horticultura tradicional desde hace mucho tiempo, principalmente con fines ornamentales, la encontramos abundantemente en los pueblos de toda la costa del Pacífico, desde el sur de Sonora hasta Chiapas, incluyendo el sur de la península de Baja California. Los ejemplares de moringa son especialmente abundantes y frondosos en las llanuras calientes del sur del istmo de Tehuantepec. La planta también se cultiva en los poblados de las depresiones tropicales secas del país, como la del Balsas y la depresión central de Chiapas. En general, prospera mejor por debajo de los 500 msnm y crece muy poco cuando se cultiva a altitudes mayores a 1500 msnm (Olson y Fahey, 2011).

1.4. Usos domésticos

Además de su consumo como alimento, hay múltiples usos de *M. oleifera*, los cuales incluyen su uso como: fertilizante (semilla) y forraje (Guha y Negi, 1965), productos de limpieza del hogar (Rahman *et al.*, 2009), nutrientes foliares (jugo de las hojas), abono verde (hojas) (Fuglie *et al.*, 1999), y biodiesel (Azam *et al.*, 2005). El aceite de las semillas (rendimiento del 30-40% en peso), también conocido como aceite de Ben es muy utilizado, ya que este es resistente a la rancidez (Tsaknis *et al.*, 1999), mantiene su calidad y por lo tanto pueden utilizarlo para lubricar la maquinaria de precisión como los relojes (Lim, 2011). En el oeste de África, uno de sus aplicaciones más populares es el uso de semillas en polvo para flocular contaminantes y purificar el agua (Gassenschmidt *et al.*, 1995).

1.5. Propiedades nutricionales

El árbol de *M. oleifera* se ha utilizado para combatir la desnutrición, especialmente entre niños y madres lactantes. Tres ONGs, en particular Trees for Life, Servicio Mundial de Iglesias y la Organización de Preocupación Educativa para el Hambre, han señalado a esta especie como "la nutrición natural para los trópicos" (Fahey, 2005). Su propiedad nutritiva se debe a la presencia de una variedad de fitoquímicos esenciales presentes en sus hojas, vainas y semillas (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). De hecho, moringa pueden proporcionar más de siete veces vitamina C de lo que se encuentra en las naranjas, 10 veces mas vitamina A que en las zanahorias, 17 veces mas calcio que la leche, nueve veces mas proteína que se encuentra en el yogur, 15 veces mas potasio que los plátanos y 25 veces mas hierro que las espinacas (contenido nutricional gramo por gramo) (Trees for Life, 2005).

Cada parte de *M. oleifera* es un almacén de nutrientes importantes. Sus hojas son ricas en minerales como calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio y zinc (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Elementos tales como beta-caroteno en vitamina A, vitamina B, como el ácido fólico, el ácido nicotínico y la piridoxina, la vitamina C, D y E también se encuentran dentro de las hojas y son ricas en almidón y proteínas (Park *et al.*, 2011; Mbikay, 2012). El análisis del contenido de proteínas de las hojas secas muestran que hasta un 30% de su peso se compone de proteínas (leche en polvo contiene 35%) y la mayor parte parece ser asimilado directamente (Freiberger *et al.*, 1998). Además, las hojas contienen todos los aminoácidos esenciales (Olson y Fahey, 2011).

El fruto joven es rico en proteínas y una buena concentración de calcio y hierro (Lim, 2011). Se ha descrito que la composición de nutrientes de las flores por porción de 100 g se compone de: 85.9 g de humedad, 50 kcal de energía, 3.6 g proteínas, 0.8 g de grasa, 7.1 g de hidratos de carbono, 1.3 g de fibra, 1.3 g de cenizas, 51 mg Ca y 90 mg P (Gopalan *et al.*, 2002). El calcio es un macroelemento vital para la salud humana. Una taza (8 onzas) de leche o yogur podría suministrar 300-400 mg (aproximadamente la mitad de la cantidad diaria necesaria), mientras que 8 onzas de hojas de *M. oleifera* contienen 1.000 mg de calcio. Las hojas en polvo del mismo peso (230 mg) contiene más de 4 000 mg de calcio. La carne de vaca tiene sólo 2 mg de hierro, mientras que el polvo de estas hojas tiene 28 mg de hierro (Fuglie, 2005). Por todo esto, es evidente que la moringa es un alimento importante, un hallazgo que ya ha sido probado en varias ocasiones.

1.6. Propiedades medicinales

La fitomedicina o medicina botánica se refiere a la utilización de semillas, raíces, cortezas, hojas, bayas o flores de plantas para fines medicinales. La investigación clínica, ha empleado a la medicina herbal como tratamiento y prevención de diversas enfermedades (Rajanandh *et al.*, 2012). *M. oleifera* ha sido aprovechada en la medicina herbal africana, debido a que los fitoquímicos que se encuentran en diversas partes de esta planta actúan como agentes medicinales (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Este potencial medicinal, ha sido reconocido en los sistemas Ayurveda (define la salud desde un punto de vista holístico, integral, personalizado, espiritual y filosófico), y Unani (Propone todas las formas de vida derivados de las realidades cosmológicas o metafísicos) (Mughal *et al.*, 1999).

Casi todas las partes de este árbol, incluyendo la raíz, corteza, goma, hojas, frutos (vainas), flores, semillas y aceite de semillas se han utilizado para varias enfermedades en la medicina indígena (Odebiyi y Sofowora, 1999), pero investigaciones recientes sugieren su aplicabilidad en la medicina moderna (Farooq *et al.*, 2012). Sus diferentes partes se han utilizado como remedios para el tratamiento de una variedad de trastornos tales como: enfermedades de la piel (Stussi *et al.*, 2002), infecciones respiratorias, del oído y dentales (Fuglie *et al.*, 1999), náuseas (Park *et al.*, 2011; Bharali *et al.*, 2003), hipertensión (Faizi *et al.*, 1995), diabetes (Fahey, 2005), anemia, y cáncer: actividad anti-tumoral (Guevara *et al.*, 1999), próstata (Fuglie *et al.*, 1999).

Semillas: Su extracto ejerce un efecto protector por la disminución de peróxidos de lípidos en el hígado (Anwar *et al.*, 2007), tiene actividad analgésica (Rao y Ojha, 2003; Sutar *et al.*, 2008), antipirética (Rao y Ojha, 2003), hepatoprotectora (Selvakumar y Natarajan, 2008), antiulcerosas (Pal *et al.*, 1995), hipotensora (Faizi *et al.*, 1995) y diurética (Cáceres *et al.*, 1992).

Raíces: el extracto de la raíz ha mostrado poseer actividad contra la fertilidad (Shukla *et al.*, 1988), actúa como anti-inflamatorio (Fahey, 2005), alivia dolor de riñón y ayuda en resfriados leves (Fuglie *et al.*, 1999), actúa como diurético (Morton, 1991) y alivia enfermedades de la piel (Stussi *et al.*, 2002). Se ha informado que poseen actividad antiespasmódica mediante el bloqueo de los canales de calcio que forma la base para su uso tradicional en la diarrea (Luqman *et al.*, 2012). Además tiene actividad contra el asma y la gota (Fuglie *et al.*, 1999), el reumatismo (Delaveau y Boiteau, 1980),

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

lumbago (Karadi *et al.*, 2006), hepatomegalia o esplenomegalia (Pari y Kumar, 2002) y reduce la caries dental (Fuglie *et al.*, 1999).

Hojas: Se utiliza como una cataplasma para los dolores (Morton, 1991), se aplica para reducir la inflamación glandular, reduce úlceras, actúa como agente hipocolesterolemizante (Mehta *et al.*, 2003), ayuda a disminuir dolores de cabeza (Ross, 2003), fiebre, dolor de garganta y bronquitis (Mishra *et al.*, 2012). Las hojas tienen efecto sobre las infecciones del oído y del ojo (Anwar *et al.*, 2007), controla los niveles de glucosa (Kar *et al.*, 1999) actúa como anti-bacterial (Das *et al.*, 1957), anti-tumoral (Guevara *et al.*, 1999), y sirve como tratamiento de infecciones del tracto urinario (Shaw y Jana, 1982), como fuente de antioxidantes (Bennett *et al.*, 2003), antiséptico (Fuglie *et al.*, 1999), y es útil para la cicatrización de heridas (Hukkeri *et al.*, 2006).

Corteza: Su extracto ha demostrado tener actividad anti-hongos y anti-tuberculosis (Mehta *et al.*, 2003). El extracto acuoso caliente de la corteza se toma por vía oral como un promotor menstrual y como diurético (Ross, 2003), se utiliza para tratar enfermedades de los ojos (Anwar *et al.*, 2007), destruir tumores y curar úlceras (Pal *et al.*, 1995). Sirve como tratamiento para el asma, la sífilis y la disentería (Fuglie *et al.*, 1999), alivia los dolores de cabeza (Ross, 2003), fiebre (Mishra *et al.*, 2012), y problemas intestinales (Anwar *et al.*, 2007), a veces se usa como un abortivo (Nath *et al.*, 1992). También se utiliza para el reumatismo (Delaveau y Boiteau, 1980).

Flor: se han utilizado para tratar inflamación (Fahey, 2005), enfermedades musculares (Morton, 1991), tumores (Pari y Kumar, 2002) y bazo agrandado (Guevara *et al.*, 1999); disminuye niveles séricos de triglicéridos y colesterol (Ghasi *et al.*, 2000), ayuda con el dolor de garganta, resfriados y se usa como diurético (Morton, 1991). Tiene un alto valor medicinal como un estimulante y afrodisíaco (Nair y Subramanian, 1962), además posee una actividad antihelmíntica (Guevara *et al.*, 1999), diurética (Kesharwani *et al.*, 2014) y ayuda en el tratamiento de reumatismo (Delaveau y Boiteau, 1980).

1.7. Propiedades fitoquímicas

Un análisis de los fitoquímicos de especies del género *Moringa* permite la oportunidad de examinar un intervalo bastante único de compuestos (Stephenson y Fahey, 2004). En específico la especie *M. oleifera* es rica en compuestos que contienen la azúcar

simple ramnosa y un especial grupo de compuestos llamado glucosinolatos e isotiocianatos (Fahey *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2003). Si bien estos compuestos son relativamente únicos para la familia *Moringaceae*, también cuenta con una buena cantidad de vitaminas y minerales así como otros fitoquímicos mas conocidos: carotenoides (incluyendo β -caroteno o pro-vitamina A) (Stephenson y Fahey, 2004). Estos fitoquímicos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Fitoconstituyentes presentes en *M. oleifera*.

Partes	Fitoconstituyentes	Referencia
Raíces	4-(α -Lramnopiranosiloxi) bencil glucosinolatos, alcaloides, acetato aurantiamida y urea 1,3-dibencil, procianidina.	Bennett <i>et al.</i> , 2003, Mazumder <i>et al.</i> , 1999, Sashidhara <i>et al.</i> , 2009, Atawodi <i>et al.</i> , 2010.
Tallo	4-hidroximeleina, vainillina, β -sitosterona, ácido octadecanoico y β -sitosterol, procianidina, 4-(α -L-ramnopiranosiloxi) bencil glucosinolatos.	Saluja <i>et al.</i> , 1978, Bennett <i>et al.</i> , 2003, Atawodi <i>et al.</i> , 2010.
Corteza	4-(α -Lramnopiranosiloxi) bencil glucosinolatos.	Bennett <i>et al.</i> , 2003.
Hojas	Dos glucósidos de nitrilo: niazirina y niazirinina y tres glucósidos, niaziminin A y B, 4-[(4'-O-acetil- α -Lramnosiloxi)] bencil isotiocianato y α -Lrhamnosidos, 4-hidroxi-bencilo con nitrilo, grupos carbamato y tiocarbamato, flavonoides, antocianinas, proantocianidinas y cinamatos, glucósido de quercetina y quercetina 3-O-(6-malonil-glucósido), y menores cantidades de glucósido de kaempferol y kaempferol 3 O-(6-malonil-glucósido). También contiene ácido quínico y ácido cafeoilquinico.	Bennett <i>et al.</i> , 2003; Faizi <i>et al.</i> , 1994b; Faizi <i>et al.</i> , 1995, Makkar y Becker, 1996.
Flores	Azúcares, D-manosa, D-glucosa y G-galactosa, ácido D-glucurónico, Pterigospermina, ácido oleico, ácido cáprico, satol, ocnol.	Pramanik <i>et al.</i> , 1998; Nepolean <i>et al.</i> , 2009 Das <i>et al.</i> , 1957.
Semillas	Nitrilos, isotiocianato, tricarbamato y O-[2'-hidroxi-3'-(2"-hepteniloxi)]-propil undecanoato, O-etilo-4-[(α -L-ramnosiloxi) bencil] carbamato, y β -sitosterol, 4-(α -L-ramnosiloxi) bencil isotiocianato, 4-(L-ramnosiloxi) fenilacetónitrilo, 4-hidroxi-fenilacetónitrilo y 4-hidroxi-fenilacetamida, niazimicina, niazirina, β -sitosterol, glicerol-1-(9-octadecanoato), roridina E, β -sitosterol, β -sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido y ácido oleico.	Bennett <i>et al.</i> , 2003; Faizi <i>et al.</i> , 1998; Faizi <i>et al.</i> , 1995; Faizi <i>et al.</i> , 1994b; Cheenpracha <i>et al.</i> , 2010; Nepolean <i>et al.</i> , 2009; Eilert <i>et al.</i> , 1981; Guevara <i>et al.</i> , 1999; Mahajan y Mehta, 2011. Villaseñor y Espinoza, 1998.

1.8. Propiedades farmacológicas

Actividad antihipertensiva: Se estableció que el jugo de las hojas de *M. oleifera* tiene un efecto estabilizador sobre la presión arterial (Wealth of India, 1962; Dahot, 1988); se encontró que los glucósidos de nitrilo (aislados en aceite) y el tiocarbamato (aisladas hojas) son responsables de la reducción de la presión arterial (Faizi *et al.*, 1994a; 1994b; 1995). Gilani *et al.*, (1944), realizaron un fraccionamiento del extracto etanólico de hojas de *M. oleifera*, el cual condujo al aislamiento de cuatro compuestos puros: niazinina A, niazinina B, niazimicina y niazinina A+B, este último compuesto mostró efecto en la presión arterial en ratas, posiblemente mediado a través de un efecto antagonista de descenso de calcio. Además, el fraccionamiento del extracto etanólico de vainas, condujo al aislamiento del tiocarbamato y glucósido de isotiocianato conocido por tener actividad hipotensora (Faizi *et al.*, 1995). Faizi *et al.*, (1998), investigaron la actividad hipotensora de extractos acuosos y etanólico de todas las partes de *M. oleifera*, donde dos nuevos compuestos (1) O-[2'-hidroxi-3'-(2"-hepteniloxi)]-propil undecanoato y (2) O-etil-4-[(α L-ramnosiloxi)bencil] carbamato junto con la conocida sustancia metil p-hidroxibenzoato de metilo. El β -sitosterol también se aisló en este estudio. Los dos últimos compuestos y p-hidroxibenzaldehído mostraron una buena actividad hipotensora.

Actividades antitumorales y anticancerígenas: Una de las enfermedades más comunes es el cáncer, 7 de 10 muertes por cáncer son atribuidas a una medicación inadecuada. Los tratamientos contra el cáncer, como la cirugía, la quimioterapia y la radiación son caros y tienen efectos secundarios (Nair *et al.*, 2005). Investigaciones más recientes han demostrado que *M. oleifera* puede ser empleado como un agente contra el cáncer, los estudios han confirmado que extractos solubles de hojas se pueden utilizar como un agente anti-neoproliferativos que inhibe el crecimiento de células de cáncer (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). La mayoría de las investigaciones sugieren que el efecto anti-proliferativo de cáncer puede ser debido a su capacidad para inducir las especies reactivas del oxígeno en las células cancerosas (Tiloke *et al.*, 2013). Los compuestos de las hojas que son responsables de las actividades contra el cáncer son los glucosinolatos, bencil isotiocianato y niazimicina (Hermawan *et al.*, 2012). El bencil isotiocianato ha demostrado estar relacionado con el cáncer. La investigación muestra que BITC causa intracelular de ROS, lo que lleva a la muerte celular. Esto podría ser una de las razones por las que moringa sirve como un buen agente contra el cáncer (Nakamura *et al.*, 2002; Miyoshi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 1999).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Makonnen *et al.*, (1997) encontraron que moringa es una fuente potencial para la actividad antitumoral. También ha sido probado el potencial de los compuestos O-etil-4-(α -L-ramnosiloxi) carbamato con 4 (α -L-rhamnosiloxi) y 3-O-(6'- β -O-oleoil-D-glucopiranosil)-beta-sitoesterol, los cuales mostraron efectos inhibidores significativos sobre la actividad antitumoral del antígeno temprano del virus de Epstein-Barr. Niazimicina se ha propuesto para ser un agente quimiopreventivo potente en la carcinogénesis química (Guevara *et al.*, 1999). Además los extractos de semillas también han demostrado ser eficaces en el metabolismo de las enzimas hepáticas de carbonocinogeno, papillomagenesis y parámetros antioxidantes en ratas (Bharali *et al.*, 2003).

Propiedades antidiabéticas: Varios estudios han demostrado que *M. oleifera* puede actuar como un agente antidiabético eficaz para curar la diabetes tipo 1 y 2 (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Estudios han demostrado que sus extractos acuosos pueden curar la diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina y también es resistente a la insulina en la diabetes tipo 2 en ratas (Divi *et al.*, 2012). En otros estudios, las ratas diabéticas inducidas con STZ fueron alimentadas con polvo de semilla de moringa y encontraron que la glucosa se redujo en sangre en ayunas (Al-Malki y El Rabey, *et al.*, 2015). Por otra parte, cuando las ratas fueron tratadas con aproximadamente 500 mg de polvo de semillas de moringa/kg de peso corporal, se incrementaron las enzimas antioxidantes en suero. Esto demuestra que los antioxidantes presentes en esta planta pueden reducir ROS en las células beta causados debido a la inducción de STZ (Mbikay, 2012). La diabetes conduce a diversas complicaciones tales como retinopatía, nefropatía, aterosclerosis etc. *M. oleifera* se puede utilizar para prevenir tales enfermedades (Gopalakrishnan *et al.*, 2016).

Actividades antihipercolesterolemicos: Dentro de las propiedades de *M. oleifera* se ha evaluado el efecto reductor de colesterol. La investigación ha revelado que el extracto crudo de sus hojas tiene una acción significativa en la reducción del colesterol en el suero de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, esto puede ser atribuido a la presencia de un fitoconstituyente bioactivo, β -sitoesterol (Ghasi *et al.* 2000). Además, el fruto mostró una reducción del colesterol sérico, fosfolípidos, triglicéridos, lipoproteínas de baja densidad [LDL], lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL], colesterol, índice aterogénico y reduce el perfil lipídico del hígado, el corazón y la aorta en conejos hipercolesterolemicos (Mehta *et al.*, 2003).

Algunos estudios de los extractos de esta planta en la dieta de Tailandia

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

encontraron que su potencial (100 mg/ml) fue similar a 0.4 mg/ml de pravastatina (reducción del colesterol por fármacos) en la inhibición de HMG Coa reductasa y posiblemente reducción de la biosíntesis del colesterol (Duangjai *et al.*, 2011).

