

005624  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"OBTENCION DE CROMENOS (ENCECALINA  
Y DESMETILENCECALINA) EN DIFERENTES  
SISTEMAS DE CULTIVO *in vitro* DE *Helianthella*  
*quinquenervis* (HOOK.) A GRAY."

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

P R E S E N T A:

**JUANA MABEL HERNANDEZ ALTAMIRANO**

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

268483



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Instituto de Biología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Robert Bye Boettler y del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, y en el Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM con la asesoría de la Dra. Rachel Mata y la Dra. Perla Castañeda.**

# Agradecimientos

Al Dr. Robert Bye Boettler por darme la oportunidad de trabajar con un equipo comprometido, por enseñarme que la investigación comienza en el campo.

A las doctoras Irma Bernal Lugo y Ana Ramos Valdivia por su valiosa revisión y sugerencias para mejorar el manuscrito. Al Dr. Manuel Jiménez y Dr. Víctor Chávez, por compartir conmigo su experiencia.

A Isabel Saad por la amistad de estos años y el apoyo en mi formación.

A la Dra. Perla Castañeda y a la Dra. Rachel Mata, por su asesoría y disposición para desarrollar este proyecto.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y del Laboratorio de Etnobotánica del Jardín Botánico, UNAM, por los momentos tan agradables que hemos compartido.

A mis amigos de IAC, por su paciencia y apoyo para quienes creemos en este proyecto.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico por el apoyo otorgado para llevar a cabo el trabajo experimental de esta investigación.

# Dedicatoria

**A mis padres: porque los pequeños y grandes avances de nuestra vida son gracias a la oportunidad y el apoyo que nos han brindado siempre. Los quiero mucho.**

**A Bruno: por compartir conmigo un proyecto de vida, por tu cariño y apoyo que se refleja en los pequeños éxitos de cada día.**

# Índice General

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	<b>16</b>
2.1	Metabolitos secundarios, consideraciones generales . . . . .	16
2.2	Metabolitos secundarios de plantas obtenidos por Cultivo de Tejidos Vegetales . . . . .	19
2.3	Cromenos y benzofuranos de algunas especies de la familia Asteraceae . . . . .	23
2.4	Elicitores, su papel en la inducción de metabolitos secundarios en plantas . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Justificación</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Objetivos</b>	<b>30</b>
4.1	Objetivo general . . . . .	30
4.2	Objetivos particulares . . . . .	30
<b>5</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>31</b>
5.1	Estrategia general . . . . .	31
5.1.1	Primera etapa . . . . .	31
5.1.2	Segunda etapa . . . . .	31
5.1.3	Tercera etapa . . . . .	32
5.2	Material vegetal . . . . .	32
5.3	Medios de cultivo . . . . .	32
5.4	Germinación . . . . .	33
5.4.1	Desinfestación de las semillas . . . . .	34
5.4.2	Condiciones ambientales . . . . .	34
5.4.3	Siembra en suelo . . . . .	34

5.5	Eliminación de la contaminación bacteriana . . . . .	34
5.6	Inducción de callo . . . . .	35
5.7	Cultivo de células en suspensión . . . . .	35
5.7.1	Establecimiento . . . . .	35
5.7.2	Efecto de la sacarosa sobre la turgencia celular. . . . .	36
5.7.3	Cinética de crecimiento . . . . .	36
5.7.4	Elicitación del cultivo en suspensión . . . . .	36
5.8	Inducción de raíces . . . . .	37
5.8.1	Cultivo de raíces obtenidas de plantas <i>in vitro</i> . . . . .	37
5.8.2	Cultivo de raíces a partir de tallo y hoja . . . . .	37
5.9	Análisis fitoquímicos . . . . .	37
5.10	Pruebas biológicas . . . . .	39
5.11	Estrategia general . . . . .	39
<b>6</b>	<b>Resultados y Discusión</b> . . . . .	<b>41</b>
6.1	Germinación . . . . .	41
6.2	Evaluación y eliminación de la contaminación en las semillas de <i>H. quinquenervis</i> . . . . .	42
6.3	Inducción de callo . . . . .	44
6.4	Cultivo en suspensión . . . . .	47
6.4.1	Establecimiento . . . . .	47
6.4.2	Efecto de la sacarosa sobre la turgencia celular . . . . .	48
6.4.3	Cinética de crecimiento . . . . .	49
6.5	Inducción de raíces . . . . .	51
6.5.1	Cultivo de raíces obtenidas a partir de plantas <i>in vitro</i> . . . . .	51
6.5.2	Cultivo de raíces obtenidas a partir de tallo y hoja . . . . .	52
6.6	Cultivo de células en suspensión elicitado . . . . .	53
6.7	Resultados obtenidos con los análisis de cromatografía de capa fina, y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los extractos derivados de los sistemas <i>in vitro</i> . . . . .	55
6.7.1	Extractos de hojas y raíces de plantas <i>in vitro</i> de dos meses de edad . . . . .	55
6.7.2	Extractos de callos cultivados en MS sólido. . . . .	55
6.7.3	Extractos de cultivo de células en suspensión. . . . .	57
6.7.4	Cultivo de raíces a partir de hojas y tallos . . . . .	58
6.7.5	Cuantificación de los picos más intensos de los espectros 1, 4, 7 y 8. . . . .	58