Actividad antioxidante: Se ha informado que el extracto acuoso de *M. oleifera* ha mostrado una actividad antioxidante (Obioma y Adikwu, 1997). Algunos estudios sugieren que los extractos de las hojas maduras y tiernas de *M. oleifera* poseían una potente actividad antioxidante contra los radicales libres, previniendo el daño oxidativo a las principales biomoléculas y ofrece una protección significativa contra el daño oxidativo (Sreelatha y Padma, 2009). En otro estudio se encontró que el tratamiento con extracto de hojas reduce el nivel de malondialdehído y la actividad de las enzimas del hígado, por lo tanto aumenta la actividad de los parámetros de antioxidantes en ratas albinas, por tal razón pueden utilizarse como fármaco hepatoprotector en el futuro (El-Bakry *et al.*, 2016). Además, se encontró que los extractos (agua, metanol acuoso, y el etanol acuoso) de hojas de *M. oleifera* liofilizadas de diferentes regiones agroclimáticas eran capaces de eliminar los radicales peroxilo y superoxilo (Siddhuraju y Becker, 2003). Se observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante de los extractos de diferentes localidades y temporadas en Pakistán (Iqbal y Bhangar, 2006).

Se ha reportado que las hojas de moringa son una rica fuente de β -caroteno, proteínas, vitamina C, calcio y potasio y actuar como una buena fuente de antioxidantes naturales; y por lo tanto mejorar la vida útil de los alimentos que contienen grasas debido a la presencia de varios tipos de compuestos antioxidantes tales como ácido ascórbico, flavonoides, compuestos fenólicos y carotenoides (Dillard y German, 2000; Siddhuraju y Becker, 2003). En el sur de la India, la gente del pueblo utilizan las hojas frescas en la manteca de vaca y búfalo. Se ha encontrado que hay un aumento significativo en la vida útil de la mantequilla de búfalo y que las hojas pueden ser una buena fuente de antioxidantes naturales. Esta mejora de la vida útil de manteca puede ser debido a diversos tipos de compuestos antioxidantes tales como: ácido ascórbico, carotenoides, y sustancias fenólicas, también presentes en las hojas (Siddhuraju y Becker, 2003).

1.9. Métodos de propagación

1.9.1. Siembra, establecimiento y manejo de la plantación

M. oleifera puede propagarse mediante propagación sexual (por semilla) y asexual (empleando estacas o prendones). La forma más utilizada para plantaciones

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

es la sexual. Además puede usarse el método de siembra directa de las semillas en el sitio de plantación, especialmente cuando el objetivo es la producción de forraje (García, 2003).

Semillas: La siembra de la semilla se realiza manualmente a una profundidad de 2 cm. La germinación ocurre a los cinco o siete días después de sembrada; el control de malezas se realiza manualmente. La planta está lista para el sitio de plantación a las cuatro o cinco semanas de edad, en las cuales ha alcanzado una altura de 30 cm. y siete a ocho ramas (García, 2003).

El número de semillas por kilogramo varía de 4,000 a 4,800 y cada árbol puede producir entre 15 000 y 25 000 por año (FAO-OMS, 2005). La semilla no requiere tratamientos pregerminativos y presenta porcentajes altos de germinación, mayores que 90%. Sin embargo, cuando se almacena por más de dos meses disminuye su poder germinativo (Sharma y Rains, 1982).

Estacas: Se puede reproducir por estacas de 1 a 1.40 m de largo, como en el sur de la India, aunque para ser trasplantado en regiones áridas y semiáridas conviene obtener el árbol por semilla, porque produce raíces más profundas (Ramachandran *et al.*, 1980). En el caso de arboles obtenidos por estacas, los frutos aparecen a los seis meses después de plantados. Los árboles cultivados para forraje se podan para restringir el desarrollo de la copa y promover el crecimiento de nuevas ramas; después de cortados rebrotan vigorosamente y dan de cuatro a ocho renuevos por tocón (Pérez *et al.*, 2010). En el caso de los pequeños productores, se puede sembrar por estacas o en las cercas vivas para posteriormente cosechar los rebrotes, los que se deben cortar entre 35 y 45 días, en dependencia del régimen de precipitación y fertilización. La siembra se debe realizar en forma escalonada para disponer en todo momento de forraje fresco (Pérez *et al.*, 2010).

Problemática de métodos convencionales: Debido a su origen en los subtrópicos y trópicos, *M. oleifera* no es resistente a las heladas, por lo tanto es imposible cultivar este árbol en tierra abierta en las zonas templadas (García, 2003). El cultivo en invernadero es la única opción, aunque el árbol pierde sus hojas en invierno. Por esta razón, el material de la hoja no puede ser obtenida para experimentos hasta que los brotes aparecen de nuevo en primavera. Además, es susceptible a la infestación con gusano desfoliador (*Spodoptera spp.*), picudo abultado (*Phantomorus femoratus*), zompopo (*Atta spp.*), siendo este último el de mayor importancia económica. Para el

control de defoliadores y picudos se utilizan métodos manuales de eliminación ya que las poblaciones son bajas. Para el zompopo se realiza destrucción mecánica de madrigueras o zompoperas (García, 2003). Estos ataques de insectos causan un gran daño a la superficie foliar, lo que lleva a una disminución de la biomasa total. Debido a lo anterior es necesario contar con nuevas tecnologías que permitan obtener material vegetal durante todas las estaciones del año.

Cultivo *in vitro*: El cultivo de “tejidos *in vitro*” comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo, protoplasto, célula, tejido, órgano etc.) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad) controladas (Ramírez, 2003). Esta es una herramienta que permite la propagación de plantas en corto tiempo, lo que ayuda a mejorar y mantener la diversidad en muchas especies, asegurando la disponibilidad de materiales de siembra para los agricultores y los programas de mejora genética de las especies (Sánchez *et al.*, 2009).

El establecimiento de un cultivo *in vitro* de *M. oleifera* dará lugar a la producción de material vegetal sano y libre de bacterias, hongos, otras plagas de los animales, y los virus de todos los años. La rápida propagación de la planta se puede lograr utilizando medios de cultivo y fitohormonas específicas (Förster *et al.*, 2013). Esta técnica se divide en una serie de vías de aplicación las cuales se utilizan dependiendo del objetivo que se persiga.

Propagación clonal: es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas (Castillo, 2008).

Morfogénesis: es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los tres tipos citados. De Klerk *et al.* (1997), denominaron a estas diferentes fases como *adquisición de la competencia*; fase de *inducción* y fase de *realización*. En la primera fase, las células no responden al estímulo organogénico pero adquieren esa competencia durante una fase de desdiferenciación. En la segunda fase o fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa con el tipo, concentración y combinación de reguladores del

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

crecimiento vegetal agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar. En la fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado. A partir de la siembra *in vitro* de diferentes explantes relativamente grandes y en condiciones de cultivo adecuadas, puede inducirse la formación de nuevos órganos de manera directa, sin la formación de callo (Radice, 2010).

Embriogénesis directa: es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia (McKersie and Brown, 1996). Este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales (Freire, 2003).

Producción de callos o suspensiones celulares: Si por el contrario, a partir de la siembra de un explante *in vitro* se observa la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada (Radice, 2010).

Organogénesis: para la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, debido a que los medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa. La organogénesis indirecta, implica la producción masiva de plántulas a partir de la inducción de tejido calloso. La proliferación de callos desde un explante en particular, es el resultado de la activación mitótica de un pequeño grupo de células colocadas normalmente en la superficie de corte del explante (Anaya *et al.*, 2011). La regeneración *in vitro* de plantas mediante organogénesis directa (es decir sin la formación previa de callo) es altamente deseable en los trabajos de micropropagación y de conservación de germoplasma (Dolce *et al.*, 2004).

1.10. Variabilidad genética

La variación genética también llamada variación somaclonal se refiere a la variación que ocurre *in vitro* como *ex vitro* en cultivos celulares, de tejidos y órganos, así como en plantas regeneradas. La variación somaclonal generalmente es espontánea y los cambios pueden ser heredables o no (Kaepler *et al.*, 2000). Cuando

la variación somaclonal es heredable se le asocia con rearrreglos cromosomales, deleciones y mutaciones (Sánchez-Teyer *et al.*, 2003). Por otro lado, cuando la variación somaclonal es epigenética, puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable (Kaepler *et al.*, 2000), que puede estar asociado a alteraciones en los patrones de metilación del ADN (Kubis *et al.*, 2003). Es importante aclarar que durante el cultivo *in vitro* de plantas como: fresa (*Fragaria*), cítricos, papa (*Solanum tuberosum*) y manzana (*Malus domestica*), sufren de cambios hormonales y morfológicos temporales (como aparición o desaparición de espinas y ramificaciones, morfología de la hoja, etc.). Esto se debe al proceso de rejuvenecimiento, promovido en muchos casos por reguladores de crecimiento, y no a causa de variación somaclonal. La variación somaclonal puede ser utilizada como herramienta para inducir variabilidad genética y, en el mejor de los casos, obtener características agronómicas deseables (Araújo *et al.*, 2004). Esta técnica ha sido aplicada para generar variabilidad, especialmente en plantas con propagación vegetativa. Por otro lado, la variación somaclonal es indeseable en casos donde se desea mantener la uniformidad y características con valor agronómico. En estos casos es deseable reducir o, al menos, estimar la tasa de variación somaclonal. (Sahijram *et al.*, 2003). En relación a la influencia del tipo de sistema de cultivo *in vitro* empleado, cuando las plantas son regeneradas por micropropagación, la variación genética generada es mínima o nula, seguida por la embriogénesis somática y la organogénesis, que produce una mayor proporción de plantas con variaciones genéticas (Yang *et al.*, 1999).

Debido a los efectos que puede tener la variación somaclonal sobre la calidad de las plantas regeneradas, se han desarrollado numerosas técnicas para detectarla, siendo las más eficientes para este propósito aquellas que incluyen la utilización de marcadores moleculares.

1.11. Marcadores moleculares

Durante los últimos 20 años se han desarrollado diferentes técnicas moleculares que han sido utilizadas en estudios de evolución genética, poblaciones, ecología, mapeo genético, clonación de genes, etc. (Picca *et al.*, 2004). Muchas de estas técnicas moleculares han sido también una herramienta útil para detectar variación somaclonal de una manera más precisa y a nivel de ADN, así como para determinar niveles y los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal (Aravanopoulos, 2003).

Un marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación específica

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes o sin función conocida (Martínez *et al.*, 2010). Los marcadores de ADN son útiles tanto en la investigación básica (análisis filogenético y búsqueda de genes útiles) como en la aplicada (selección asistida por marcador, pruebas de paternidad y trazabilidad de los alimentos) (FAO, 2010). En la actualidad, se puede obtener un número prácticamente ilimitado de marcadores en cualquier organismo vivo que permiten analizar la totalidad de la información genética de un organismo (Martínez *et al.*, 2010).

Estos marcadores moleculares pueden clasificarse en función de la técnica empleada para la obtención de los segmentos de ADN: aquellos que se obtienen tras la fragmentación del genoma mediante enzimas de restricción, y aquellos que se obtienen por amplificación selectiva de secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction). En algunas técnicas se combinan estos dos procedimientos básicos (Pérez, 1997). Los polimorfismos obtenidos por el primer procedimiento son conocidos como polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, restriction fragment length polymorphisms) (Pérez, 1997).

Polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP): Son los marcadores moleculares más antiguos y aún son usados para algunas aplicaciones importantes como mapeo comparativo y estudios de sintenia entre especies (Martínez *et al.*, 2010). Se identifican usando enzimas de restricción que parten el ADN únicamente en puntos o sitios de restricción precisos (la enzima corta en el sitio definido por la secuencia palindrómica GAATTC) (FAO, 2010). Este marcador se basa en la comparación de perfiles de bandas generados a partir del ADN de distintos individuos por digestión con enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos se separan por su tamaño mediante electroforesis y se transfieren a una membrana donde son desnaturalizados y luego hibridados con una sonda (Botstein *et al.*, 1980). Esta sonda es un fragmento de ADN de cadena simple (de secuencia conocida o no) que está marcado radioactivamente. La sonda se unirá a aquellos fragmentos de restricción con secuencia complementaria a la misma; para la visualización, la membrana se expone a una placa radiográfica. En cuanto a la sonda empleada esta puede ser genómica o de ADNc o puede obtenerse a partir de ADN de organelos (mitocondrias o cloroplastos) (Martínez *et al.*, 2010).

Actualmente, el uso más frecuente de los RFLP es en combinación con la PCR (PCR-RFLP), para detectar alelos que difieren en secuencia en un sitio de restricción concreto. Primero se amplifica un fragmento de gen con la PCR, y luego se expone a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un enzima de restricción específico que corta solamente una de las formas alélicas. Los amplicones digeridos suelen resolverse mediante electroforesis. (FAO, 2010). Las ventajas de los RFLPs radican en que son altamente reproducibles, codominantes y multialélicos. Por otro lado, cuentan con las desventajas de ser muy laboriosos, difíciles de automatizar, se necesita disponer de las sondas para la especie en estudio y requieren de infraestructura adecuada para mantener las sondas y trabajar con radiactivo, lo que los hace relativamente costosos (Martínez *et al.*, 2010).

En el segundo procedimiento se utilizan cebadores particulares en cada caso para amplificar por replicación selectiva segmentos discretos de DNA. En ambos casos podemos visualizar polimorfismos de segmentos anónimos, cuya secuencia, función y naturaleza nos son desconocidas, o segmentos conocidos, genes conocidos o parte de ellos, secuencias repetidas, etc. (Pérez, 1997).

Microsatélites: Son regiones hipervariables del genoma que contienen arreglos de secuencias simples en tándem de mono, di, tri, tetra o pentanucleótidos que se repiten entre 10 y 100 veces (Martínez, *et al.*, 2010). Están diseminados por todo el genoma de los eucariotas. Los microsatélites son de un tamaño relativamente pequeño y, por consiguiente, pueden ser fácilmente amplificados con la PCR usando ADN extraído de fuentes diversas, como la sangre, el pelo, la piel e incluso las heces (Goldstein y Schlötterer, 1999; Jarne y Lagoda, 1996). Los polimorfismos se pueden visualizar en un gel secuenciador, y la disponibilidad de secuenciadores automáticos de ADN permite un análisis ultrarrápido de un gran número de muestras (Goldstein y Schlötterer, 1999; Jarne y Lagoda, 1996). El desarrollo de marcadores microsatélites requiere del conocimiento de las secuencias flanqueantes adecuadas para el diseño de los iniciadores específicos. Actualmente, las secuencias flanqueantes pueden obtenerse a partir de las secuencias depositadas en las bases de datos (búsqueda *in silico*) (Martínez *et al.*, 2010).

Polimorfismos por ampliación de la longitud del fragmento (AFPL): Son una técnica de identificación del ADN que detecta fragmentos de restricción de ADN mediante amplificación con PCR (FAO, 2010). Los marcadores AFLP constituyen una herramienta poderosa de análisis del genoma dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar (Martínez, *et al.*, 2010)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los AFLP consisten en la digestión completa del ADN genómico total con enzimas de restricción, seguida de la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos debidos a mutaciones en la secuencia de ADN en, o cerca de, los sitios de restricción. Los polimorfismos se detectan por electroforesis como un patrón de fragmentos de ADN amplificados (bandas) que difieren en número y tamaño, este patrón es altamente específico y debido a las restricciones de la técnica es altamente reproducible (Simpson, 1997).

ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD): Se generan mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para muestras de ADN genómico, usando oligonucleótidos construidos al azar como cebadores generalmente decámeros. Dado que la técnica es relativamente fácil de aplicar a una amplia gama de plantas y animales, y el número de loci que puede ser examinada es esencialmente ilimitado, los RAPDs tienen varias ventajas sobre los RFLP y huellas de ADN. Cuando los cebadores son de tamaño intermedio (del orden de 10 pares de bases), múltiples fragmentos amplificables (de diferentes loci) están generalmente presentes para cada conjunto de cebadores en cada genoma. Los fragmentos pueden ser separados por tamaño en un gel de agarosa estándar y se visualizan por tinción con bromuro de etidio, eliminando la necesidad de sondas radiomarcadas. Dado que los cebadores consisten en "secuencias al azar, y no discriminan entre las regiones codificantes y no codificantes, es razonable esperar que la técnica para muestrear el genoma más al azar que los métodos convencionales (Lynch y Milligan, 1994).

Los marcadores RAPD son útiles para el estudio de especies intraespecíficas, debido a su bajo costo y, sobre todo debido a que facilitan el estudio preliminar, que requiere un gran tamaño de muestra de cada población. RAPD huellas dactilares también se ha utilizado para los estudios de variación genética intraespecífica en las culturas de los micobiontes y fotobiontes (Lindblom y Ekman, 2006).

Polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMP): Como se define por Wu *et al.* (1994), combina las ventajas de los marcadores de microsatélites (SSR) y amplificación de ADN polimórfico al azar (RAPD). De acuerdo con los RAMPs, los oligonucleótidos 5' anclados complementarios de SSR se utilizaron en combinación con decámeros de secuencia arbitraria para amplificar fragmentos de ADN genómico, y la detección de polimorfismos de microsatélites sin clonación y secuenciación (Dávila *et al.*, 1998). Se ha demostrado previamente que los RAMP reflejan las genealogías de los cultivares más fielmente que los RAPDs y son particularmente aptos para las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

especies de plantas de antecedentes genéticos ambigua. Los RAMPs se han empleado en los estudios sobre la diversidad genética de la cebada, el melocotón y *Kengyilia* (Sánchez de la Hoz *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003). La principal ventaja de la técnica RAMP es que podría ser considerado un buen sistema de marcadores multilocus, fácil y reproducible de realizar y capaz de detectar altos niveles de polimorfismo (Avila-Treviño *et al.*, 2017), por lo anterior el marcador molecular RAMP fue elegido para nuestra investigación.



II. JUSTIFICACIÓN

La gran importancia tanto económica como nutricional y medicinal de *M. oleifera*, ha impulsado el ingreso a nuevos campos de investigación que permitan conseguir mejores resultados para la obtención de esta especie de una manera mas eficiente, con la finalidad de utilizarla en distintos objetivos. Una de las vías que se ha empleado para este propósito es el cultivo de tejidos *in vitro*, el cual ha resultado tener excelentes rendimientos para dicho fin. Sin embargo, el uso de diferentes reguladores de crecimiento en esta técnica puede provocar una variabilidad genética o cambios en sus atributos medicinales. Esta variación genética, en el mejor de los casos puede ser utilizada como herramienta para mejora genética y obtener características agronómicas deseables. En estos casos se requiere reducir o, al menos, estimar la tasa de variación. Por lo cual se ha buscado realizar análisis de la variabilidad genética de las plantas mediante el estudio de diferentes tipos de marcadores moleculares, debido a que ofrecen mejores resultados. Entre los marcadores moleculares utilizados con mayor frecuencia se encuentra los marcadores tipo RAMP, el cual combina las ventajas de los marcadores SSR y RAPD. Con esta técnica se ha demostrado que se reflejan las genealogías de los cultivares con mayor fidelidad que los RAPDs y son particularmente aptos para las especies de plantas de antecedentes genéticos ambiguos. Además de las variaciones somaclonales, surge el interés de evaluar la propiedad farmacológica hipolipidémica que ha sido reportada para esta especie. Esta actividad se ha evaluado en anteriores investigaciones, donde se ha demostrado respuestas positivas en la reducción de colesterol y triglicéridos en ratas. Sin embargo las respuestas no han sido tan significativas comparadas con los fármacos control, además no se han reportado directamente los compuestos relacionados con esta actividad.