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>6</b>
6.7.6 Cultivo de células en suspensión elicitado con <i>Fusarium</i> sp.	59
6.7.7 Pruebas biológicas. . . . .	60
<b>7 Conclusiones</b>	<b>62</b>



# Índice de Tablas

6.1	Porcentaje de semillas contaminadas en dos colectas durante los meses de octubre de 1995 y 1996. . . . .	43
6.2	Inducción de callo a partir de explante de tallo de <i>H. quinquenervis</i> utilizando medio MS adicionado con BAP y 2,4-D, evaluados a los 30 días. . . . .	44
6.3	Inducción de callo a partir de explante de tallo con concentraciones altas de auxina (2,4-D) evaluado a los 30 días. . . . .	46
6.4	Inducción de callo a partir de explante de hoja con concentraciones altas de auxina (ANA), evaluado a los 30 días. . . . .	46
6.5	Inducción de callo a partir de explantes de hoja y tallo en medio MS con dos combinaciones de reguladores de crecimiento. . . . .	47
6.6	Inducción de raíz en tres combinaciones de auxinas. . . . .	52
6.7	Detección de la enecalina y la desmetilencecalina en diferentes sistemas de cultivo en cromatografía de capa fina y CG-EM . . . .	56
6.8	Cuantificación de la enecalina y desmetilencecalina en los espectros 1, 4, 7 y 8 de <i>H. quinquenervis</i> . . . . .	59
6.9	Efecto de los diferentes extractos obtenidos de los sistemas <i>in vitro</i> de <i>H. quinquenervis</i> sobre la germinación de semillas de <i>Echinochloa crusgalli</i> . . . . .	60
7.1	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962). . . . .	64

# Índice de Figuras

1.1	Planta y flor de <i>Helianthella quinquenervis</i> . . . . .	12
1.2	Raíces de <i>H. quinquenervis</i> . . . . .	13
1.3	Semillas de <i>H. quinquenervis</i> . . . . .	13
1.4	Compuestos aislados de <i>Helianthella quinquenervis</i> (Castañeda et al., 1996). . . . .	14
2.1	Principales vías del metabolismo secundario en las células vegetales. (Loyola-Vargas, 1984, en Robert et al., 1991). . . . .	18
5.1	Metodología general. . . . .	40
6.1	Germinación de <i>Helianthella quinquenervis</i> (Hook.) A. Gray a los 25 días de siembra. . . . .	41
6.2	Callo desarrollado en MS mas 1.0 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de 2,4-D. . . . .	45
6.3	Agregación de células en cultivo en suspensión. . . . .	48
6.4	Celula turgente del cultivo en suspensión con 30 g/l de sacarosa. . . . .	48
6.5	Cinética de crecimiento por paquete celular. . . . .	49
6.6	Cinética de crecimiento por peso fresco. . . . .	50
6.7	Cinética de crecimiento por peso seco. . . . .	50
6.8	Cinética de crecimiento por contenido de proteína. . . . .	51
6.9	Raíces inducidas a partir de secciones de hoja. . . . .	53

# Abreviaturas

<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>BAP</b>	6-bencilaminopurina
<b>IBA</b>	Ácido indolbutírico
<b>2,4-D</b>	Ácido 2, 4 diclorofenoxiacético
<b>K</b>	Kinetina 6-furfurilaminopurina
<b>MS</b>	Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
<b>PDA</b>	Papa dextrosa agar
<b>CTV</b>	Cultivo de tejidos vegetales
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
<b>TR</b>	Tiempo de retención

# Resumen

La enecalina es un cromeno que se produce entre otras plantas en *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray, esta especie pertenece a la familia Asteraceae y su importancia radica en la acción biológica de algunos de los compuestos que produce y que le confieren su actividad alelopática y fungicida.

En el presente trabajo se desarrolló un proyecto de investigación utilizando herramientas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales, para conocer la producción de los principales compuestos de la planta. Dentro de los experimentos realizados se logró optimizar la germinación de las semillas de *H. quinquenervis* para lo cual se determinó como necesaria la eliminación de la cubierta seminal.

Se probaron diferentes auxinas y citocininas para inducir la formación de callo, a partir de diferentes explantes, lo cual se logró en medio MS adicionado con 1 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de 2,4-D, o bien en MS con 1 mg/l de ANA. Estos tratamientos dieron origen a un callo de color verde claro a blanco y de consistencia friable con escasa oxidación. Los explantes de tallo y hoja provenientes de semillas germinadas *in vitro*, y utilizados en los experimentos anteriores, dieron resultados similares en la producción de callo.

Al medio MS con 1 mg/l de BAP, se le adicionó 1 mg/l de ANA en sustitución de 0.1 mg/l de 2,4-D en el cultivo en suspensión, esto originó un aumento en la velocidad de división del cultivo cuadruplicándose la biomasa. Este cultivo en suspensión sintetiza un compuesto de color amarillo, que no se ha detectado en la planta silvestre.

En el sistema de elicitación con *Fusarium* sp en el cultivo en suspensión, se produjo una reacción de defensa, que se manifestó a través de la oxidación del cultivo, pero aún no se conoce la naturaleza de los compuestos producidos.

Por medio de cromatografías de placa fina y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, se determinó que los compuestos identificados en la

planta silvestre no se sintetizan en tejido desdiferenciado como lo es el callo y el cultivo de células en suspensión. Se determinó que la enecalina se produce en las hojas jóvenes de plantas desarrolladas *in vitro* y en hojas maduras de plantas silvestres, pero no en las raíces jóvenes; respuesta que está relacionada con la biología de la planta y su uso etnobotánico.

Para determinar si los extractos obtenidos del cultivo elicitado, del cultivo de células en suspensión y de las raíces originadas de tallo y hojas, presentaban actividad fitotóxica, se probaron éstos en varias concentraciones sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv, en bioensayos *in vitro*. El análisis de varianza de los resultados obtenidos en este experimento demostró que los extractos de los sistemas de raíces originados a partir de tallo, tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de la raíz de esta maleza.

# Capítulo 1

## Introducción

*H. quinquenervis* es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia Asteraceae, tribu Heliantheae y subtribu Verbesinae (Weber, 1952). Sus características botánicas la describen como una planta con hojas largas (superiores a 50 cm), lanceoladas, basales, opuestas o alternas, de tres a cinco nervaduras; la inflorescencia es de color amarillo brillante, sostenida por un pedúnculo largo y solitario (figura 1.1). Las raíces son leñosas y suelen dar origen a nuevos brotes



Figura 1.1: Planta y flor de *Helianthella quinquenervis*.

(figura 1.2); el fruto o aquenio está fuertemente comprimido lateralmente y presenta cerdas marginales (figura 1.3).

*H. quinquenervis*, crece en bosques de pino, frecuentemente en laderas cerca de afluentes de agua dulce y en lugares abiertos. Se distribuye en el norte de México, en los estados de Chihuahua y Nuevo León; al oeste de los Estados

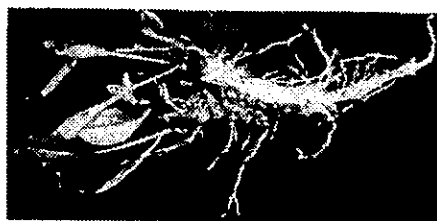


Figura 1.2: Raíces de *H. quinquenervis*.

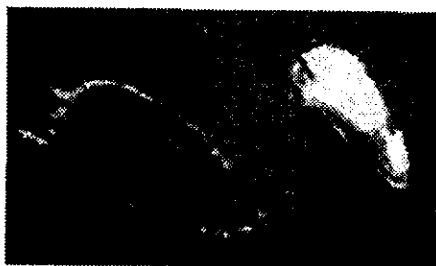


Figura 1.3: Semillas de *H. quinquenervis*.

Unidos en las Montañas Rocallosas y Canadá (Hertz, 1984).

*H. quinquenervis* resulta de particular interés para ser investigada por varias razones. Una de ellas es que los indígenas de la etnia Tarahumara conocen a la planta como “rarésoa” y la usan en su medicina tradicional y para eliminar ectoparásitos (Bye, 1985). Otro de los nombres con que se le conoce es “corso-nero”, y dentro de las propiedades que se le atribuyen, está la de combatir dolores musculares, así como aliviar la tos al ingerirla en infusión; de la misma forma se emplea para curar enfermedades gastrointestinales y úlceras. Las otras razones que se derivan de la anterior son de interés químico y biotecnológico por los compuestos bioactivos que produce esta especie y que pueden ser de utilidad en el campo de la agrobiología.

Estudios fitoquímicos de las partes aéreas (Hertz y Kulantaivel, 1984) y de las raíces (Gómez, 1993) de *H. quinquenervis*, permitieron el aislamiento e identificación de diferentes prenilacetofenonas, cromenos y benzofuranos. En la figura 1.4 se muestran las diferentes estructuras de estos compuestos.

La desmetilencecalina y la encecalina son compuestos que pertenecen al grupo de los acetilcromenos, en general los cromenos son meroterpenoides cuyo origen, dentro del metabolismo secundario vegetal, es el ácido shikimico; es característica de estos compuestos el anillo piránico y una unidad aromática