Por lo tanto en este trabajo, se realizó una evaluación de la variabilidad genética de plántulas micropropagadas comparadas con una germinación convencional de *M. oleifera* para verificar si existía estabilidad genética entre los dos tipos de cultivos empleados para propagar *M. oleifera*, además de evaluar distintos extractos de *M. oleifera*, con la finalidad de aumentar la actividad hipo lipídica, y conjuntamente identificar los compuestos presentes en esta especie que estén relacionados con este efecto.

III. HIPÓTESIS

- Las plantas de *M. oleifera* generadas *in vitro* comparadas con las germinadas convencionalmente, tendrán variabilidad genética.
- Los extractos acuosos y de acetato de etilo de hojas de *M. oleifera* generarán una actividad hipo lipídica en ratas wistar hiperlipídicas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la variabilidad genética y algunos compuestos mayoritarios de interés medicinal de plantas de *Moringa oleifera* obtenidas por dos diferentes sistemas de propagación: *in vitro* (propagación y regeneración vía organogénesis indirecta) y *ex vitro* (germinación de semillas en sustrato).

Objetivos particulares:

- Establecer un sistema óptimo de propagación masiva y regeneración (vía organogénesis indirecta) *in vitro* de *M. oleifera*.
- Evaluar la variabilidad genética entre plantas de *M. oleifera* obtenidas por diferentes sistemas de propagación (propagadas, regeneradas y geminadas *ex vitro*) mediante el marcador molecular RAMP.
- Evaluar los efectos hipolipídicos de extractos de hojas de *M. oleifera* sobre ratas hiperlipídicas.
- Analizar fitoquímicamente algunos compuestos mayoritarios de interés medicinal en hojas de *M. oleifera*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Análisis de variabilidad genética entre plantas de *M. oleifera* cultivadas *in vitro* y en sustrato.

5.1.1. Material Vegetal y preparación del explante.

Se utilizaron semillas de árboles cultivados en Valle de Santiago, Guanajuato, México (1) y Tuxtepec, Oaxaca, México (2). Las semillas sin testa se desinfectaron en una solución de Hi-cleen más Tween 20 (Thermo Scientific, EE.UU.) durante 2 minutos, seguido por tres lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, se lavaron con una solución de 70% de etanol durante 3 min, y uno con una solución de 10% de cloro comercial durante 15 min. Por último, las semillas fueron finalmente enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron asépticamente en el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) que contenía 3% de sacarosa, 0.7% de agar (w/v) 5,7 pH, y se incubaron a 25 ± 1 °C en oscuridad hasta la germinación; posteriormente fueron puestos en un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad para el desarrollo de las plántulas.

5.1.2. Propagación clonal.

Se llevaron a cabo dos experimentos diferentes con el fin de evaluar el potencial de inducción de brotes y la multiplicación masiva. En el primer experimento, se cortaron los ápices que surgieron de la germinación de las semillas y se colocaron en un medio MS al 100% sin reguladores de crecimiento para inducir el desarrollo de nuevos brotes. De los nuevos brotes, se cortaron los nodos axilares y se colocan en MS al 100% a 25 ± 1 °C, con un fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad; este proceso se llevó a cabo durante cuatro ciclos de propagación. En el segundo experimento, la semilla germinó y se cortó el ápice de las plántulas, lo que llevó a la creación de nuevos brotes en el nodo cotiledonario. Posteriormente, se esperó a que cada brote desarrollara al menos cuatro nodos axilares, éstos se propagaron como se mencionó anteriormente; este proceso se llevó a cabo durante 12 meses.

5.1.3. Regeneración indirecta.

Se utilizaron como explantes segmentos de tallo y hojas generadas a partir de los métodos de propagación. Se prepararon diez diferentes tratamientos utilizando MS al 100% como medio basal, complementado con diferentes combinaciones y concentraciones de bencilaminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB) (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos para inducir organogénesis

Tratamientos	BAP (mg L ⁻¹)	IBA (mg L ⁻¹)	IAA (mg L ⁻¹)
T1	1	0.2	-
T2	1	3	-
T3	1	4	-
T4	3	0.2	-
T5	3	3	-
T6	3	4	-
T7	1	-	0.2
T8	1	-	3
T9	3	-	0.2
T10	3	-	3

Para cada tratamiento, los segmentos del tallo se colocaron en posición vertical y horizontal y las hojas en forma adaxial hasta la aparición de callos y brotes. Los brotes se transfirieron a MS al 100% sin reguladores de crecimiento para el enraizamiento. Las plántulas obtenidas tanto de la propagación clonal y de la regeneración, enraizaron en el medio basal MS sin reguladores de crecimiento, por lo que no fue necesario probar tratamientos para este fin.

5.1.4. Aclimatación.

Las plántulas enraizadas fueron separadas del medio y se lavaron con agua destilada para eliminar los residuos presentes en la raíz. Las plántulas enraizadas se colocaron en bolsas de plástico que contenían una mezcla de turba, abono y cal (Peat moos, PROMIX®). Las plantas se regaron, luego fueron cubiertas con bolsas de polietileno transparente. Las bolsas fueron perforados durante los primeros siete días, y después de esto se retiraron. Este procedimiento se realizó en el interior de la cámara de crecimiento bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

5.1.5. Germinación *ex vitro*.

Se tomaron semillas de las dos localidades y se les realizó un tratamiento previo en agua destilada durante 24 h; luego se sembraron en bandejas de germinación con una mezcla de turba, fertilizante y cal (Peat moos, PROMIX®).

5.1.6. Análisis estadístico.

Para la propagación múltiple, se registró el porcentaje de germinación y la media de brotes por semilla y explante. Se utilizó un diseño completamente al azar para la regeneración con cinco repeticiones de 20 explantes cada uno, fueron evaluados los brotes, nodos y longitud de explante y la diferencia entre los tratamientos con una prueba de rangos múltiples de Duncan, con el paquete estadístico GraphPad Prism 6.

5.1.7. Extracción de ADN.

16 muestras de hojas de plántulas de la propagación (cuatro ciclos de propagación), 8 muestras de regeneración, 2 de la germinación *ex vitro* y 2 controles de *Lippia graviolens* (Tabla 3), se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizan para la extracción de ADN siguiendo el protocolo de Murray y Thompson (1980) con algunas modificaciones. Para la cuantificación del ADN genómico, la absorbancia de las muestras de ADN se midió a 260 nm en un Nano Drop 1000 (Thermo Scientific). La calidad del ADN se analizó en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron bajo luz ultravioleta con un fotodocumentador (Gel lógica 212 PRO).

Tabla 3. Material vegetal utilizado en este estudio.

Denominación		Muestra	Localidad
1	MV1	Planta madre 1	Valle de Santiago, Gto.
2	PV1-1	Propagación	
3	PV1-2		
4	PV1-3		
5	MV-2	Planta madre 2	
6	PV2-1	Propagación	
7	PV2-2		
8	PV2:3		
9	MT3	Planta madre 3	Tuxtepec, Oaxaca.
10	PT3-1	Propagación	
11	PT3-2		
12	PT3-3		
13	MT4	Planta madre 4	
14	PT4-1	Propagación	
15	PT4-2		
16	PT4-3		
17	MV2	Planta madre 2	Valle de Santiago, Gto.
18	MV2-R1	Regeneración	
19	MT3	Planta madre 3	Tuxtepec, Oaxaca.
20	MT3-R1	Regeneración	
21	MT3-R2		
22	MT4	Planta madre 4	
23	MT4-R1	Regeneración	
24	MT4-R2		
25	G1	Germinación convencional 1	Valle de Santiago, Gto.
26	G2	Germinación convencional 2	Tuxtepec, Oaxaca.
27	A1	Control 1 <i>Lippia graviolens</i>	Ocotlan, Jalisco
28	A2	Control 2 <i>Lippia graviolens</i>	

^aMV: Planta madre.

^bPV1: Propagación Valle de Santiago (siembra 1).

^cPV2: Propagación Valle de Santiago (siembra 2).

^dPT1: Propagación Tuxtepec, Oaxaca (siembra 1).

^eR: Regeneración

^fG: Germinación.

5.1.8. Análisis RAMP.

Se evaluaron doce oligonucleótidos ISSR (Macrogen®) de los cuales se seleccionaron 4 que presentaron mayor número de amplificaciones. También se eligieron 15 oligonucleótidos RAPD; 3 al azar y 12 de la serie B Operon® (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, USA). Estos oligonucleótidos, fueron evaluados por separado con una muestra de ADN tomada al azar. Posteriormente se seleccionaron 12 RAPD y 4 ISSR (los que mostraron mayor número de bandas) (Tabla 4), y fueron analizados ahora utilizando 5 muestras elegidas al azar. Las combinaciones que obtuvieron mayor amplificación fueron utilizadas con las 28 muestras de ADN de hojas de *M. oleifera*.

Tabla 4. Oligonucleótidos seleccionados para el marcador molecular RAMP

Nombre	Oligonucleotidos RAPD	Nombre	Oligonucleotidos ISSR
A12	5`-TCGGCGATAG-3`	MO18	5`-(GA) ₆ A(AG) ₁₆ -3`
A16	5`-AGCCAGCGAA-3`	MO41	5`-(GA) ₁₀ -3`
A18	5`-AGGTGACCGT-3`	MO46	5`-(AG) ₅ (GA) ₆ -3`
OPB 1	5`-GTTTCGCTCC-3`	MO58	5`-(CT) ₆ T(TC) ₇ TT-3`
OPB 2	5`-TGATCCCTGG-3`		
OPB 3	5`-CATCCCCCTG-3`		
OPB 4	5`-GGACTGGAGT-3`		
OPB 5	5`-TGCGCCCTTC-3`		
OPB 6	5`-TGCTCTGCCC-3`		
OPB 7	5`-GGTGACGCAG-3`		
OPB 8	5`-GTCCACACGG-3`		
OPB 9	5`-TGGGGGACTC-3`		
OPB 10	5`-CTGCTGGGAC-3`		
OPB 11	5`-GTAGACCCGT-3`		
OPB 12	5`-CCTTGACGCA-3`		

*Se resaltan en negrita los marcadores RAPD seleccionados para las combinaciones finales.

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Techne TC-412 (Barloworld Scientific). Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 25 µL conteniendo 5 ng de ADN genómico, 2.5 µL de buffer de reacción 10X, 1.0 µL de oligonucleótido tipo RAPD (10 µM), 1 µL de oligonucleótido ISSR (10 µM), 1.25 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de dNTP mix (10 mM) y 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen), aforando con H₂O bidestilada ultrapura. Las condiciones de amplificación fueron: una

pre-desnaturalización a 94 °C por 1 min, seguida de 45 ciclos a 94 °C por 1 min, 40 °C por 1 min, 72 °C por 2 min y finalmente una extensión a 72 °C por 10 min. Las muestras se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con buffer TBE durante 3 h. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron bajo UV y se fotografiaron usando el fotodocumentador (Gel Logic 212 PRO).

5.1.9. Análisis de datos.

Todos los geles fueron evaluados para visualizar y registrar el número de bandas mono y polimórficas. Las bandas difusas o dudosas no fueron consideradas para el análisis. Se asumió que las bandas del mismo peso molecular en diferentes individuos son idénticas. La presencia de una banda se indicó con un uno (1) y la ausencia con un cero (0) y con estos datos se generó una matriz binaria que se evaluó posterior con el paquete estadístico POPGENE32 (Yeh *et al.*, 2000). Se estimaron los parámetros de polimorfismo a nivel de poblaciones con la matriz de datos de presencia/ausencia. Los parámetros genéticos evaluados a nivel de poblaciones fueron el porcentaje de loci polimórfico (P), el número de alelos por locus (N_a), el número efectivo de alelos por locus (N_e), el índice de Shannon (I) y el coeficiente de diversidad genética entre poblaciones (G_{ST}) y el índice de identidad genética (N_{ei}). El dendrograma de relaciones entre las muestras se construyó usando coeficientes de similitud de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

5.2. Actividad hipolipídica de extractos de hojas de *M. oleifera* en ratas hiperlipídicas.

5.2.1. Material vegetal y proceso de extracción.

Se utilizaron 400 g de material vegetal seco y en polvo, el cual se colocó en dos matraces Erlenmeyer (200 g cada uno) y se añadió 1.5 L de agua destilada, los matraces se colocaron en baño maría por 30 min a 60 °C. El extracto resultante se filtró y fueron reservados 50 ml que representaron el extracto íntegro (EI), este extracto íntegro fue separado en dos fases con la adición de acetato de etilo (extracto íntegro y acetato de etilo proporción 1:1). El extracto íntegro, la fase de acetato de etilo (AE) y la fase acuosa (A) fueron concentradas en un rotavapor a presión reducida. Para la experimentación farmacológica, fueron utilizadas las fases de acetato de etilo y acuosa.

5.2.2. Condiciones generales del estudio biológico.

Se utilizaron 40 ratas wistar (hembras) obtenidas del Bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los animales se alojaron en condiciones de laboratorio (humedad relativa 45-50, 21 °C de temperatura, y un periodo de luz oscuridad 12/12 h). Fueron alimentados con una dieta estándar de nutricubos y agua corriente, la dieta se administró "*ad lib*".

5.2.3. Etapa de adaptación.

Las ratas se desparasitaron (semana 1), y enseguida el alimento consumido se pesó cada 24 horas para estandarizar dicha cantidad (semana 2). Luego las ratas se dividieron en cinco grupos de cuatro individuos.

5.2.4. Inducción de hiperlipidemia.

Fue inducida en las ratas mediante una dieta hiperlipídica, la cual constó de croquetas de perro de la marca comercial Dog chao® adicionada con manteca de cerdo de la marca comercial San Francisco, que aportó un contenido energético de 134 kcal: proteínas 0 g, grasas totales 14.87 (de las cuales son 5.43 g de grasas saturadas) y manteca vegetal (la manteca animal y vegetal representó el 40% del total del alimento), durante 30 días, todas a excepción del grupo 1, al que se le adicionó una dieta normocalórica (nutricubos).

5.2.5. Dieta a base de extractos de *M. oleifera*.

Una vez que se constató el aumento de colesterol y triglicéridos en los cuatro grupos de ratas, se prosiguió con la alimentación mediante la dieta a base de las dos fases del extracto acuoso integro de hojas de *M. oleifera* (fase de acetato de etilo y fase acuosa). El grupo 1 se alimentó con una dieta normal (solo croquetas para roedores). El grupo 2 recibió la dieta hiperlipídica mas Pravastatina® y Benzafibrato® (fármacos utilizados para el control del colesterol y triglicéridos). El grupo 3 se alimentó solo con la dieta hiperlipídica. El grupo 4 recibió la dieta hiperlipídica, además de la fase de acetato de etilo. Y finalmente el grupo 5 se alimentó con la dieta hiperlipídica y la fase acuosa, todo lo anterior por 30 días.

5.2.6. Valoraciones químicas sérica.

Se determinaron en plasma los niveles de Colesterol Total (CT) y Triglicéridos (TG) por método enzimático (reactivo MexLab), empleando un espectrofotómetro Spectronic 20. Se realizó la lectura para los TG a 505 nm y para el CT a 510 nm. Las valoraciones químicas se efectuaron en 3 períodos. El primero corresponde al inicio del experimento para establecer niveles basales; el segundo después del régimen hiperlipídico y el tercero después del suministro de la dieta a base de las fases del extracto acuoso de hojas de *M. oleifera*.

5.2.7. Obtención de la muestra de sangre.

Se llevó a cabo previa anestesia superficial con éter; luego mediante punción en la vena caudal extrayendo 1 ml de sangre y se procedió a las determinaciones bioquímicas.

5.2.8. Análisis estadístico.

Se obtuvieron las diferencias significativas entre las medias comparadas mediante el análisis de varianza ANOVA, aceptando valores de $p < 0.05$, mediante el paquete estadístico GraphPad Prism 6.0.

5.2.9. Detección de fitoquímicos de *M. oleifera* relacionados con la disminución de Colesterol y Triglicéridos.

Una vez realizada la evaluación farmacológica de las dos fases del extracto integro de hojas de *M. oleifera*, fueron analizados el extracto íntegro, la fase de acetato de etilo y la fase acuosa con el fin de detectar los compuestos mayoritarios que están relacionados con la actividad hipocolesterolemica.

5.2.10. Separación por cromatografía en capa fina (CCF).

Se utilizaron placas de cromatografía de capa fina de gel de sílica 60F 254 (20 cm x 20 cm, 0,25 mm) de Merck (Darmstadt, Alemania). La placa de CCP se cortó a un tamaño de 4 cm x 4cm cm, donse se fijaron los tres extractos (íntegro, acuoso y de acetato de etilo), fueron analizados utilizando diferentes sistemas de elución, estándares y reveladores (Tabla 5). Con el fin de determinar el factor de retención (Rf) de los compuestos, la CCP se visualizó por irradiación después de tratamiento con una solución diferentes reveladores.

Tabla 5. Sistemas de elución, reveladores y estándares utilizados en CCP.

Fase Normal		
Sistema de elución	Reveladores	Estandar
Diclorometano-Metanol (95:5)	NP/PEG	Quercetina
Diclorometano-Metanol (85:15)		Rutina
Diclorometano-Metanol (85:15)	Sulfato cerico	Ácido Ursólico Glucósido de β -sitoesterol
N-butanol-Ác. acetico glacial-Agua (5:1:4)	NP/PEG	Glicina Glucosa
Fase Reversa		
Agua-Acetonitrilo-Ácido acetico glacial (7:3:0.3)	Ninhidrina	Glicina Glucosa

5.2.11. Análisis extractos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

El análisis cualitativo de los compuestos mayoritarios de los tres extractos (íntegro, acuoso y de acetato de etilo) de hojas de *M. oleifera*, se desarrolló mediante HPLC (Alliance), módulo de separación Waters 2695 equipado con un detector de conjunto de fotodiodos Waters 996 y el software Empower Pro (Waters Corporation, EE.UU.) (Cardenas-Sandoval *et al.*, Gomez-Aguirre *et al.*, 2015). Se utilizó una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm x 250 mm i.d., tamaño de partícula de 5 μ m) (Sigma Aldrich, Bellefonte, EUA). La fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El sistema de gradiente fue: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% de B, 4-20 min, 30% de B; 21-23 min, 50% B 14-15 min; 24-25 min, 80% de B; 26-27 100% B; 28-30 min, 0% B. El caudal se mantuvo a 0.9 ml por 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 10 μ l. La absorbancia se midió a 330 nm. Este analisis se realizó en el Departamento de Fitoquímica del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS).

Para realizar el analisis cuantitativo de dos flavonoides: Rutina y Quercetina, además de un fitoesterol: β -sitoesterol se realizó una estancia en Laboratorio de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Chihuahua. La cuantificación de los compuestos se realizó con la técnica de Emmons *et al.*, (1999) con ligeras modificaciones. Se utilizó un HPLC (Ultimate 300, EUA); se inyectaron 10 μL de muestras a una columna C_{18} (Agilent, EC-C18), usando un gradiente lineal de 1 a 30% de acetonitrilo durante un periodo de 40 min, con un flujo de 1.2 ml/min. Los compuestos se detectaron mediante la comparación de tiempos de retención de espectros obtenidos con estándares de rutina y quercetina, con un detector de diodos a 284 nm. Se preparo una mezcla de los dos estándares a una concentración de 10 ppm, en viales de 2 ml se colocaron 500 μL de muestra y se añadieron 500 μL de la mezcla de estándares, además se colocó un vial con 1000 μL de muestras sin estándar. Cada uno de los compuestos generó una curva de calibración, de la cual se obtuvo la ecuación de la recta que permite el cálculo de la concentración del analito. La concentración de cada uno de los compuestos se expresó en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de hojas de *M. oleifera*.