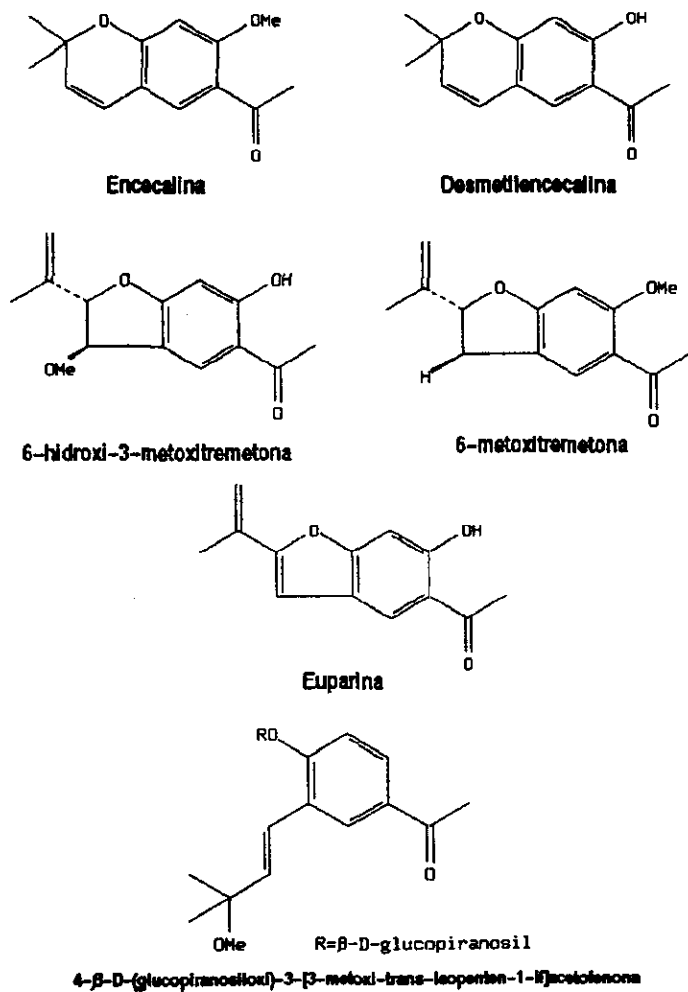


Figura 1.4: Compuestos aislados de *Helianthella quinquenervis* (Castañeda et al., 1996).



que conforman su estructura. Recientemente, investigaciones realizadas por Castañeda y Col. (1996, 1998) permitieron demostrar que algunos de estos compuestos poseen propiedades fitotóxicas, antifúngicas y citotóxica. De éstos, la encecalina y la desmetilencecalina son de particular interés debido a que se encuentran tanto en partes aéreas (Herz y Kulanthaivel, 1984), como en raíces de la planta, y poseen una actividad fitotóxica significativa.

# Capítulo 2

## Antecedentes

### 2.1 Metabolitos secundarios, consideraciones generales

Las plantas producen compuestos orgánicos que han sido clasificados como metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Estos compuestos son macromoléculas y algunas de ellas son funcionalmente activas y de gran importancia en el metabolismo de las plantas.

Para entender de dónde se derivan los metabolitos secundarios, es preciso conocer a los metabolitos primarios, éstos son sustancias distribuidas en todos los seres vivos. En plantas superiores, tales compuestos se encuentran en semillas (ej. triglicéridos) y en órganos vegetativos (almidón y sacarosa en raíces, rizomas y tubérculos) (Balandrin y Klocke, 1988). Los metabolitos primarios son indispensables debido a que intervienen en las funciones vitales de la célula, es decir, son necesarios para el metabolismo básico celular que involucra al crecimiento y al desarrollo fisiológico. El metabolismo primario no únicamente abastece al metabolismo secundario con precursores, algunos de estos precursores son importantes para la síntesis de constituyentes celulares; es por esta razón que frecuentemente hay una competencia por esos precursores entre el proceso de desarrollo y el metabolismo secundario. Como consecuencia, la síntesis de metabolitos secundarios ocurre especialmente cuando el desarrollo es lento o ausente, frecuentemente después de completar un proceso de diferenciación (Van der Plas et al., 1995).

Los metabolitos secundarios se derivan biosintéticamente de los metabolitos

primarios (carbohidratos y aminoácidos principalmente) (figura 2.1) y, aunque en un principio se creyó que eran compuestos de desecho, ahora se conoce que su papel es muy importante en la interacción de las plantas con su entorno. Algunos metabolitos secundarios desempeñan un papel importante como atrayentes de polinizadores pero también representan adaptaciones químicas al estrés ambiental, funcionan como defensas o protección ante el ataque de insectos u otros herbívoros, o bien pueden funcionar como inhibidores de crecimiento cuyo papel es importante en las relaciones de competencia por nutrientes y espacio con otras plantas. Por otra parte, la biosíntesis de estos compuestos frecuentemente permite relacionar grupos taxonómicos a nivel de división, subdivisión, clase, subclase, grupo, familia, género y especie, o grupos de familias cercanamente relacionadas (Gottlieb, 1990).

De acuerdo con Balandrin y Klocke (1988), en términos de economía celular, es caro producir y acumular metabolitos secundarios, por lo que se presentan en menores cantidades que los metabolitos primarios. Aunado a esto, está la facultad que tienen las plantas de sintetizar los metabolitos secundarios en células especializadas y almacenarlos en vacuolas, así como en distintos estados de desarrollo. Esto ocasiona que su extracción, aislamiento y purificación sean difíciles de lograr. Sin embargo, el hombre ha sabido explotar los productos de ambos metabolismos.

Los usos que se le han dado a los metabolitos secundarios de plantas incluyen la producción de medicamentos, insecticidas, saborizantes, colorantes, resinas, taninos, esteroides, saponinas, aceites volátiles, glicósidos, agroquímicos y fragancias. La mayoría de estos compuestos se extraen de plantas cultivadas o colectadas en el campo y su producción comercial suele ser muy costosa; en muy pocos casos se han obtenido los compuestos por síntesis química, cuando las moléculas son sencillas. Algunas estimaciones indican que los alcaloides codeína y morfina pueden alcanzar precios de \$650 a \$1,250 dólares por kg, el aceite de rosa \$2,000 y los alcaloides anticancerígenos aislados de *Catharanthus roseus* \$20,000 por gramo (Bajaj et al., 1988., Curtin, 1983).

Se sabe que el potencial de las plantas superiores como fuente de nuevos compuestos bioactivos está lejos de conocerse en su totalidad, se estima que de las 20,000-500,000 especies de plantas, únicamente un pequeño porcentaje ha sido investigado desde el punto de vista fitoquímico y el porcentaje en el área de farmacología es todavía menor (Hamburger y Hostettmann, 1991). Sin embargo, muchas plantas medicinales producen algunos metabolitos en suficiente cantidad como para ser comercializados, ejemplo de ello son la shikonina (Fujita, 1988),

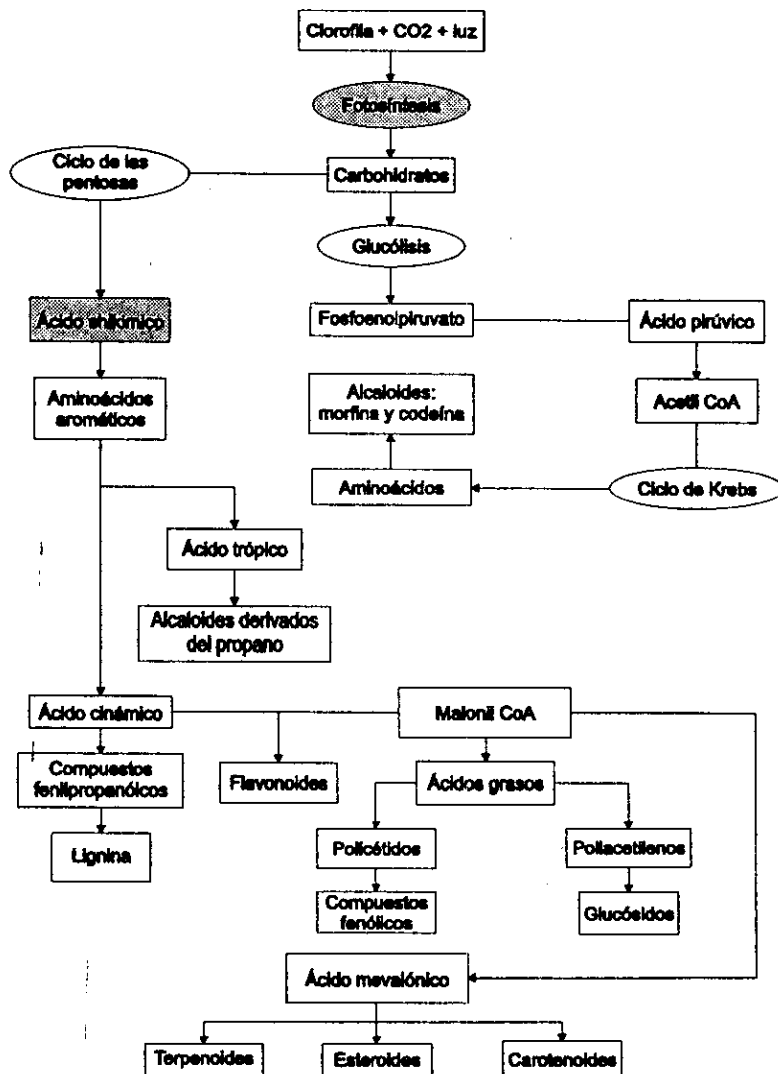


Figura 2.1: Principales vías del metabolismo secundario en las células vegetales. (Loyola-Vargas, 1984, en Robert et al., 1991).

la quinina, la digoxina, la efedrina, la morfina, la heroína, (Nigg y Seigler, 1992) y muchos otros se encuentran en investigación como la vinblastina y vincristina que han sido usados como agentes quimioterapéuticos en casos de leucemia (Hirata et al., 1994). Estos alcaloides diméricos son extremadamente difíciles de sintetizar químicamente por lo que se están usando otras tecnologías para su producción (Suga y Fujita, 1991).

En el caso de México, las plantas medicinales siguen siendo una de las principales fuentes de medicamentos dentro de la medicina tradicional, sobre todo en áreas rurales (Lozoya, 1990). Aunque en la industria farmacéutica se usan extractos de plantas como principios activos, se está retomando el uso de las plantas medicinales como agentes terapéuticos en varias partes del mundo (Akerele, 1990). Sin embargo, la sobreexplotación de recursos silvestres no domésticos, puede traer como consecuencia una reducción en el rendimiento, o la extinción de las especies (Robert et al., 1991).

Una alternativa interesante para la obtención de metabolitos secundarios bioactivos, es el uso del cultivo de tejidos vegetales (CTV) como una herramienta tecnológica para la generación de productos en condiciones controladas y su posible mejoramiento genético, con el fin de aumentar su producción. Por medio del CTV se puede tener un suministro continuo y homogéneo de materia prima en condiciones controladas (Loyola y Reyes, 1985). El CTV se está enfocando a la formación de productos, en el sentido de establecer la biosíntesis de estos compuestos, aislar las enzimas involucradas como biocatalizadores y finalmente, manipular y promover la síntesis de productos en este sistema (Stöckigt et al., 1995).

## 2.2 Metabolitos secundarios de plantas obtenidos por Cultivo de Tejidos Vegetales

La producción de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*, es un área de interés para la industria. La ventaja que provee este sistema es la independencia de variables ambientales como son el clima, la geografía y enfermedades que pueden disminuir el abastecimiento de la materia prima. Asimismo, el CTV puede contribuir a la producción de compuestos naturales mediante la síntesis de productos de plantas difíciles de crecer y a la bioconversión de precursores exógenos para la formación de los metabolitos deseados (Taticek et al., 1991). Esta idea se basa en los fermentadores o cultivos en suspensión similares

a los de microorganismos para la producción de antibióticos, compuestos alifáticos, flavonoides, fenólicos, esteroides y alcaloides, entre otros (Lozoya, 1987).