5.2.12. Fraccionamiento de extractos de *M. oleifera*.

Además del análisis por HPLC, de cada uno de los extractos, se realizó una separación mediante la técnica de cromatografía en columna, para obtener β -sitosterol, compuesto de interés relacionado con la disminución de los niveles de colesterol, anteriormente descrito para *M. oleifera*.

5.2.13. Obtención del material vegetal.

Se utilizaron semillas de *M. oleifera*, las cuales se sembraron en charolas de germinación (30 semillas por charola). Se trasplantaron plántulas de 10 cm de altura a bolsas negras de 2 kg, posteriormente se sembraron en surcos con 30 cm de distancia, las plantas fueron regadas semanalmente. Después de la primera floración, se colectaron las hojas.

5.2.14. Proceso de extracción.

Se utilizaron 400 g de material vegetal seco y en polvo para realizar el proceso de extracción, se colocó metanol y luego cloroformo a temperatura ambiente durante 24 horas, cada uno. El extracto resultante con cada disolvente, se filtró y concentró en rotavapor a presión reducida para dar un residuo semisólido. El rendimiento de cada extracto se obtuvo por la diferencia de pesos entre matraz vacío y con extracto seco.

5.2.15. Separación por cromatografía en capa fina.

Se realizaron CCP con las dos muestras de extracción (clorofórmica y metanólica), utilizando las fases móviles: a) Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13.5:10), b) Hexano-acetato de etilo (4:1), c) Cloroformo-Acetato de etilo (8:1), d) Cloroformo-Metanol (9:1), y revelado con luz UV 254 nm y UV 365 nm. Se visualizó por irradiación después de tratamiento con el revelador Anisaldehído (AS₃).

5.2.16. Fraccionamiento por cromatografía en columna.

El fraccionamiento del extracto clorofórmico (300 mg) se llevó a cabo en una columna de vidrio empacada con 9 g gel de sílica (0.063-0.200 mm). Se utilizaron sistemas de gradiente con disolventes orgánicos (hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol) como fase móvil (Tabla 6).

Tabla 6. Sistema de gradiente

Disolvente	Proporción
Hexano	100
Cloroformo-Hexano	50:50
Cloroformo	100
Acetato de etilo-Cloroformo	10:90
Acetato de etilo-Cloroformo	20:80
Acetato de etilo-Cloroformo	30:70
Acetato de etilo-Cloroformo	40:60
Acetato de etilo-Cloroformo	50:50
Acetato de etilo-Cloroformo	60:40
Acetato de etilo-Cloroformo	70:30
Acetato de etilo-Cloroformo	80:20
Acetato de etilo-Cloroformo	90:10
Metanol-Acetato de etilo	10:90
Metanol-Acetato de etilo	20:80
Metanol-Acetato de etilo	30:70
Metanol-Acetato de etilo	50:50
Metanol-Acetato de etilo	60:40
Metanol	100

Se colectaron fracciones de 10 ml cada una, las cuales se concentraron en un rotavapor a presión reducida, a una temperatura de 30 °C y se almacenaron a 8 ± 2 °C durante el experimento. El seguimiento del proceso cromatográfico fue monitoreado por cromatografía en capa fina, como fase móvil se utilizó Hexano-Acetato de etilo (90:10), Cloroformo-Metanol, Metanol-Agua (100:13.5:10), Metanol-Agua (100:13.5:10). Las placas se revelaron en una cámara de luz UV 254 nm y UV 365 nm, además con el reactivo Libermann para analizar la presencia de terpenos. Las fracciones se agruparon dependiendo de su parecido en el perfil cromatográfico.

VI. RESULTADOS

6.1. Análisis de variabilidad genética entre plantas de *M. oleífera* cultivadas *in vitro* y en sustrato

6.1.1. Germinación *in vitro* y propagación clonal.

El porcentaje de germinación *in vitro* fue de 84% y 76% para las localidades 1 y 2, respectivamente. La germinación se inició a 7 días después del cultivo en el medio MS al 100% (Fig. 3-A), se observó el desarrollo de raíz a los 9 días (Fig. 3-B) y la aparición de cotiledones a los 13 días (Fig. 3-C). La presencia de microorganismos fue mínima, lo cual no representó un problema para la germinación.



Figura 3. Etapas de la germinación *in vitro* de semillas de *M. oleífera*. (A) Germinación a los 7 días. (B) Germinación a los 9 días. (C) Germinación a los 13 días.

La propagación clonal a partir de ápices comenzó después de 8 días de la germinación de las semillas, estos fueron cortados y sembrados en el medio basal MS, una vez obtenidos cuatro segmentos nodales de cada ápice, se propagaron a medio basal nuevo (MS), esto se repitió hasta generar 4 ciclos de propagación para cada localidad. Se observó la mejor respuesta en los ápices de la localidad 2 (Tuxtepec, Oaxaca) que obtuvo la media más alta de brotación, alcanzando 6.5 ± 6 con un máximo de 29 brotes por explante (Fig. 4-A), en comparación con la primera localidad (Valle de Santiago, Guanajuato) que presentó una media de 3.6 ± 1 y un máximo de siete brotes por semilla, sin embargo la brotación múltiple no se presentó en todos los explantes, como se muestra en la Fig. 4-B, donde se muestra la generación de solo un brote.

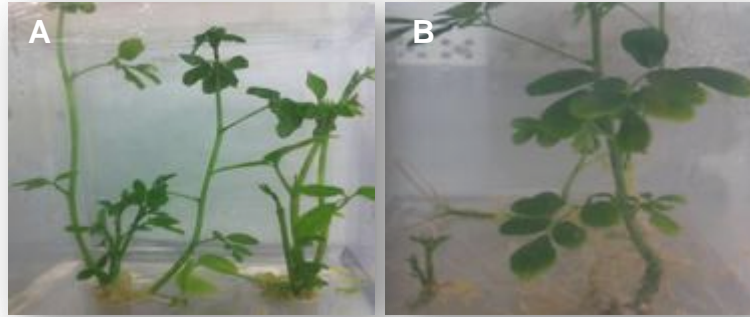


Figura 4. Brotación múltiple a partir de explantes ápices de semillas de *M. oleifera* cultivadas en el medio Murashige & Skoog (1962), sin reguladores de crecimiento.

Se realizó otra propagación a partir de los brotes del nodo cotiledonar, donde se observó la mejor respuesta para la localidad 2, que obtuvo la media de brotación más alta, presentando 13.6 ± 12 brotes por semilla (Fig. 5-B); mientras que, la localidad 1 tuvo una media de 6.2 ± 6 brotes por semilla (Fig. 5-A). Para esta etapa, también se logró el desarrollo de brotación múltiple, donde se obtuvo un máximo de 52 brotes a partir de una sola semilla en 30 días, resultados superiores a los observados en la propagación a partir de ápices. Esta respuesta se observó durante los constantes cortes realizados en las plántulas, a partir de las cuales se estimulaba la aparición de nuevos brotes; este comportamiento se amplió hasta 12 meses después de la germinación. Los brotes obtenidos de los experimentos anteriores mostraron un 100% de enraizamiento en medio MS al 100%.

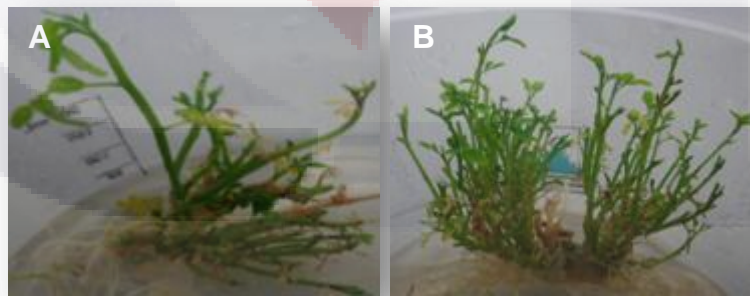


Figura 5. Brotación múltiple a partir del nodo cotiledonar de semillas de *M. oleifera* cultivadas en el medio Murashige & Skoog (1962).

6.1.2. Regeneración indirecta.

Se observaron las primeras respuestas después de siete días. Los explantes de tallo en posición vertical iniciaron el desarrollo de callo en la base del explante, de la que se desarrollaron nuevos brotes (Fig. 6-AB); a diferencia de los explantes en

posición horizontal, donde el callo se generó a lo largo del explante (Fig. 6-C). A partir de las hojas se obtuvo solo desarrollo de raíces (Fig. 7).



Figura 6. Regeneración vía organogénesis indirecta a partir de explantes de tallo. A y B: colocados en posición vertical. C: colocados en posición horizontal, cultivados en el medio MS adicionado con 3 mg L^{-1} BAP y 0.2 mg L^{-1} de IBA.



Figura 7. Regeneración vía organogénesis indirecta a partir de explantes de hoja, cultivados en el medio MS adicionados con 3 mg L^{-1} BAP y 0.2 mg L^{-1} de AIA.

Después de 30 días de iniciar los tratamientos, se realizaron mediciones donde se obtuvo una serie de respuestas significativas para las tres variables medidas: número de brotes ($p < 0.001$), número de nodos por explante ($p < 0.000$), y longitud de brotes ($p < 0.000$). El Tratamiento 7 (BAP 1 mg L^{-1} y AIA 0.2 mg L^{-1}), mostró la mejor respuesta significativa en términos de las tres variables, alcanzando una media de 1.9 y un máximo de 14 brotes por explante, y un 1.9 de segmentos internodales con una longitud máxima de 3.5 cm (Tabla 7); a diferencia del tratamiento 3 (BAP 1 mg L^{-1} y AIA 4 mg L^{-1}), que mostró una reducción en los resultados presentando una media de 0.2 ± 0.0 brotes por explantes. Los brotes obtenidos a partir de la regeneración mostraron un enraizamiento del 50%.

Tabla 7. Regeneración indirecta a partir de explantes de tallo y hoja de *M. oleifera*.

Tratamientos	Tallos				Hojas		
	Callos	Brotos	Nodos	Longitud	Callos	Brotos	Raiz
1	100%	0.3±0.1	0.6±0.3	0.2±0.1	100%	-	20%
2	100%	0.2±0.1	0	0	100%	-	-
3	100%	0.2±0.0	0.6±0.2	0.2±0.0	100%	1%	40%
4	100%	1.1±0.4	1.3±0.4	0.3±0.1	100%	-	-
5	100%	0.4±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1	100%	-	50%
6	100%	1.5±0.5	0.6±0.1	0.3±0.0.9	100%	-	80%
7	100%	1.9±0.8	1.9±0.6	0.7±0.02	100%	-	93%
8	100%	0.6±0.1	1.1±0.4	0.3±0.1	100%	-	-
9	100%	0	0.1±0.0	0.03±0.02	100%	-	30%
10	100%	0	0	0	100%	-	20%

^aValores representan la media ± SE.

^bPrueba de rangos múltiples de Duncan (Duncan 1955).

^cPorcentaje de desarrollo de callos y raíces de explantes de tallos y hojas.

^dExplantos de tallo en posición horizontal solo obtuvieron callo, sus resultados no se incluyen en la tabla.

6.1.3. Aclimatación.

El enraizamiento de todas las plántulas generadas *in vitro* se generó en medio MS (Fig. 8-A), las plántulas enraizadas se transfirieron a macetas que fueron colocadas en la cámara de crecimiento por dos semanas; luego se colocaron en el invernadero donde se obtuvo una tasa de supervivencia del 90% (Fig. 8-B).



Figura 8. Enraizamiento en plántulas de *M. oleifera*, cultivadas el medio Murashige & Skoog (1962), sin reguladores de crecimiento (A). Plántulas aclimatadas del sistema de propagación *in vitro* (B).

6.1.4. Germinación *ex vitro*.

El porcentaje de germinación de las semillas fue de 56% y 52% para las localidades 1 y 2, respectivamente. Las semillas germinaron quince días después de la siembra (Fig. 9-A). Estas fueron retiradas del semillero y se colocaron en macetas

que tenían el mismo sustrato que en la fase de aclimatación (Fig. 9-B). Después de 60 días de germinación, las plántulas tenían una longitud media de 14 cm (Fig. 9-C).



Figura 9. Plantas de *M. oleifera* obtenidas mediante germinación convencional. A: Germinación de las semillas de *M. oleifera* a dos semanas de la siembra. B: Plantas trasplantadas a bolsas individuales a cuatro semanas de la siembra. C: Plantas a seis semanas de la germinación.

6.1.5. Análisis RAMP.

A partir de los 15 oligonucleótidos RAPD y 12 ISSR que fueron evaluados, se seleccionaron finalmente 7 oligonucleótidos, 1 tipo ISSR y 6 RAPD (Tabla 8), debido a que obtuvieron el mayor patrón de bandeo. De los siete oligonucleótidos, se generó un total de seis combinaciones y se utilizaron para caracterizar la variabilidad genética de la planta madre, los ciclos de propagación y de regeneración (Fig. 10).

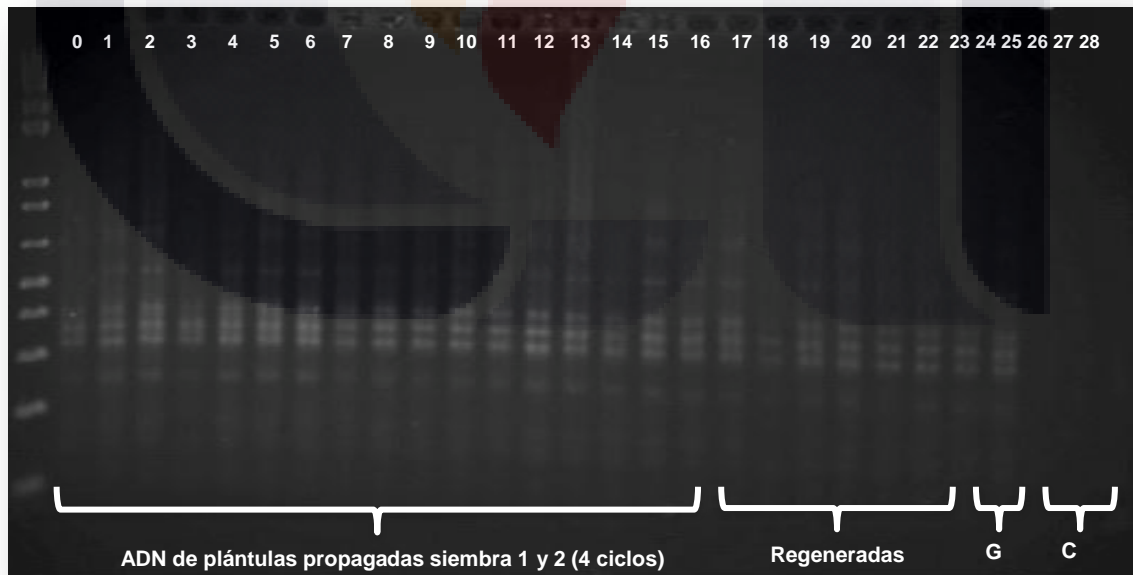


Figura 10. Electroforesis de muestras de ADN de *M. oleifera* (combinación OPB-08 y M046), carril 0: marcador de peso molecular, carril 1 al 16: ADN de plántulas propagadas (cuatro ciclos de propagación), carril 17 al 24: ADN de plántulas regeneradas (organogénesis indirecta), carril 25 y 26: ADN de plántulas germinadas en sustrato (localidad 1), carril 27 y 28: controles (*Lippia graveolens*).

Estas seis combinaciones fueron probadas con las 28 muestras totales (Tabla 3) y generaron un total de 58 bandas, con una media de 9.5 bandas con un rango de entre 2 a 18 por combinación de oligonucleótidos. De las 58 bandas, se obtuvo un total de 42 bandas monomórficas (72.5%), las cuales produjeron entre 1 y 18 bandas monomórficas por combinación de oligonucleótidos, con una media de siete (Tabla 8), presentando un 0.37 de diversidad genética y 0.0677 de coeficiente de diversidad genética entre poblaciones. Todas las bandas de las 28 muestras se utilizaron para calcular el coeficiente de similitud Jaccard. El valor de similitud de los 28 individuos osciló entre 0.000 y 0.168 con un promedio de 0.049. El valor del índice de Shannon varió de 0.27 a 0.69 con una media de 0.54. En general, hubo poca diferencia genética entre las diferentes muestras de los cuatro ciclos de propagación y regeneración con respecto a las plantas madre, mientras que hubo una pequeña diferencia genética entre estas y las germinadas de forma convencional.

Tabla 8. Lista de combinación de oligonucleótidos y resultados de amplificación

Combinaciones	Total de bandas	Bandas molimórficas
A12 + M046	8	3
OPB-2 + M046	10	5
OPB-4 + M046	2	1
OPB-7 + M046	19	18
OPB-8 + M046	12	8
OPB-10 + M046	7	7

Las relaciones genéticas entre las 26 muestras de *M. oleifera* se analizaron mediante el método UPGMA, tal y como se muestra en el dendrograma de la Figura 11, donde las diferentes muestras de los cuatro ciclos de propagación y regeneración y las plantas madre se relacionan principalmente en dos grupos; con exclusión de las muestras de la germinación convencional, una propagación de un ciclo de la localidad 1 (Valle de Santiago, Guanajuato) y una regeneración que pertenecía a la localidad 2 (Tuxtepec, Oaxaca), dejando a los controles (*Lippia graveolens*) como un ancla para el dendrograma.

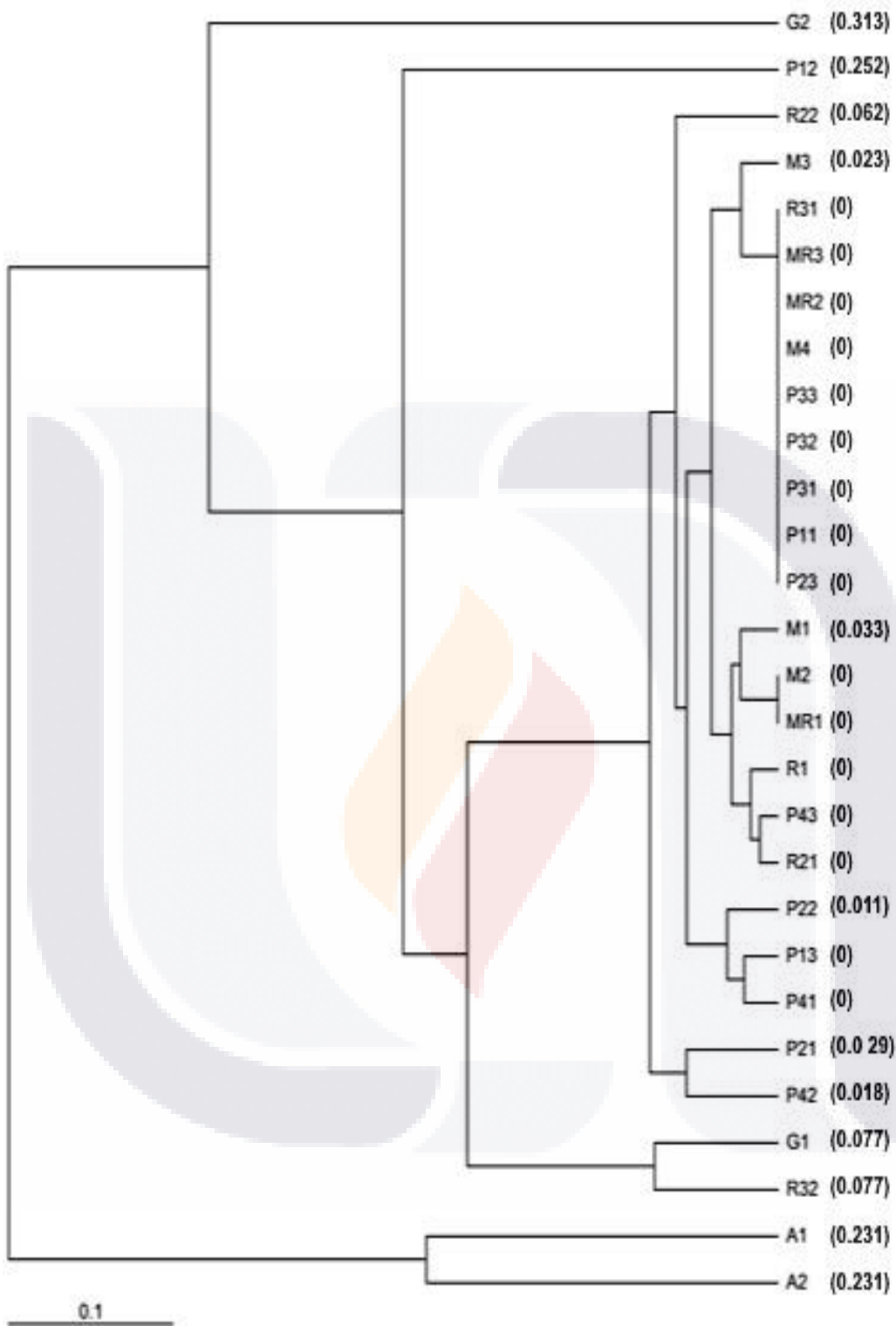


Figura 11. Dendrograma obtenido del análisis estadístico para individuos de *M. oleifera*. Se observan los controles (*Lippia graveolens*) totalmente separados de los clados donde se agrupan las muestras de las plantas madre con sus cuatro ciclos de propagación y regeneración, así como las germinadas *ex vitro*.