El CTV es una herramienta importante cada vez más empleada en diversos grupos de investigación para la producción de metabolitos secundarios y aunque son varias las plantas que por cultivo de células están produciendo metabolitos secundarios (Robert, et al. 1991), son pocos los casos en los cuales se han obtenido producciones a escala comercial (Mavituna, 1992).

En el CTV, el uso de reguladores de crecimiento es uno de los factores más importantes para su inicio, en la formación de callo y en la inducción de estructuras organizadas (órganos, embriones somáticos). Los reguladores de uso más frecuente son las auxinas y las citocininas; las primeras intervienen en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, su transporte basipétalo les confiere funciones biológicas específicas en procesos tales como son la dominancia apical, la comunicación entre raíz y tallo, la diferenciación de tejido vascular y elongación celular (Leysner, 1997; Macdonald, 1997). Las moléculas de las auxinas son lipofílicas y son capaces de entrar a la membrana celular por difusión hasta alcanzar niveles suficientes e inducir una respuesta fisiológica (Sitbon y Perrot-Rechenmann, 1997). A nivel molecular, las auxinas inducen modulación de la expresión de genes involucrados en la regulación del metabolismo de la pared celular y de otros genes y proteínas. Esto se ha detectado por el aumento de ciertos RNAm en las zonas de elongación de la planta (Gee et al., 1991). En el metabolismo secundario, la adición de auxinas parece inhibir algunos aspectos del metabolismo, generalmente por la disminución de RNA mensajeros que codifican enzimas involucradas en la producción de ciertos metabolitos secundarios, como el caso de meroterpenoides en *Catharanthus roseus* (Goddijn et al., 1992; Ozeki et al., 1990), aspecto que no se había detectado con la aplicación de citocininas.

Las citocininas, a su vez, controlan la expresión de genes a nivel transcripcional y postranscripcional en la síntesis de proteínas, en el desarrollo de los cloroplastos y en el metabolismo de los nutrientes, así como la síntesis de nuevas proteínas, provocado por los cambios en la abundancia de la actividad de proteínas específicas en respuesta a las citocininas. Esto se infiere por la abundancia de RNA específicos estimulados por estos reguladores de crecimiento (Schmülling et al., 1997).

La compleja interacción de las citocininas y las auxinas en los procesos fisiológicos y de desarrollo, es establecida mediante la regulación de la expresión de genes. Diferentes tipos de interacciones han sido notadas por su influencia, su

modulación de una ante la presencia de la otra o por su actividad antagónica en unos casos o sinergista en otros. Los estudios que se han realizado utilizando el CTV, están permitiendo conocer más detalladamente su comportamiento a nivel bioquímico y molecular; sin embargo son pocos los casos en los que estos conocimientos se han podido aplicar en la producción comercial y esto se debe a varios factores.

1. El primero y más importante es la baja producción de los metabolitos secundarios en las células.
2. El costo de producción puede no ser rentable.
3. Las células vegetales en cultivo en suspensión necesitan menor concentración de oxígeno que los sistemas bacterianos (Taticek et al., 1991). Además, la lentitud de crecimiento de las células aumenta significativamente el tiempo que se requiere para la producción de biomasa (Robert et al., 1991).
4. La tendencia de las células a formar agregados aumenta las dificultades en la oxigenación y asimilación de nutrimentos.
5. Muchos cultivos acumulan los metabolitos secundarios en vacuolas, lo que dificulta la extracción; este fenómeno provoca la necesidad de generar continuamente líneas celulares con las mismas características del cultivo productor.
6. Muchos cultivos necesitan tener un grado de diferenciación para poder sintetizar los metabolitos de interés; se sabe que las células indiferenciadas contienen los genes apropiados para la síntesis de los metabolitos secundarios, pero sólo se producen cuando tienen un grado de diferenciación. Un ejemplo de ello es que si se generan plantas a partir del cultivo de células, estas plantas son capaces de sintetizar y acumular los productos de interés; esto es porque las plantas muy frecuentemente acumulan los metabolitos en tipos especiales de células y órganos (Alfermann y Petersen, 1995).

Una alternativa es el uso de cultivos organizados o diferenciados. Otro ejemplo es el cultivo de raíces en el cual se controla el desarrollo con la adición de hormonas en el medio o a través de la transformación con *Agrobacterium rhizogenes*. Esta bacteria es capaz de infectar una amplia gama de plantas dicotiledóneas. El proceso de integración involucra a una porción del plásmido

de *Agrobacterium rhizogenes* en el genoma de la planta. Los genes codificados en la porción Ri-DNA aparentemente regulan, entre otras cosas, el balance de hormonas endógenas producidas por la célula transformada, dando como resultado la proliferación y un rápido crecimiento de raíces adventicias. También la porción Ri-DNA codifica genes que sintetizan azúcar, aminoácidos conjugados y opinas que la bacteria invasora puede utilizar como fuente de carbono. Estos cultivos son estables y se desarrollan más rápidamente que las raíces normales; por ello, su uso en la obtención de metabolitos secundarios está aumentando principalmente en el sector de investigación biotecnológica. (Flores et al., 1987; Taivonen, 1993).

A pesar de las dificultades que se tienen en la obtención de compuestos por medio de CTV, específicamente por cultivo de células en suspensión, son muchos los avances logrados, además de la potencialidad de su uso; en este contexto, se encontró que compuestos como la shikonina producida por Mitsui Petrochemical Ltd., tiene éxito comercial en Japón; el sabor natural de la vainilla de ESCAgenetics Corp., ginsenósidos de *Panax ginseng* por Nitto Denko Corp. o bien el taxol de Phyton Catalytic Inc., que posee actividad contra algunos tipos de cáncer de ovarios, senos y con actividad antimalárica, para el cual se han obtenido líneas celulares altamente productivas (Fujita y Hara, 1985; Hirasuna et al., 1996; Monitor, 1991; Nila et al., 1992).

El CTV ha servido también para realizar estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos, obtención de metabolitos secundarios, aislamiento de mutantes y producción de embriones somáticos (Szabados et al., 1991). En este último punto, extensas investigaciones se han enfocado a la automatización de los procesos de micropropagación para el uso comercial de la tecnología de CTV (Kozai et al., 1997).

Actualmente, el área para la obtención de compuestos con algún uso para el hombre, recibe un fuerte apoyo. Tanto es así, que ciertos procesos de obtención de metabolitos secundarios de origen vegetal han comenzado a desplazar a algunos de los procesos tradicionales de extracción, principalmente de saborizantes, colorantes, fragancias y algunos productos farmacéuticos.

En México, se tienen avances prometedores del uso del cultivo de células en suspensión de *Solanum chrysotrichum* para la producción de una saponina denominada SC-1. Este compuesto es un antimicótico usado para varios tipos de micosis de piel. Este sistema representa a una de las especies seleccionadas etnobotánicamente y que ha sido un importante remedio popular aprovechado por la vía de la biotecnología vegetal (Villareal et al., 1997).



En la actualidad, una de las tecnologías más usadas a partir del cultivo de células vegetales, es la biotransformación de compuestos; sistema que se basa en la capacidad bioquímica de los cultivos celulares para transformar *in vivo* una sustancia en otra. Un amplio rango de reacciones han sido observadas en este sistema, por ejemplo, la esterificación, oxidación, reducción, hidroxilación y glicosilación de moléculas. Al respecto, se le ha dado especial interés a la conversión de hidroquinona por diferentes sistemas de líneas celulares de *Datura inozia* y *Catharantus roseus*, estos cultivos transforman la hidroquinona en un  $\beta$ -D-glucósido llamado arbutina. La arbutina es un producto natural que se genera en hojas de diferentes plantas (*Pyrus communis*, *Bergenia crassifolia*) y los extractos son usados en la medicina moderna y tradicional para tratar infecciones uretrales. Recientemente, estos extractos han despertado gran interés como aditivos en cosméticos porque son eficientes supresores de la biosíntesis de melanina en la piel humana (Akiu et al., 1988; Stöckigt et al., 1995).

Sin duda, la investigación del metabolismo secundario, sus rutas, así como el potencial del CTV permitirán el descubrimiento de nuevos compuestos, y nuevas formas de producción con altas posibilidades de uso para el hombre.

### 2.3 Cromenos y benzofuranos de algunas especies de la familia Asteraceae

Los cromenos (benzopiranos) y los benzofuranos, son metabolitos secundarios característicos de algunas de las especies pertenecientes a la familia Asteraceae, se encuentran frecuentemente en grupos de tribus relacionadas, incluyendo la Astereae, Eupatorieae, Heliantheae, Inulae y Senecioneae (Proksch y Rodríguez, 1983).

Los estudios que se han realizado hasta el momento, establecen que los cromenos enecalina y desmetilencecalina, se han detectado en especies como *Helianthella uniflora*, *Encelia farinosa*, *Encelia californica* y en *Helianthella quinquenervis* por mencionar algunos ejemplos. En las dos especies del género *Helianthella*, los compuestos encontrados en las raíces no difieren químicamente (Herz y Kulanthaivel, 1984).

La enecalina y desmetilencecalina, presentan actividad biológica como repelentes de insectos herbívoros y en algunas especies se ha tratado de establecer la ruta y lugar de biosíntesis, tal es el caso de *Ageratina adenophora*. Esta especie pertenece a la misma familia que *H. quinquenervis*, y en ella se determinó

la distribución órgano-específica de derivados de cromenos y su acumulación en relación con su ontogenia. En este estudio se encontró que 80% de los cromenos se acumulaban en el mesófilo de las hojas, 18% en el tallo y 2% en las raíces. La enecalina estuvo presente en plantas viejas, pero la dimetilencecalina dominó en plantas jóvenes justo después de la germinación. Se ha propuesto que la bioconversión de los compuestos, procede de la desmetoxiencecalina vía hidroxilación, produciendo la desmetilencecalina, seguida por una metilación que da origen a la enecalina. Cuando las plantas jóvenes fueron tratadas con una solución de glifosato, conocido como inhibidor de la ruta del ácido shikímico, se encontró con más del 50% de la reducción total de los cromenos. De acuerdo a Proksch et al. (1986), estos datos indican fuertemente que los cromenos derivados de *A. adenophora* se originan de una acetofenona, compuesto derivado de la ruta del ácido shikímico.