6.2. Actividad hipocolesterolémica de extractos de hojas de *M. oleifera* en ratas inducidas con colesterol.

6.2.1. Inducción de hiperlipidemia.

La hiperlipidemia experimental en ratas se asoció con un aumento en el perfil de lípidos en suero. A los 30 días del tratamiento con la dieta hiperlipídica, se observó que en todos los grupos excepto el 1 (control: dieta normal sin grasas), hubo un incremento de Colesterol Total (CT) y Triglicéridos (TG) con respecto al nivel basal (Figura 12 y 13).

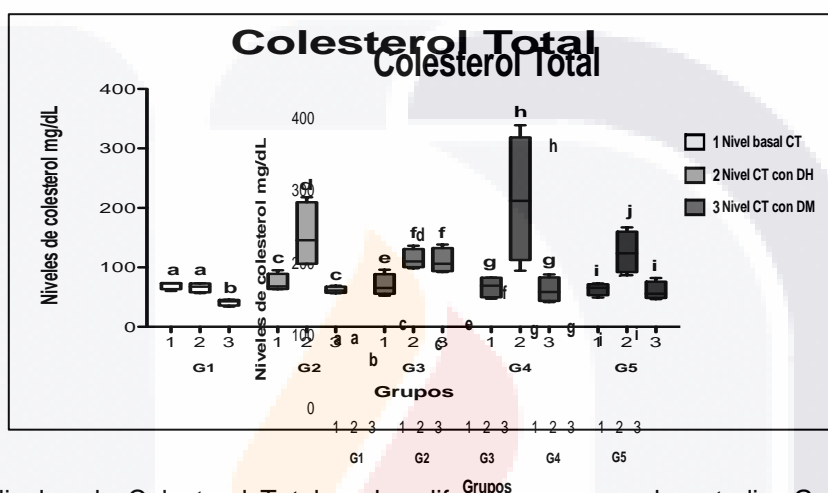


Figura 12. Niveles de Colesterol Total en los diferentes grupos de estudio. Grupo 1: dieta normal. Grupo 2: dieta hiperlipídica más Pravastatina® y Benzafibrato®. Grupo 3: dieta hiperlipídica. Grupo 4: dieta hiperlipídica más fase de acetato de etilo. Grupo 5: dieta hiperlipídica más fase acuosa. Las cajas representan el error típico de las medias (Medias, n=4, con letras desiguales son estadísticamente diferentes, Tukey, 0.05). CT: Colesterol Total. DH: Dieta Hiperlipídica. DM: Dieta con extractos de moringa.

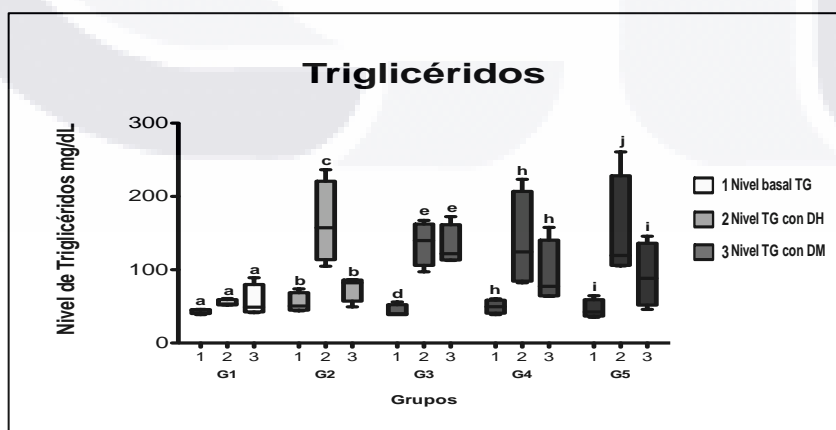


Figura 13. Niveles de Triglicéridos en los diferentes grupos de estudio. Grupo 1: dieta normal. Grupo 2: dieta hiperlipídica más Pravastatina® y Benzafibrato®. Grupo 3: dieta hiperlipídica. Grupo 4: dieta hiperlipídica más fase de acetato de etilo. Grupo 5: dieta hiperlipídica más fase acuosa. Las cajas representan el error típico de las medias (Medias, n=4, con letras desiguales son estadísticamente diferentes, Tukey, 0.05). TG: Triglicéridos. DH: Dieta Hiperlipídica. DM: Dieta con extractos de moringa.

6.2.2. Dieta a base de extractos de *M. oleifera*.

Luego de 30 días con las dietas de extractos de hoja de *M. oleifera* en los grupos 4 (fase de acetato de etilo), grupo 5 (fase acuosa) y grupo 2 (Pravastatina® y Benzafibrato®), se observó una reducción tanto en los niveles de Colesterol Total, como en los de Triglicéridos. El tratamiento a base del extracto de la fase acuosa de hojas de *M. oleifera* administrada a el grupo 4, redujo significativamente ($p < 0,001$) los niveles de CT y TG con respecto a los niveles que presentaron en la dieta hiperlipídica (reducción de 71.2% y 32.2%, respectivamente), al igual que el tratamiento a base del extracto de la fase acuosa para el grupo 5, obtuvo una disminución significativa ($p < 0,001$) de los niveles de CT y TG con respecto a los niveles de la dieta hiperlipídica (reducción de 52.1% y 39.2%, respectivamente). Mientras que para los tratamientos a base de fármacos, se observó también una reducción significativa ($p < 0,001$) (disminución de 59.72% y 54.3%, respectivamente). Este tratamiento obtuvo una actividad similar en la reducción de CT como de TG, sin embargo en comparación con el tratamiento que se le suministró al grupo 4 a base de la fase de acetato de etilo, la disminución de los fármacos fue menor en el caso del CT (Figura 12 y 13).

Detección de compuestos relacionados con la disminución de CT y TG:

6.2.3. Separación por CCF.

En el primer análisis de separación de compuestos mediante la fase móvil Diclorometano-Metanol (95:5) y (85:15), revelados con NP/PEG, se observó la presencia de flavonoides. En la figura 14, se observa la tonalidad amarilla, la cual corresponde a presencia de flavonoides, en el caso de la figura 14-A se observa el flavonoide Quercetina (Rf: 0.28), en el extracto íntegro. En las figuras 14-B, se compararon los extractos con el estándar Rutina (Rf: 0.54), en fase reversa.

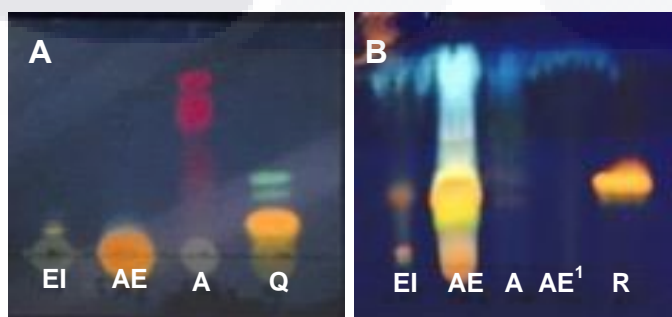


Figura 14. Análisis de los flavonoides Quercetina (Q) y Rutina (R) de los extractos íntegro (IE), acetato de etilo (AE), acuoso (A), observados con el revelador NP/PEG, con los diferentes estándares y fases móviles: A) Diclorometano-Metanol (95:5), estándar: Quercetina (Q). B) Diclorometano-Metanol (85:15), estándar: Rutina (R). AE¹: Dilución de extracto de acetato de etilo.

En la figura 15, se puede observar ácido ursólico, con Rf: 0.28 (compuesto que pertenece al grupo de los terpenos), en el extracto acuoso y de acetato de etilo. Además de la presencia de glucósido de β -sitoesterol (Rf: 0.28) en el extracto acuoso y acetato de etilo que se observa en la figura 16. Finalmente los compuestos Glicina y Glucosa, la Glicina se observa en la Figura 17-B en los extractos íntegro y acuoso separados en fase reversa. Y Glucosa se presenta en la figura 17-A también en los tres extractos.



Figura 15. Análisis de los extractos íntegro (EI), acetato de etilo (AE) y acuoso (A), estándar: ác. ursólico (AU), en la fase móvil Diclorometano-Metanol (85:15), con el revelador Sulfato cérico, observado en UV 365 nm. A¹: dilución de extracto acuoso.



Figura 16. Análisis de los extractos íntegro (EI), acetato de etilo (AE) y acuoso (A), estándar Glucósido de β -sitoesterol (G β -S), en la fase móvil Diclorometano-Metanol (85:15), con el revelador Sulfato cérico, observado UV 365 nm. AE¹: Dilución de extracto de acetato de etilo.

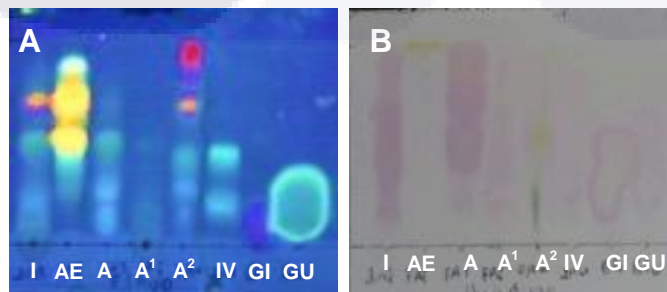


Figura 17. Análisis de los extractos íntegro (EI), acetato de etilo (AE) y acuoso (A), estándares: Glicina (GI) y Glucosa (GU), en la fase móvil A) n-butanol-ácido acético glacial-Agua (5:1:4), revelador: NP/PEG, observado en UV 365 nm. B) Fase reversa: Agua-Acetonitrilo-ácido acético glacial (7:3:0.3), revelador Ninhidrina observado en UV 365 nm. A¹: dilución de extracto acuoso y A²: muestra de extracto acuoso de HPLC. IV: Extracto de planta *in vitro*.

6.2.4. Evaluación de extracto acuoso por HPLC.

A partir de este análisis se obtuvieron los posibles compuestos encontrados en los diferentes extractos. En cuanto al extracto integro (EI) se obtuvieron espectros posiblemente pertenecientes a algunos cafeatos observados en un tiempo de retención de 7.551, flavonas (posible vitexina) con un tiempo de retención de 8.705, glucósido de quercetina en 9.613 y quercetina con 9.973 (Figura 18-A).

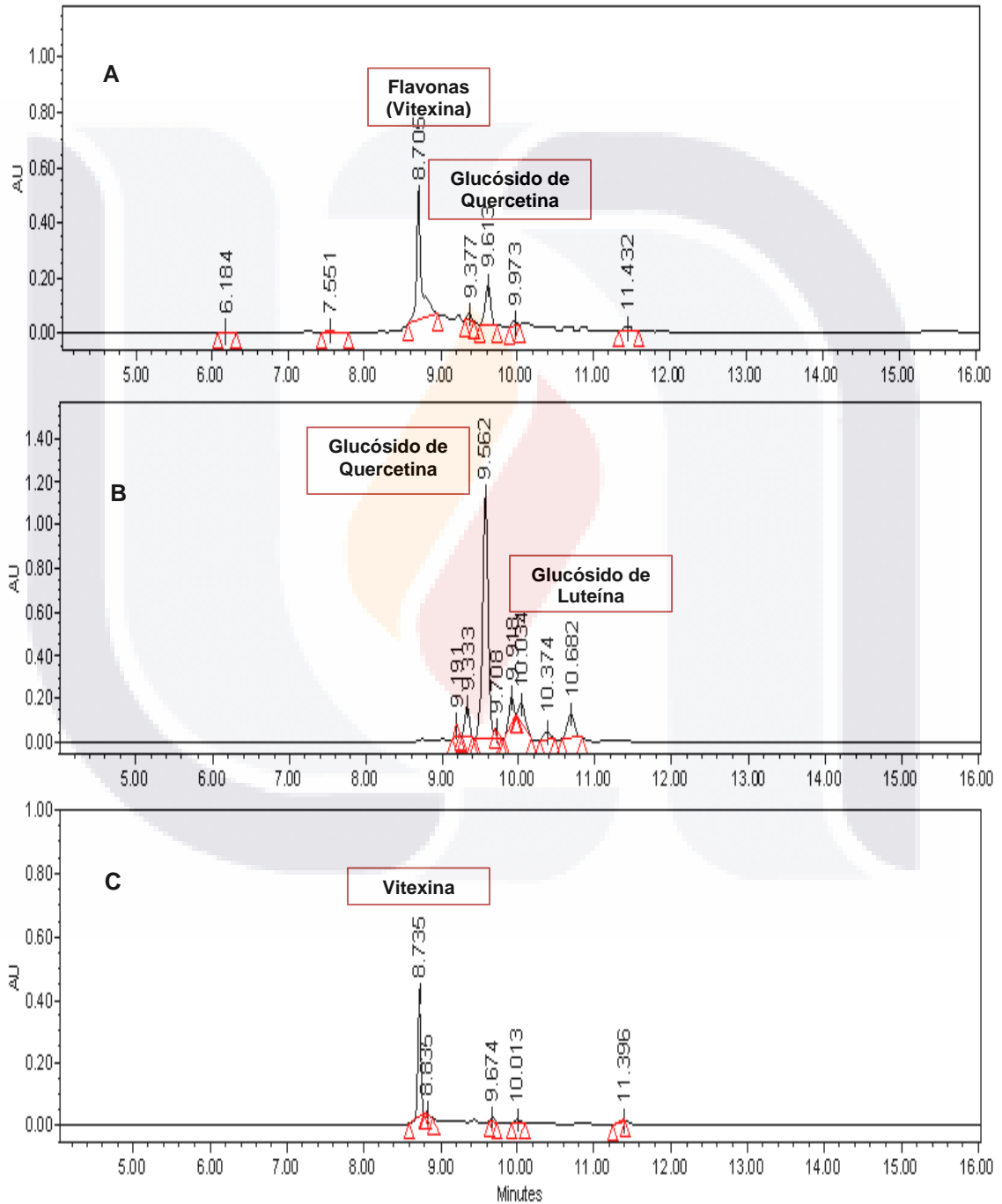


Figura 18. Análisis por HPLC de los diferentes extractos: A) Extracto Integro, B) Extracto de acetato de etilo, C) Extracto acuoso.

En el extracto de acetato de etilo (AE), se observan principalmente flavonoides como glucósido de quercetina en un tiempo de retención de 9.562 y glucósido de luteína en un tiempo de retención de 10.682 (Figura 18-B). Para el extracto acuoso (A) sus compuestos mayoritarios también fueron flavonoides posible presencia de vitexina, en un tiempo de retención de 8.735 (Figura 18-C). Y finalmente el extracto acuoso de plantas *in vitro*, se encontró la presencia solamente cafeatos con tiempos de retención de 7.540 y 8.797. En cuanto a la cuantificación de los compuestos fitoquímicos de hojas de *M. oleifera* relacionados con la actividad antihiperlipemiente, se observó una mayor concentración de Quercetina y Rutina en el extracto de acetato de etilo, seguido por el extracto integro, y finalmente las menores concentraciones se observaron a partir del extracto acuoso (Tabla 9).

Tabla 9. Cuantificación de Rutina y Quercetina de hojas de *M. oleifera*.

Extractos	Rutina	Quercetina
Íntegro	10.51± 1.18	1.11± 0.03
Acuoso	9.14±0.08	0.07±0.01
Acetato de etilo	62.29±0.72	4.36±0.1

Fraccionamiento por cromatografía en columna

6.2.5. Proceso de extracción y rendimiento de extractos.

A partir de los diferentes extractos se obtuvo un rendimiento de 9.27 % para Metanol, 14.48 % para Cloroformo.

6.2.6. Perfil cromatográfico.

Los extractos clorofórmicos mostraron una mejor separación que los compuestos metanólicos (Figura 19), por lo cual se utilizó ese extracto para realizar la CC.

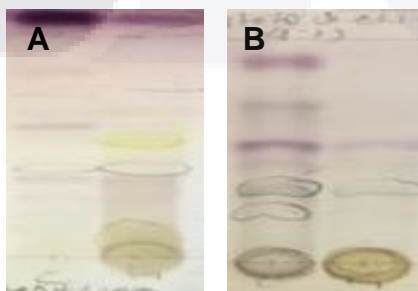


Figura 19. Análisis de los extractos clorofórmico y metanólico en las fases móviles: A) Hexanoacetato de etilo (4:1) y B) Cloroformo-Metanol (9:1).

6.2.7. Fraccionamiento por Cromatografía en Columna.

Se obtuvo un total de 47 fracciones (Tabla 10), las cuales fueron reagrupadas en 22 finales tomando en consideración el patrón cromatográfico en CCF.

Tabla 9. Total de Fracciones obtenidas por los diferentes sistemas de elución.

Fracciones	Sistema de elución	Proporción	Nomenclatura	Rendimiento (%)
1	Hexano	100	F1	0.05
2	Cloroformo:Hexano	(50:50)	F2	0.05
3-5	Cloroformo:Hexano	(50:50)	F3	0.03
6	Cloroformo	100	F4	0.03
7-9	Cloroformo	100	F5	0.05
10	Acetato-Cloroformo	(10:90)	F6	0.01
11	Acetato-Cloroformo	(10:90)	F7	0.02
12	Acetato-Cloroformo	(10:90)	F8	0.01
13-22	Acetato-Cloroformo	(20:80) (20:80) (20:80) (20:80) (20:80) (30:70) (30:70) (30:70) (30:70) (40:60)	F9	0.08
23	Acetato-Cloroformo	(40:60)	F10	0.03
24	Acetato-Cloroformo	(40:60)	F11	0.01
25	Acetato-Cloroformo	(50:50)	F12	0.08
26-28	Acetato-Cloroformo	(50:50)	F13	0.05
29	Acetato-Cloroformo	(60:40)	F14	0.02
30-36	Acetato-Cloroformo	(60:40) (70:30) (80:20)	F15	0.09
37-38	Acetato-Cloroformo	(80:20) (90:10)	F16	0.05
39	Acetato-Cloroformo	(90:10)	F17	0.05
40-41	MeOH-Acetato de etilo	(10:90)	F18	0.07
42-43	MeOH-Acetato de etilo	(20:80)	F19	0.02
44	MeOH-Acetato de etilo	(30:70)	F20	0.08
45	MeOH-Acetato de etilo	(50:50)	F21	0.06
46-47	MeOH-Acetato de etilo	(60:40)	F22	0.02
	MeOH	100		

En la figura 20 se muestra la diversidad de compuestos presentes en las 22 fracciones obtenidas mediante el análisis en CCF. Se puede observar la presencia de compuestos de naturaleza terpénica así como flavonoides, debido a que varias fracciones tomaron una coloración purpura y amarilla-naranja con el agente cromógeno Liebermann. Además en la figura 21 se observa el compuesto β -sitoesterol (Rf: 0.75), encontrado en la fracción 7.

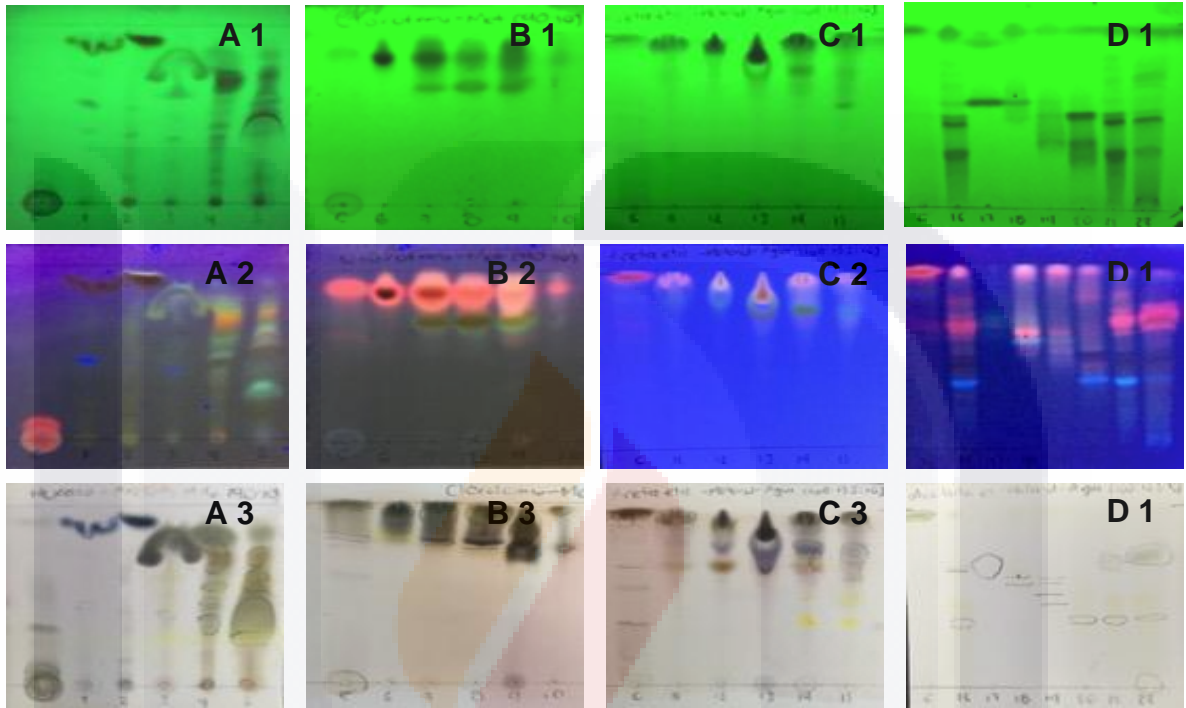


Figura 20. Análisis de las diferentes fracciones del extracto clorofórmico, observadas con el revelador Liebermann, en las diferentes fases móviles: A) Fracciones 1 a la 5 en la fase móvil Hexano-Acetato de etilo (90:10). B) Fracciones 5 a la 10 en fase móvil Cloroformo-Metanol (90:10). C) Fracciones 11 a la 15 en fase móvil Metanol-Agua (100:13.5:10). D) Fracciones 16 a la 22 en fase móvil Metanol-Agua (100:13.5:10). Los números 1: se observan bajo UV254 nm, 2: UV 365 nm y 3: con el revelador Liberman.

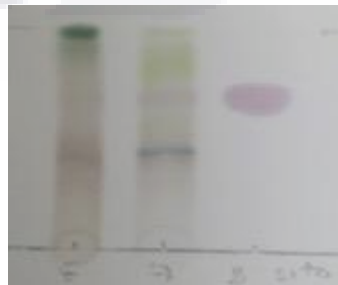


Figura 21. Análisis de las fracciones 6 y 7 del extracto clorofórmico, comparado con el estándar β -sitoesterol, en la fase móvil Cloroformo-Metanol (90:10). Observado con el revelador Liebermann

VII. DISCUSIÓN

En los últimos años la propagación de *M. oleifera* ha tomado mayor relevancia dado sus potenciales nutricionales y medicinales, lo cual genera la necesidad de buscar nuevas alternativas para la propagación de esta planta de una manera mas eficaz. Por tal motivo, en este estudio se implementó un sistema de propagación *in vitro* de *M. oleifera*, con el objetivo de utilizarla en diferentes investigaciones durante todo el año. Se probaron dos protocolos de multiplicación *in vitro*: propagación clonal y regeneración indirecta, y además una germinación convencional realizada en sustrato, y posteriormente un análisis de la estabilidad genética de los tres sistemas. Los resultados del porcentaje de germinación *in vitro* de semillas de *M. oleifera* fueron de 84% y 76% para las localidades 1 (Valle de Santiago Guanajuato) y 2 (Tuxtepec, Oaxaca), respectivamente (Fig. 3). Estos resultados difieren de los encontrados por Förster *et al.*, (2013), quienes mencionaron que, debido al mayor grado de contaminación, no fue posible establecer un cultivo *in vitro* de estas semillas utilizando hipoclorito de sodio para la desinfección. La respuesta de germinación *in vitro* en comparación con la germinación convencional en nuestra especie de estudio no ha sido evaluada previamente. Sin embargo, existen investigaciones sobre especies relacionadas, donde se observan mejores resultados cuando se utiliza la técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, esto fue reportado por Bhattacharya y Khuspe (2001), quienes en su estudio con *Carica papaya* L. observaron la diferencia entre la germinación de semillas *in vivo* e *in vitro*. Las condiciones *in vitro* aumentaron la tasa y velocidad de la germinación de la semilla en todos los cultivos, logrando una germinación media máximo de 95.5% después de 7 a 8 días en un medio MS suplementado con TDZ (1.0 M L^{-1}). En nuestro estudio referente a la germinación *in vitro* en el medio basal no se utilizaron reguladores de crecimiento, en cambio Bhattacharya y Khuspe (2001) utilizaron el mismo medio MS mas diferentes reguladores, sin embargo obtuvieron un menor porcentaje de germinación, por lo cual nuestros resultados indican que hubo mayor efectividad por la obtención de un mayor porcentaje de germinación y se reducen costos al no utilizar RCV.

Para la propagación masiva, se utilizaron dos fuentes de explantes: la primera fue yemas apicales a partir de a semilla y colocados en MS sin RCV. El cultivos de los ápices se obtuvo una media de brotes de 6.5 ± 6 y un máximo de 29 brotes por explante (Fig. 4). Para la segunda fuente, mediante los brotes de nodos cotiledonarios obtuvo el promedio de brotes más alto de 13.6 ± 12 , con un máximo de 54 yemas por semilla (Fig. 5). Los resultados observados en el número de brotes de propagación es mayor a los reportados por Förster *et al.*, (2013), quienes trabajaron también con *M.*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

oleifera, donde obtuvieron una media de 4.1 brotes, pero en un medio MS suplementado con diferentes concentraciones de BAP. Sin embargo, Stephenson y Fahey (2004), en su estudio de los métodos de cultivo de tejidos para el rescate y la propagación de especies de Moringa en peligro de extinción obtuvieron una tasa media multiplicación de sólo 4.7 brotes por cultivo en un medio MS sólido o líquido suplementado con 1 mg L⁻¹ de BAP. En contraste con estos resultados, en esta investigación se presentó un promedio de 13.6 brotes, con un máximo de 54 brotes por semilla (Figura 5-B); se observó esta respuesta al realizar podas a partir del nodo cotiledonal, lo cual produjo la formación de nuevos brotes. Sin embargo, este comportamiento tiene un tiempo de acción limitada, que en este caso fue de aproximadamente 12 meses. Este comportamiento ya fue mencionado por Förster *et al.*, (2013), con la diferencia de que en su estudio, mencionaron un retardo de propagación de tan sólo 3 semanas.

Otra de las vías de micropropagación *in vitro* es la regeneración, la cual puede ser directa e indirecta, dependiendo de los objetivos de cada investigación. En este caso fue implementado un sistema de regeneración indirecta, donde se probaron varios tratamientos, utilizando como medio basal medio MS, utilizando diferentes RCV y concentraciones (Tabla 2). El mejor tratamiento fue el 7 BAP (mg L⁻¹) y AIA (0,2 mg L⁻¹), que obtuvo una mejor respuesta: con una media de 1.9 y un máximo de 14 brotes por explante con una longitud máxima de 3.5 cm (Fig. 6). Estos resultados mostraron menor número de brotes, con los reportados por Gayathri *et al.*, (2015), quienes evaluaron la regeneración *in vitro* *M. oleifera* con el mismo medio (MS) pero con un tratamiento de fitohormonas extracelular de MBDU 515 *Aphanothece* sp., y otro usando MS complementado con BAP (1 y 2 mg L⁻¹). Para el primer tratamiento, obtuvieron un 90% de la inducción de brotes y para el segundo un 75%, lo que representa un porcentaje más alto que el que se presenta en nuestros resultados (Tratamiento 7 con un 45%). La menor cantidad de brotes por explantes de tallo (posición vertical) podría estar asociada a las diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (BAP, IBA y AAI). Esta respuesta también fue reportado por Ibrahim *et al.*, (2008), quienes evaluaron el efecto de los reguladores del crecimiento en el cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana*. En el caso de la aplicación 1 mg L⁻¹ BA, se registró el número de brotes más alto, pero eran muy delgados y vitrificados, lo cual no era adecuado para la multiplicación. Se observó esta misma respuesta en nuestros tratamientos, los brotes fueron largos y muy delgados, y con el tiempo mostraron vitrificación. Ibrahim *et al.*, (2008) obtuvieron los mejores resultados en un

medio nutritivo MS sin reguladores de crecimiento; o en el caso IBA a bajas concentraciones (0.01 mg L^{-1}), o incluso sin auxinas.

Un resultado interesante que se obtuvo con el tratamiento 7, pero utilizado como explante hojas fue la generación de raíces (Fig. 7), esto es importante ya que estas raíces se pueden propagar y obtener diferentes metabolitos de interés, que hasta la fecha no se ha encontrado en la literatura información sobre esto. Todas las plantas generadas *in vitro*, se trasplantaron a MS son RCV, donde enraizaron al 100 % (Fig. 8-A). Posteriormente fueron colocadas en sustrato para realizar la aclimatación, la cual obtuvo un 90% de supervivencia (Fig. 8-B). Por último la germinación en sustrato

El inconveniente más significativo que puede ocurrir durante la propagación *in vitro*, es la presencia de la variación somaclonal entre las plantas micropropagadas. Por lo tanto, se realizó un análisis molecular tipo RAMP para evaluar la estabilidad genética de plántulas de *M. oleífera* generadas mediante multiplicación *in vitro* comparadas con una germinación convencional (Fig. 10). Los análisis de variabilidad sugieren que los brotes proliferados podrían ser utilizado para la propagación clonal con un riesgo mínimo para producir variantes somaclonales, esto se puede observar en el dendrograma (Fig. 11), que muestra la cercanía entre las muestras de los diferentes sistemas de propagación. Se han realizado diferentes análisis de marcadores moleculares para *M. oleífera*; sin embargo, estos estudios están dirigidos sobre todo para poblaciones silvestres (Saini *et al.*, 2013; Shahzad *et al.*, 2013; Smit *et al.*, 2013; Ganesan *et al.*, 2014). En el caso de micropropagación de *M. oleífera*, no existen estudios que evalúan la estabilidad genética de esta especie, sólo para algunas especies relacionadas. En el estudio realizado por Khateeb *et al.*, (2013) con *M. peregrina*, la variabilidad genética de las plantas micropropagadas se evaluó usando ISSR, donde se encontró que los productos de amplificación fueron monomórficos en todas las plantas de cultivo. Del mismo modo, Kaity *et al.*, (2013) en su protocolo de criopreservación y la regeneración en base al desarrollo en la vitrificación *in vitro*, el material generado para realizar el análisis de amplificación de ADN al azar (RAF) y el polimorfismo de la metilación del ADN amplificado (AMP); detectaron sólo un pequeño número de variaciones en algunos individuos. Sin embargo, en nuestro estudio a diferencia de las investigaciones anteriores, se utilizó el marcador molecular RAMP, el cual representa el primer estudio para esta especie (Avila-Treviño *et al.*, 2017).

Por otro lado, esta especie también ha demostrado poseer propiedades medicinales que han ayudado como tratamiento en diversas enfermedades, en específico las relacionadas con problemas cardiovasculares. En los últimos años, la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incidencia de la obesidad y problemas cardiovasculares, han provocado el aumento de los esfuerzos en la investigación científica, que se ha centrado en diversos compuestos vegetales (Alemany *et al.*, 2014). Estos fitoquímicos representan una rica fuente de constituyentes que poseen diversos efectos benéficos para la salud (Njan *et al.*, 2014); dentro de los cuales se encuentra la reducción de Colesterol y Triglicéridos, ya que su prevención o control representa una contribución a la disminución del riesgo de enfermedades cardíacas (McKenney, 2001).

La actividad hipolipemiente de varias plantas medicinales se ha asociado a distintos agentes bioactivos como alcaloides, taninos y glucósidos entre otros (Atsukwei *et al.*, 2014). Sin embargo, en los diversos estudios dirigidos a reducción de Colesterol y Triglicéridos mediante extractos de *M. oleifera*, se ha observado que uno de los principales compuestos bioactivos es el β -sitosterol, además de otros fitoconstituyentes (Tandon, 2005).

Para evaluar la actividad hipolipemiente de los extractos de hoja de moringa, se indujo hiperlipidemia en ratas wistar, la cual fue tratada con el extracto acuoso y de acetato de etilo de hojas de *M. oleifera*; donde se demostró una respuesta positiva en la reducción de Colesterol Total y Triglicéridos. La fase de acetato de etilo obtuvo una reducción del 71.2% de colesterol total (Fig. 12) y 32.2% de Triglicéridos (Fig. 13), mientras que en el estudio de Ghasi *et al.*, (2000), donde evaluaron los efectos hipocolesterolémicos del extracto crudo de hojas de *M. oleifera* Lam con ratas wistar, obtuvieron un porcentaje de disminución del Colesterol Total de 14.35%, respuesta muy por debajo de nuestros resultados. Aunque en el trabajo de Gashi *et al.* (2000) el tratamiento del extracto acuoso de hojas de *M. oleifera* presentó ciertas diferencias con el que se realizó en nuestra investigación. Por otra parte Rajanandh *et al.* (2012) utilizaron un extracto hidroalcohólico de hojas de *M. oleifera* administradas a ratas con hiperlipidemia (100 y 200 mg/kg), el cual mostró una reducción significativa en los niveles de colesterol total y triglicéridos. Sin embargo los autores no refieren el porcentaje real de disminución. A su vez Atsukwei *et al.* (2014), analizaron el efecto hipolipemiente del extracto etanólico de hojas de *M. oleifera* (300 y 600 mg/kg de peso corporal) en ratas con hipercolesterolemia inducida. Observaron que la concentración de colesterol total en suero, tanto en ratas macho como hembras redujo significativamente (57% hembras, 44% macho), además los niveles de triglicéridos (65% hembras, 49% machos) también obtuvieron la misma respuesta. Estos dos resultados fueron encontrados en la dieta de 600 mg de extracto, dosis que representa tres veces más lo utilizado en nuestro estudio, aun así la reducción de colesterol fue menor para el estudio de Atsukwei *et al.* (2014), solo para el caso de colesterol.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El tratamiento a base de la fase acuosa, obtuvo una disminución significativa de los niveles de CT y TG del 52.1% y 39.2% (Fig. 12 y 13), respectivamente. Al igual que el resultado encontrado por Duangjai *et al.* (2011), donde evaluó el extracto metanólico de hojas de algunas plantas de Tailandia, entre ellos *M. oleifera*, sobre células Caco-2 (estudio *in vitro*). Encontraron que el extracto de moringa ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) podría bloquear la absorción del colesterol en las células Caco-2 (lumen intestinal). Los extractos también poseían actividad inhibitoria frente a la lipasa pancreática (debido a que un mecanismo de los agentes reductores de lípidos puede ser la inhibición de las enzimas digestivas). Además también se inhibió completamente la enzima HMG-CoA reductasa (enzima que regula la velocidad de la vía del mevalonato, la vía metabólica que produce colesterol) en la misma medida que la pravastatina ($0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por otro lado Mehta *et al.* (2003) trataron conejos hipercolesterolémicos con *M. oleifera* (masa de semillas) y Lovastatina, y mostraron una disminución en el perfil de lípidos de hígado, corazón y aorta, ellos encontraron que *M. oleifera* aumenta la excreción de colesterol fecal. La reducción de colesterol total y triglicéridos en suero fue de 81.69% y 81.44% respectivamente, valores de reducción mayores a nuestro estudio, sin embargo, el modelo biológico se trató de un mamífero más grande, además de que los aumentos de hiperlipidemia fueron mucho mayores que los de la presente investigación.

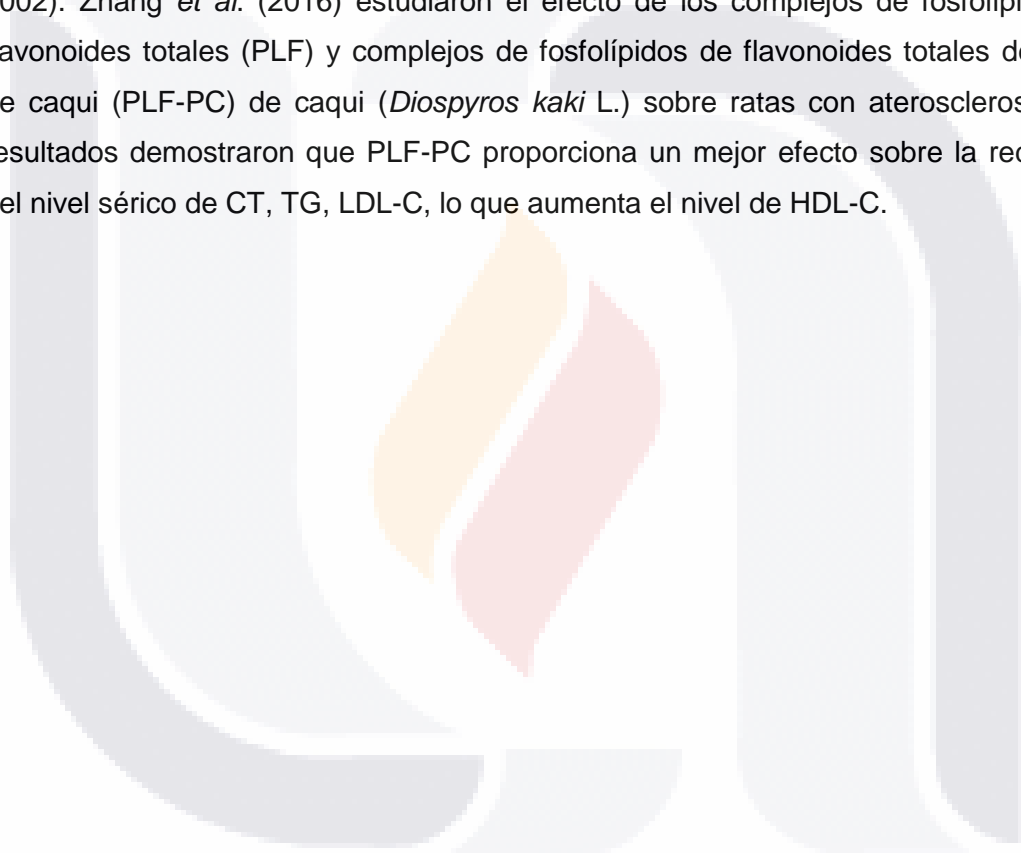
En este estudio a partir de los extractos de hoja, mediante una evaluación cualitativa por cromatografía en capa fina, se encontraron los flavonoides como Quercetina (Fig. 14-A) y Rutina (Fig. 14-b) y fitoesteroles como el β -sitoesterol (Fig. 16), estos compuestos ya se han identificado en diferentes plantas y se ha demostrado que poseen la capacidad de reducir el colesterol total y triglicéridos (Zhang *et al.*, 2016; Ganeshpurkar *et al.*, 2016), esto puede explicar la actividad positiva que presenta *M. oleifera*, sobre problemas de Colesterol y Triglicéridos encontrados en ratas hiperlipidémicas.

Los fitoesteroles, en el caso particular del β -sitoesterol, se utilizan como un suplemento de salud en la reducción de Colesterol total en plasma (Klingberg *et al.*, 2008). Existen por lo menos 3 sitios posibles donde los esteroides vegetales pueden actuar para reducir la absorción de colesterol (Saien *et al.*, 1970). En primer lugar, dentro del lumen intestinal, la presencia de exceso de fitoesteroides podría reducir la solubilidad de colesterol por su exclusión de micelas mixtas antes de que pueda ser absorbido. En segundo lugar, estos esteroides pueden competir con el colesterol para la captación por la célula de la mucosa intestinal; y tercero, que pueden interferir con la incorporación de colesterol en los quilomicrones, posiblemente interfiriendo con su

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

esterificación (Lees *et al.*, 1977). Se han desarrollado investigaciones donde se evalúa la actividad del β -sitosterol, como la de Liu *et al.* (2015) donde se observó la reducción de la hipercolesterolemia inducida en hámster en un 17.4%.

A parte del β -sitosterol, existen otros compuestos que poseen actividad hipocolesterolémica como por ejemplo los flavonoides, los cuales tienen un efecto cardioprotector que está relacionado con las propiedades antioxidantes o anti-agregantes de estos compuestos, además de que se ha mostrado un efecto de diversas concentraciones de polimetoxiflavonas en la reducción de la secreción de la proteína estructural (apoB) presente en las lipoproteínas de baja densidad (Bela *et al.*, 2002). Zhang *et al.* (2016) estudiaron el efecto de los complejos de fosfolípidos de flavonoides totales (PLF) y complejos de fosfolípidos de flavonoides totales de hojas de caqui (PLF-PC) de caqui (*Diospyros kaki* L.) sobre ratas con aterosclerosis; sus resultados demostraron que PLF-PC proporciona un mejor efecto sobre la reducción del nivel sérico de CT, TG, LDL-C, lo que aumenta el nivel de HDL-C.



VIII. CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo eficiente de propagación masiva a partir de yemas apicales y nodo cotiledonario de *M. oleifera*. En el estudio de variabilidad genética, el dendrograma no mostró variación entre las plantas propagadas *ex vitro* e *in vitro*, lo cual demuestra que los protocolos de propagación y regeneración indirecta es recomendado para la generación de plantas de *M. oleifera* que no comprometan sus características genéticas.

Para verificar las propiedades hipolipemiente de las hojas de *M. oleifera*, el extracto acuoso y la fracción de acetato de etilo mostraron una disminución de lípidos séricos en ratas wistar hiperlipídemicas. Mediante los estudios de cromatografía (capa fina y HPLC), se demostró la presencia de rutina y quercetina; flavonoides relacionados con la reducción de lípidos.

Por lo tanto, estos extractos puede ser candidatos para su uso en la prevención y tratamiento de pacientes con perfiles de lípidos séricos elevados, así como otras enfermedades cardiovasculares relacionadas.

IX. GLOSARIO

Reguladores del crecimiento vegetal: son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas. Dentro de este grupo de moléculas podemos diferenciar entre las que son producidas por la planta y aquellas de origen sintético. Las que se encuentran de forma natural en las plantas se denominan fitohormonas u hormonas vegetales. Las sustancias consideradas como fitohormonas son: auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno, aunque también se incluyen en ocasiones a brasinosteroides, ácido salicílico, jasmonatos, sistemina, poliaminas, óxido nítrico y péptidos señal.

Aclimatación: La aclimatación es una etapa fundamental en un sistema de micropropagación porque dependen de ella la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro*. Estas plantas en comparación con las cultivadas tradicionalmente presentan un comportamiento diferente en condiciones de campo. Es decir, sufren cambios morfológicos y fisiológicos que ocasionan una pérdida importante de plantas en el momento de trasplante. Por esta razón, es necesaria la aplicación de técnicas de adaptación al pasar de las condiciones *in vitro* a *ex vitro*. La aclimatación permitirá que la planta alcance un crecimiento autotrófico en ambientes de menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos. Estas son las condiciones reinantes en invernadero y campo donde crecerán las plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

Polimorfismo: El polimorfismo implica una de dos o más variantes de una secuencia de ADN particular. El tipo más común de polimorfismo implica la variación de un solo par de bases. Pero los hay que pueden ser mucho más grandes en tamaño e implicar largos tramos de ADN. No todas las variantes genéticas se consideran polimorfismos. Un polimorfismo es una variante genética que aparece en al menos 1% de una población. Al establecer el punto de corte en el 1%, se excluyen las mutaciones espontáneas que puedan haber ocurrido y difundido a través de los descendientes de una sola familia.

Dendrograma: Diagrama en forma de árbol para representar la jerarquía de categorías según el grado de similitud y características compartidas, típico de la taxonomía biológica.

Enfermedades cardiovasculares: Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Se clasifican en: hipertensión arterial (presión alta); cardiopatía coronaria (infarto de miocardio); enfermedad cerebrovascular (apoplejía); enfermedad vascular periférica; insuficiencia cardíaca; cardiopatía reumática; cardiopatía congénita; miocardiopatías. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de defunción en todo el mundo. Cada año mueren más personas por alguna de estas enfermedades que por cualquier otra causa.

Flavonoides: son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5.000 flavonoides diferentes. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercitina el predominante con un valor medio de 16 mg/día. En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres.

Colesterol: es una sustancia cerosa, de tipo grasosa, que existe naturalmente en todas las partes del cuerpo. El cuerpo necesita determinada cantidad de colesterol para funcionar adecuadamente. Pero el exceso de colesterol en la sangre, combinado con otras sustancias, puede adherirse a las paredes de las arterias. Esto se denomina placa. Las placas pueden estrechar las arterias o incluso obstruirlas.

Farmacología: es la ciencia que estudia el origen, las acciones y las propiedades que las sustancias químicas ejercen sobre los organismos vivos. se considera la farmacología como el estudio de los fármacos, sea que éstas tengan efectos beneficiosos o bien tóxicos. Tiene aplicaciones clínicas cuando las sustancias son utilizadas en el diagnóstico, prevención, tratamiento y alivio de síntomas de una enfermedad.

Triglicéridos: Es un tipo de glicerol que pertenece a la familia de los lípidos. Este glicérido se forma por la esterificación de los tres grupos OH de los gliceroles por diferentes o igual tipo de ácidos grasos. Es común llamar a los triglicéridos *grasas*, si son sólidos a temperatura ambiente, y *aceites*, si son líquidos a temperatura ambiente. Los triglicéridos en los mamíferos son transportados en todo el organismo teniendo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como función suministrar energía o para ser almacenados por periodos largos como grasa, siendo una fuente de energía a largo plazo más eficiente que los carbohidratos.

β -sitoesterol: es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitosteroles, que son los esteroides que se encuentran de forma natural en las plantas. Su estructura química es muy similar a la del colesterol. Este compuesto bloquea la absorción de colesterol, resultando en niveles más bajos de colesterol en suero. Ha demostrado mejorar los perfiles de lípidos-proteínas (HDL, LDL). Puede ayudar a normalizar los niveles de azúcar en la sangre y de insulina en diabéticos tipo II.



X. LITERATURA CITADA

Alemaný, L., Barbera, R., Alegría, A., Laparra, J.M., 2014. Plant sterols from foods in inflammation and risk of cardiovascular disease: A real threat? *Food and Chemical Toxicology* 69, 140–149.

Al-Malki, A.L., El Rabey, H.A., 2015. The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. *BioMed Res Int.* 2015, 1-13.

Anaya, J., Ochoa, A., Martínez, H., Moreno, S., 2011. Organogénesis indirecta de *Agave parviflora*, una especie en peligro y con alto potencial económico. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas.

Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A.H., 2007. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. *Phytother. Res* 21, 17–25.

APG (Angiosperm Phylogeny Group)., 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105–121.

Ara, N., Rashid, M., Amran, M.S., 2008. Comparison of *Moringa oleifera* leaves extract with atenolol on serum triglyceride, serum cholesterol, blood glucose, heart weight, body weight in adrenaline induced rats. *Saudi J Biol Sci* 15, 253–258.

Araújo, L., Prabhu, A., Arraes, P., 2004. RAPD marker linked to a gene conferring resistance to race IB-9 of *Pyricularia grisea* in somaclones of the rice cultivar araguaia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78, 151–158.

Aravanopoulos, F., 2003. Molecular identification of micropropagated plants. *Acta Horticulturae* 616, 25–47.

Atawodi, S.E., Atawodi, J.C., Idakwo, G.A., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Bartsch, H., Owen, R.W., 2010. Evaluation of the polyphenol content and antioxidant properties of methanol extracts of the leaves, stem, and root barks of *Moringa oleifera* Lam. *J Med Food* 13, 710–716.

Atsukwei, D., Eze, E.D., Adams, M.D., Adinoyi, S.S., Ukpabi, C.N., 2014. Hypolipidaemic effect of ethanol leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. in experimentally induced hypercholesterolemic wistar rats. International Journal of Nutrition and Food Sciences 3, 355–360.

Avila-Treviño J.A., Muñoz-Alemán J.M., Pérez-Molphe-Balch, E., Rodríguez-Sahagún, A., Morales-Domínguez, J.F., 2017. *In vitro* propagation from bud and apex explants of *Moringa oleifera* and evaluation of the genetic stability with RAMP marker. South African Journal of Botany 108, 149–156.

Azam, M.M., Waris, A., Nahar, N.M., 2005. Properties and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. Biomass Bioenergy 29, 293–302.

Bela, A., Buslig, J., Manthey A., 2002. Flavonoids in cell function. Volume 505. Springer Science+Business Media, LLC. USDA Citrus and Subtropical Products Laboratory Winter Haven, Florida, p 5.

Bennett, R.N., Mellon, F.A., Foidl, N., Pratt, J.H., DuPont, M.S., Perkins, L., Kroon, P.A., 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish tree) and *Moringa stenopetala* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 3546–3553.

Bharali, R., Tabassum, J., Azad, M.R., 2003. Chemomodulatory effect of *Moringa oleifera*, Lam, on hepatic carcinogen metabolising enzymes, antioxidant parameters and skin papillomagenesis in mice. Asian Pac J Cancer Prev 4, 131–139.

Bhattacharya, J., Khuspe, S.S., 2001. *In vitro* and *in vivo* germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. Scientia Horticulturae 91, 39–49.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet 32, 314–331.

Cáceres, A., Saravia, A., Rizzo, S., Zabala, L., León, E.D., Nave, F., 1992. Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*: 2: Screening for antispasmodic, anti-inflammatory and diuretic activity. J Ethnopharmacol 36, 233–237.

Castillo, A., 2008. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA, p. 8.

Cheenpracha, S., Park, E.J., Yoshida, W.Y., Barit, C., Wall, M., Pezzuto, J.M., Chang, L.C., 2010. Potential antiinflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. *Bioorg Med Chem* 18, 6598–6602.

Cheng, H.Y., Yang, W.C., Hsiao, J.Y., 2001. Genetic diversity and relationship among peach cultivars based on Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 42, 201–206.

Dahot, M.U., 1988. Vitamin contents of flowers and seeds of *Moringa oleifera*. *Pak J Biochem* 21, 1–24.

Das, B.R., Kurup, P.A., Narasimha-Rao, P.L., 1957. Antibiotic principle from *Moringa pterygosperma*. Part VII. Anti-bacterial activity and chemical structure of compounds related to pterygospermin. *Indian Journal of Medical Research* 45, 191–196.

Dávila, J.A., Sánchez de la Hoz, M.P., Loarce, Y., Ferrer, E., 1998. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficients of parentage to determine genetic relationships in barley. *Genome* 41, 477–486.

Delaveau, P., Boiteau, P., 1980. Oils of *Moringa oleifera* and *Moringa drouhardii*. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* 14, 29–33.

De Klerk, G.J., Arnholdt-Schmitt, B., Lieberei, R., Neumann, K.H., 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39, 53–66.

Dillard, C.J., German, J.B., 2000. Phytochemicals: nutraceuticals and human health: A review. *J Sci Food Agric* 80, 1744–1756.

Divi, S.M., Bellamkonda, R., Dasireddy, S.K., 2012. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipedemic potential of aqueous extract of *Moringa oleifera* in fructose fed insulin resistant and STZ induced diabetic wistar rats: A comparative study, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 5, 67–72.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Dolce, N., Scocchi, A., Mroginski, E., Mroginski, L., 2004. Organogénesis directa a partir de segmentos de hojas cotiledonares de *Citrus sinensis*. Congreso; XXV Reunión Argentina de Fisiología Vegetal.

Duangjai, A., Ingkaninan, K., Limpeanchob, N., 2011. Potential mechanisms of hypocholesterolaemic effect of Thai spices/dietary extracts. *Nat Prod Res* 8, 1–12.

Eilert, U., Wolters, B., Nadrtedt, A., 1981. The antibiotic principle of seeds of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*, *Planta Medica* 42, 55–61.

El-bakry, K., El-shahat, T., Serag, M., Aboser, M., 2016. Hepatoprotective effect of *Moringa oleifera* leaves extract against carbon tetrachloride induced liver damage in rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 76–89.

Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., Talalay, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 59, 237.

Fahey, J.W., 2005. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties—part 1. *Trees for Life Journal* 142, 255–261.

Faizi, S., Siddiqui, B., Saleem, R., Saddiqui, S., Aftab, K., 1994a. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure. *J Nat Prod* 57, 1256–1261.

Faizi, S., Siddiqui, B., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K., Gilani, A., 1994b. Novel hypotensive agents, niazimin A, niazimin B, niazicin A and niazicin B from *Moringa oleifera*; Isolation of first naturally occurring carbamates. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 3035–3640.

Faizi, S., Siddiqui, B.S., Saleem, R., Siddiqui, S., Aftab, K., Gilani, A.H., 1995. Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. *Phytochemistry* 38, 957–963.

Faizi, S., Siddiqui, B.S., Saleem, R., Aftab, K., Shaheen, F., Gilani, A.H., 1998. Hypotensive constituents from the pods of *Moringa oleifera*. *Planta Med* 64, 225–228.

FAO., 2010. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Rischkowsky, B., Pilling, D. La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Roma. pp. 393–411.

FAO-OMS., 2005. Normas alimentarias FAO/OMS. Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas. Reunión 37. http://www.codexalimentarius.net/download/report/641/al28_24s.pdf.

Farooq, F., Ral, M., Tiwar, A., Khan, A.A., Farooq, S., 2012. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. Journal of Medicinal Plants Research 6, 4368–4374.

Förster, N., Mewis, I., Ulrichs, C., 2013. *Moringa Oleifera* - Establishment and multiplication of different ecotypes *in vitro*. Gesunde Pflanzen 65, 21–31.

Freire, M., 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Biotecnología Vegetal 3, 195.

Freiberger, C.E., Vanderjagt, D.J., Pastuszyn, A., Glew, R.S., Mounkaila, G., Millson, M., Glew, R.H., 1998. Nutrient content of the edible leaves of seven wild plants from Niger. Plant Foods for Human Nutrition 53, 57–69.

Fuglie, L.J., 1999. The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics. Church World Service, Dakar. The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa, pp 172.

Fuglie, L.J., 2005. The Moringa Tree. A Local Solution to Malnutrition. Dakar, Senegal.

Ganesan, S.K., Singh, R., Choudhury, D.R., Bharadwaj, J., Gupta, V., Singode, A., 2014. Genetic diversity and population structure study of drumstick (*Moringa oleifera* Lam.) using morphological and SSR markers. Industrial Crops and Products 60, 316–325.

García, R.M., 2003. Producción de semillas forestales de especies forrajeras enfatizados en sistemas silvopastoriles. INAFOR. p.37. <http://www.inafor.gob.ni/index.php/publicacion>.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Ganeshpurkar, A., Saluja, A.K., 2016. The Pharmacological Potential of Rutin. Saudi Pharmaceutical Journal. Article in press.

Gassenschmidt, U., Klaus, D.J., Bernhard, T., Niebergall, H., 1995. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). General Subjects 1243, 477–481.

Gayathri, M., Kumar, P.S., Lakshmi, A.M., Muralitharan, G., 2015. *In vitro* regeneration of *Arachis hypogaea* L. and *Moringa oleifera* Lam. using extracellular phytohormones from *Aphanothece* sp. MBDU 515. Algal Research 7, 100–105.

Ghasi, S., Nwobodo, E., Ofili, J., 2000. Hypocholesterolemic effects of crude extract of leaf of *Moringa oleifera* Lam in high-fat diet fed wistar rats. Journal of Ethnopharmacology 69, 21–25.

Gilani, A.H., Aftab, K., Suria, A., 1994. Pharmacological studies on hypotensive and spasmodic activities of pure compounds from *Moringa oleifera*. Phytother Res 8, 87–91

Goldstein, D.B., Schlötterer, C., 1999. Microsatellites: evolution and applications. Nueva York, EE.UU. Oxford University Press.

Gopalan, G., Rama-Sastri, B.V., Balasubramanian, S.C., 2002. Nutritive value of indian foods. National Institute of Nutrition. Indian Council of Medical Research, Hyderabad.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumara, D.S., 2016. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. Food Sci. Human Wellness 5, 49–56.

Goyal, B.R., Agrawal, B.B., Goyal, R.K., Mehta, A.A., 2007. Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. An overview. Natural Product Radiance 6, 347–353.

Guevara, A.P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H., Nishino H., 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. Mutation Research 440, 181–188.

Guha, S.R.D., Negi, J.S., 1965. Wrapping, printing, and writing paper from *Moringa pterygosperma*. Indian Pulp Paper 20, 377–379.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Gupta, R.K., 2010. Medicinal & Aromatic Plants. CBS publishers & distributors 151–152.

Hermawan, A., Nur, K.A., Sarmoko, D., Dewi, P., Putri, E., Meiyanto, 2012. Ethanolic extract of *Moringa oleifera* increased cytotoxic effect of doxorubicin on HeLa cancer cells. J. Nat. Remedies 12, 108–114.

Hukkeri, V.I., Nagathan, C.V., Karandi, R.V., Patil, B.S., 2006. Antipyretic and wound healing activities of *Moringa oleifera* Lam in rats. Indian J Pharmaceut Sci 68, 124–126.

Ibrahim, I.A., Nasr, M.I., Mohammed, B.I., El-Zefzafi, M.M., 2008. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech 10, 254–259.

Iqbal, S., Bhangar, M.I., 2006. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. J Food Comp Anal 19, 544–551.

Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Tree 11, 424–429.

Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A.B., Saura-Calixto, F., 2006. Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. J. Agric. Food Chem 54, 3462–3471.

Kaepler, S., Kaepler, H., Rhee, Y., 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant molecular Biology 43, 179–188.

Kaity, A., Drew, R.A., Ashmore, S.E., 2013. Genetic and epigenetic integrity assessment of acclimatised papaya plants regenerated directly from shoot-tips following short and long-term cryopreservation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 112, 75–86.

Kar, A., Choudhary, B.K., Bandyopadhyay, N.G., 1999. Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hypoglycaemic herbs on oral glucose tolerance test. Journal of Ethnopharmacology 64, 179–184.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Karadi, R.V., Gadge, N.B., Alagawadi, K.R., Savadi, R.V., 2006. Effect of *Moringa oleifera* Lam. Root-wood on ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *J. Ethnopharmacol* 105, 306–311.

Kesharwani, S., Prasad, P., Roy, A., Sahu, R.K., 2014. An Overview on Phytochemistry and Pharmacological Explorations of *Moringa oleifera*. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences* 2, 34–41.

Khateeb, W.A., Bahar, E., Lahham, J., Schroeder, D., Hussein, E., 2013. Regeneration and assessment of genetic fidelity of the endangered tree *Moringa peregrina* (Forsk.) Fiori using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). *Physiol Mol Biol Plants* 19, 157–164.

Klingberg, S., Ellegård, L., Johansson, I., Hallmans, G., Weinehall, L., Andersson, H., Winkvist, A., 2008. Inverse relation between dietary intake of naturally occurring plant sterols and serum cholesterol in northern Sweden. *Am J Clin Nutr* 87, 993–1001.

Kubis, S., Castilho, A., Vershinin, A., Heslop-Harrison, J., 2003. Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. *Plant molecular Biology* 52, 69–79.

Lees, A.M., Mok, H.Y.I., Lees, R.S., McCluskey, M.A., Grundy, S.M., 1977. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 28, 325–338.

Lee, Y.J., Shacter, E., 1999. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem.* 274, 19792-19798.

Lim, T.K., 2012. Edible medicinal and non medicinal plants, Springer, vol 3. Berlin.

Lindblom, L., Ekman, S., 2006. Genetic variation and population differentiation in the lichen forming Ascomycete *Xanthoria Parietina* on the Island Storfosna. Central Norway, *Mol. Ecol.* 15, 1545–1559.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Liu, Y., Lei, L., Wang, X., Ma, K.Y., Li, Y. M., Wang, L., Man, S.W., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2015. Plasma cholesterol-raising potency of dietary free cholesterol versus cholesteryl ester and effect of β -sitosterol. *Food chemistry* 169, 277–282.

Luqman, S., Srivastava, S., Kumar, R., Maurya, A.K., Chanda, D., 2012. Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, 1–12.

Lynch, M., Milligan, B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3, 91–99.

Mahajan, S.G., Mehta, A.A., 2011. Suppression of ovalbumin induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma. *Eur J Pharmacol* 650, 458–464.

Makkar, H.P.S., Becker, K., 1996. Nutritional value and anti-nutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. *Animal Feed Sci Tech* 63, 211–228.

Makonnen, E., Hunde, A., Damecha, G., 1997. Hypoglycaemic effect of *Moringa stenopetala* aqueous extract in rabbits. *Phytotherapy Research* 11, 147–148.

Martínez, M.C., Helguera, M., Carrera, A., 2010. Marcadores Moleculares. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. ArgenBio, pp. 70-85.

Mathur, M., Yadav, S., Katariya, P., Kamal, R., 2014. *In vitro* propagation and biosynthesis of steroidal sapogenins from various morphogenetic stages of *Moringa oleifera* Lam., and their antioxidant potential. *Acta Physiol Plant* 36, 1749–1762.

Mazumder, U.K., Gupta, M., 1999. Evaluation of hematological and hepatorenal functions of methanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. root treated mice. *Indian Journal of Experimental Biology* 37, 612–614.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Mbikay, M., 2012. Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: A review, *Front. Pharmacol* 3, 1–12.

McKersie, B.D., Brown, D.C.W, 1996. Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research* 6, 109–126.

Mehta, L., Balaraman, R., Amin, A., Bafna, P., Gulati, O., 2003. Effects of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 86, 191–195.

McKenney, J.M., 2001. Pharmacotherapy of dyslipidemia. *Cardiovasc. Drugs Ther* 15, 413–422.

Mishra, S.P., Singh, P., Singh, S., 2012. Processing of *Moringa oleifera* Leaves for Human Consumption. *Bull. Env. Pharmacol Life Sci* 2, 28–31

Miyoshi, N., Uchida, K., Osawa, T., Nakamura, Y., A 2004. Link between Benzyl Isothiocyanate-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis: Involvement of Mitogen Activated Protein Kinases in the Bcl-2 Phosphorylation, *Cancer Res.* 64, 2134–2142

Mohammed, K.A.E.F., Sarmiento, L., Santos, R., Solorio, J.F., 2012. The nutritional effect of *Moringa oleifera* fresh leaves as feed supplement on Rhode Island Red hen egg production and quality. *Tropical animal health and production* 44, 1035–1040

Morton, J.F., 1991. The horseradish tree *Moringa pterygosperma* (Moringaceae)—A boon to Arid Lands?. *Economic Botany* 318–333

Mughal, M.H., Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal, M., 1999. Improvement of drumstick (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) – a unique source of food and medicine through tissue culture. *Hamdard Med* 42, 37–42

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

Nair, A.G.R., Subramanian, S.S., 1962. Pigments of the flowers of *Moringa pterygosperma*. *Curr. Sci* 31, 155–156

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Nair, M.K., Varghese, C., Swaminathan, R., 2005. Cancer: Current scenario, intervention strategies and projections for 2015. *Burden of Disease in India 2005*, 219-225

Nakamura. Y., Kawakami, M., Yoshihiro, A., Miyoshi, N., Ohigashi, H., Kawai, K., Osawa, T., Uchida, K., 2002. Involvement of the mitochondrial death pathway in chemo preventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 277, 8492–8499

Nath, D., Sethi, N., Singh, R.K., Jain, A.K., 1992. Commonly used Indian abortifacient plants with special reference to their teratologic effects in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 36, 147–154

Ndabigengeserea, A., Narasiah, K.S., 1998. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. *Helv Chim Acta* 32, 781–791

Nepolean, P., Anitha, J., Renitta, R.E., 2009. Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. *Curr Biotica* 3, 33–38

Njan, A.A., Amali, M.O., Olatunji, L.O., Olorundare, O.E., 2014. An Overview of the Ethno-Pharmacological potentials of *Moringa Oleifera* Lam, “The Miracle Tree”. *Arch. Bas. App. Med.* 2, 135–145

Obioma, U.N., Adikwu, M.U., 1997. Investigation on some physiochemical antioxidant and toxicological properties of *Moringa oleifera* seed oil. *Acta Pharm* 47, 287–290

Odebiyi, A., Sofowora, E.A., 1999. Phytochemical screenings of Nigerian medicinal plants part 11. *Lyodia* 44, 234–246.

Olson, M.E., 2001. Stem and root anatomy of *Moringa* (Moringaceae). *Haseltonia* 8, 56–96.

Olson, M.E., 2002. Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales), and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *International Journal of Plant Sciences* 163, 51–65.

Olson, M.E., 2003. Ontogenetic origins of floral bilateral symmetry in Moringaceae.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

American Journal of Botany 90, 49–71.

Olson, M.E., 2010a. Moringaceae. *In* Flora of North America North of Mexico, vol. 7, Flora of North America Editorial Committee (eds.). Flora of North America Association, New York y Oxford. p. 167–169.

Olson, M.E., 2010b. Moringaceae: drumstick family. *In* Flora of North America Editorial Committee (Ed.), 1993+. Flora of North America North of Mexico. 15+ vols. New York and Oxford, vol. 7, pp. 167–169.

Olson, M.E., Carlquist. S., 2001. Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematics in *Moringa* (Moringaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 135, 315–348.

Olson, M.E., y Fahey, J., 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82, 1071–1082.

Pal, S.K., Mukherjee, P.K., Saha, B.P., 1995. Studies on the antiulcer activity of *Moringa oleifera* Leaf extract on gastric ulcer models in rats. *Phytother Res* 9, 463–465.

Park, E., Cheenpracha, S., Chang, L., Kondratyuk, T., Pezzuto, J., 2011. Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by 4-[(2'-O-acetyl- α -L-rhamnosyloxy)benzyl] isothiocyanate from *Moringa oleifera*. *Nutr Cancer* 63, 971–82.

Pari, L., Kumar, N.A., 2002. Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* on antitubercular drug-induced liver damage in rats. *Journal of Medical Food* 5, 171–177.

Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, N., Reyes, F., 2010. Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes* 33, 0864–0394.

Pérez, M., 1997. Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. III Simposio Científico en Biología Celular y Molecular.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Picca, A., Helguera, M., Salomón, N., Carrera, A., 2004. Marcadores moleculares. *In* Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. eds. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la información y el De-sarrollo de la Biotecnología. Argentina, ediciones INTA, p. 61–68.

Pramanik, A., Islam, S.S., 1998. Chemical investigation of aqueous extract of the mature and premature flowers of *Moringa oleifera* and structural studies of a polysaccharide isolated from its premature flowers. *Indian J Chem* 37B, 676–682.

Radice, S., 2010. CAPÍTULO 2 Morfogénesis. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., Mroginski, L., Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ArgenBio, p. 26.

Ramírez, C., 2003. Estudio de algunos factores que influyen en la micropropagación del nogal (*Carya illinoensis koch*), Tesis de Doctorado en Ciencias Agrícolas, en el área de horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo Coahuila, México p. 82.

Rahman, M.M., Sheikh, M.M.I., Sharmin, S.A., Islam, M.S., Rahman, M.A., Rahman, M.M., Alam, M., 2009. Antibacterial activity of leaf juice and extracts of *Moringa oleifera* Lam. against some human pathogenic bacteria. *CMU J Nat Sci* 8, 219-228.

Rajanandh, M.G., Satishkumar, M.N., Elango, K., Suresh, B., 2012. *Moringa oleifera* Lam. A herbal medicine for hyperlipidemia: A pre-clinical report. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2012, 790–795.

Rao, C.V., Ojha, S.K., 2003. Analgesic effect of *Moringa oleifera* Lam Leaf extract on rats. *Second World Congress on Biotechnological Developments of Herbal Medicine*. Lucknow: NBRI; p. 42.

Ramachandran, C., Peter KV, Gopalakrishnan, P.K., 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Econ. Bot.* 34, 276–283.

Roloff, A., 2009. “*Moringa oleifera* Lam” Enzyklopädie der Holzgewächse. *Handbuch und Atlas der Dendrologie* 3, 1–8.

ROSS, I.A., 2003. Medicinal Plants of the World. Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Volume 1, Second edition.

Rosenblat, M., Volkova, N., Aviram, M., 2013. Pomegranate phytosterol (β -sitosterol) and polyphenolic antioxidant (punicalagin) addition to statin, significantly protected against macrophage foam cells formation. *Atherosclerosis* 226, 110–117.

Roy, A.R., Sajeev, S., Pattanayak, A., Deka, B.C., 2012. TDZ induced micropropagation in *Cymbidium giganteum* Wall. Ex Lindl. and assessment of genetic variation in the regenerated plants. *Plant Growth Regul* 68, 435–445.

Sahijram, L., Soneyi, J., Bollamma, K., 2003. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 39, 551–556.

Saien, G., Ahrens, E.H.Jr., Grundy, S.M., 1970. Metabolism of β -sitosterol in man. *J. Clin. Invest* 49, 952.

Saini, R., Saad, K., Ravishankar, G., Giridhar, P., Shetty, N., 2013. Genetic diversity of commercially grown *Moringa oleifera* Lam. cultivars from India by RAPD, ISSR and cytochrome P₄₅₀-based markers. *Plant Systematics and Evolution*. 299, 1205–1213.

Saluja, M.P., Kapil, R.S., Popli, S.P., 1978. Studies in medicinal plants: part VI chemical constituents of *Moringa oleifera* Lam. and isolation of 4-hydroxymellein. *Indian J Chem* 16B, 1044–1045.

Sánchez de la Hoz, M.P., Dávila, J.A., Loarce, Y. Ferrer E. 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* 39, 112–117.

Sánchez, M., Sánchez, C., Villanueva, C., Vázquez, I., Jiménez, M., Sánchez, I., 2009. Multiplicación *in vitro* vía organogénesis en calabaza. *Agronomía mesoamericana* 20, 1021–1044.

Sánchez-Teyer, L.F., Quiróz-Figueroa, F., Loyola-Vargas, V., Infante, D., 2003. Culture induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and

indirect somatic embryogenesis. *Molecular Biotechnology* 23, 107–115.

Sashidhara, K.V., Rosaiah, J.N., Tyagi, E., Shukla, R., Raghubir, R., Rajendran, S.M., 2009. *Euro J.Med. Chem.* 44, 432–436.

Selvakumar, D., Natarajan, P., 2008. Hepatoprotective activity of *Moringa oleifera* Lam Leaves in carbon tetrachloride induced Hepatotoxicity in Albino rats. *Phcog mag* 4, 97–98.

Shahzad, U., Khan, M., Jaskani, M., Khan, I., Korban, S., 2013. Genetic diversity and population structure of *Moringa oleifera*. *Conserv Genet* 14, 1161–1172.

Sharma, G.K., & Rains, V., 1982. Propagation techniques of *Moringa oleifera* Lam. In: Improvement of forest biomass. (Khosia, P.K., ed.). Proceedings of a Symposium. Indian Society of Tree Scientist. Solan, India. p. 175.

Shaw, B.P., Jana, P., 1982. Clinical assessment of Sigrú (*Moringa oelifera* Lam) on Mutrakrichra (lower urinary tract infection). *NAGARJUN* 231–235.

Shukla, S., Mathur, R., Prakash, A.O., 1988. Antifertility Profile of the aqueous extract of *Moringa oleifera* roots. *J Ethnopharmacology* 22, 51–62.

Siddhuraju, P., Becker, K., 2003. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). *J Agric Food Chem* 15, 2144–2155.

Simpson, J., 1997. Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60, 119-122.

Smit, R., Du-Toit, E.S., Vorster, B.J., 2013. RAPD and SSR genetic diversity analysis of *Moringa oleifera*. *South African Journal of Botany* 86, 182.

Sorkheh, K., Shiran, B., Kiani, S., Amirbakhtiar, N., Mousavi, S., Rouhi, V., Mohammady, S., Gradziel, T.M., Malysheva, L.V., Martínez, P., 2009. Discriminating ability of molecular markers and morphological characterization in the establishment of genetic relationships in cultivated genotypes of almond and related wild species. *Journal of Forestry Research* 20, 183–194.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sreelatha, S., & Padma, P.R., 2009. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition* 64, 303–311.

Steinitz, B., Tabib, Y., Gaba, V., Gefen, T., Vaknin, Y., 2009. Vegetative micro-cloning to sustain biodiversity of threatened *Moringa* species. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 45, 65–71.

Stephenson, K., Fahey, J., 2004. Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* Spp. germplasm. *Economic Botany* 58, 116–124.

Stussi, I.A., Freis, O., Moser, P., Pauly, G., 2002. Laboratoires Sérobiologiques Pulnoy, France http://www.laboratoiresserobiologiques.com/pdf/Article_HappiAntiPol2002.pdf.

Sutar, N.G., Bonde, C.G., Patil, V.V., Narkhede, S.B., Patil, A.P., Kakad, R.T., 2008. Analgesic activity of seeds of *Moringa oleifera* Lam. *Int J Green Pharm* 2, 108–110.

Tandon, S., 2005. Phytochemicals and cardiovascular health. *High Current R and D* 28, 18–22.

The wealth of India, 1962: A dictionary of indian raw materials and industrial products. *Raw materials* Vol VI: L-M: Council of Scientific and Industrial Research: New Delhi, pp 425–429.

Tiloke, C., Phulukdaree, A., Chuturgoon, A.A., 2013. The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 13, 226.

Trees for Life., 2005. *Moringa Book* [Brochure]. Balbir Mathur; Wichita, Kansas.

Tsaknis, J., Lalas, S., Gergis, V., Douroglou, V., Spiliotis, V., 1999. Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4495–4499.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Valadez-Moctezuma, E., Kahl, G., Rubluo-Islas, A., Arreguín-de los Monteros, R., 2005. Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDS y MP-PCR mediante la técnica RAMPNR. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11, 351–356.

Villaseñor, J.L., Espinosa, F.J., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. p 448.

Wu, A.H., Ruan, W., Todd, J., Lynch, K.L., 2014. Biological variation of β -sitosterol, campesterol, and lathosterol as cholesterol absorption and synthesis biomarkers. *Clin. Chim. Acta* 430, 43–47.

Wu, K., Jones, R., Danneberger, L., Scolnik, P.A., 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* 22, 3257–3258.

Yang, H., Tabei, Y., Kamada, H., Rayano T., 1999. Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. *Plant Cell Rep* 18, 520–526.

Yang, R.W., Zhou, Y.H., Zhang, Y., Zheng, Y.L., Ding, C.B., 2006. The genetic diversity among *Leymus* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP) *Genetic Resources and Crop Evolution* 53, 139–144.

Yeh, F.C., Yang, R., Boyle, T.J., Ye, Z., Xiyang, J.M., 2000. PopGene32, Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, version 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

Yin, Z.F., Zhao, B., Chen, L., Wang, Q.C., 2013. Direct shoot regeneration from basal leaf segments of *Lilium* and assessment of genetic stability in regenerants by ISSR and AFLP markers. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 49, 333–342.

Zhang, K., Zhang, Y., Zhang, M., Gub, L., Liub, Z., Jiaa, J., Chenb, X., 2016. Effects of phospholipid complexes of total flavonoids from Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves on experimental atherosclerosis rats. *Journal of Ethnopharmacology* 191, 245–253.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Zhang, L., Zheng, Y.L., Wei, Y.M., Liu, S.G., Zhou, Y.H., 2003. Relationships among *Kengyilia* species based on random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). *High Technol. Lett.* 4, 28–33.

Zhanga, M., Zongkai, X., Gaoa, W., Pua, L., Weia, J., Guo, C., 2016. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. *Nutrition Research* 36, 271–279.

Zhao, Y., Brian, W., Crisp, P., 2005. Variations in morphology and disease susceptibility of micropropagated rhubarb (*Rheum rhaponticum*) PC49, compares to conventional plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 82, 357–361.