Mediante el cultivo de tejidos vegetales, específicamente por medio del cultivo de células en suspensión de *A. adenophora*, se determinó que ninguno de los cromenos y benzofuranos encontrados en la planta se sintetizaba en el cultivo en suspensión. Para la inducción de los compuestos se llevó a cabo la biotransformación por parte del cultivo, agregando desmetoxiencecalina, desmetilencecalina y enecalina separadamente, y se analizó la respuesta por HPLC. Los resultados mostraron que con los dos primeros compuestos había una rápida biotransformación a compuestos más polares, en tanto que al adicionar la enecalina, su concentración permaneció en un 80% de la concentración inicial; con ello, se concluyó que las células tienen la capacidad bioquímica de sintetizar compuestos derivados de desmetoxiencecalina y desmetilencecalina, pero no así de la enecalina (Proksch et al., 1987).

Otros de los compuestos que se han encontrado en *H. quinquenervis* son el ácido angélico (Gómez, 1993) y la euparina. El primero se encuentra también en la especie *Anthemis nobilis*, cuyos ésteres se ocupan en la industria de la perfumería (Balandrin y Klocke, 1988); el segundo, pertenece al grupo de los benzofuranos y se le ha encontrado en raíces de *Eupatorium cannabinum*. Al parecer la fenilalanina y el ácido cinámico son los precursores biogénicos de los benzofuranos. A pesar de que más de 200 cromenos y benzofuranos han sido aislados, su biosíntesis es todavía en gran parte desconocida (Siebertz et al., 1989).

De acuerdo con Proksch (1991), el cultivo de células ofrece una alternativa práctica para investigar el proceso metabólico relacionado con la biosíntesis, biotransformación e inducción de cromenos y benzofuranos. Basándonos en la

plasticidad del CTV, es posible obtener sistemas productores de los compuestos de interés, o bien conocer qué condiciones se requieren para su síntesis.

Los estudios más recientes que han determinado alguna actividad relacionada con estos compuestos, están reportados por Castañeda et al. (1996), en un trabajo en el que se elucidan las moléculas que le confieren a *H. quinquenervis* las propiedades fitotóxica, citotóxica y -según se ha reportado- fungicida, reconocidas de sus raíces, siendo la enecalina y la desmetilencecalina los compuestos que presentaron mayor actividad fitotóxica y fungicida. Para la desmetilencecalina se reportó un efecto citotóxico moderado en dos líneas celulares de tumores de seno y colon en humanos. Asimismo, se describe que la enecalina provoca un efecto herbicida post-emergente en diversas especies de arvenses causando necrosis, desecación de partes aéreas, y -al igual que la desmetilencecalina- inhibe la síntesis de ATP, el transporte de electrones basal, e interviene en la captación de protones durante la fotosíntesis. El efecto se ha detectado a nivel del fotosistema II, por lo que su blanco de acción se estableció entre la  $P_{680}$  y  $Q_B$ .

Merril (1989) determinó que la enecalina y la desmetilencecalina provocan un efecto negativo sobre el crecimiento radicular de varias especies (*Panicum miliaceum*, *Echinochloa crusgalli*, *Medicago sativa* y *Lolium perenne*). Por su parte, Srivastava y Proksch (1990), detectaron que la enecalina presenta actividad contra insectos herbívoros. Estos compuestos le confieren a las plantas que los producen un mecanismo de defensa natural. Sin embargo, también se ha encontrado que hay una especie de escarabajo resistente a la acción de la enecalina, la cual metaboliza y forma otro compuesto menos activo (Kunze et al., 1996).

Las propiedades descubiertas para algunos de los cromenos existentes les confieren potencialidad en la producción de herbicidas. Las ventajas que éstos pueden llegar a presentar ante muchos herbicidas comerciales, es que pueden ser compuestos biodegradables, menos tóxicos para otros organismos, presentar mecanismos de acción específicos y los costos de producción pueden ser más bajos.

## 2.4 Elicitores, su papel en la inducción de metabolitos secundarios en plantas

Las plantas son hospederos de cientos de enfermedades causadas por fitopatógenos como hongos, bacterias, virus, insectos y nemátodos responsables de grandes pérdidas en los cultivos. Sin embargo, la mayoría de las plantas reconocen y resisten algunas invasiones fitopatógenas induciendo una rápida respuesta de defensa (Baker et al., 1997).

El método de reconocimiento de los fitopatógenos por las plantas, involucra la presencia de genes que codifican para receptores que se encuentran en la membrana plasmática, y que interactúan directa o indirectamente con elicitores producidos por los patógenos; algunos de estos genes han sido reconocidos como *Avr*. Los eventos moleculares que constituyen la interacción planta-patógeno, al parecer, envuelven el mecanismo de receptor-ligando para el reconocimiento del patógeno y la inducción de señales de transducción en la planta que guía las respuestas de defensa; también están involucrados la producción de agentes antimicrobianos llamados fitoalexinas, enzimas hidrolíticas (quitinasa y  $\beta$ -glucanasa), barreras estructurales de lignina, compuestos químicos de defensa como  $H_2O_2$  y células con paredes ricas en hidroxiprolina (Dixon y Harrison, 1994; Darnell et al., 1990), así como una rápida oxidación intra y extra celular que constituyen la respuesta hipersensible (Levine et al., 1996).

En el caso de los elicitores fúngicos, se distingue la producción de fragmentos de oligosacáridos de la pared de los hongos ( $\beta$ -glucanos, quitina o quitosán). La interacción entre el hongo fitopatógeno y la célula vegetal provoca una serie de cambios metabólicos en la célula hospedera y una serie de cambios a nivel de expresión genética. Las señales bioquímicas iniciales reconocidas por la célula vegetal están contenidas en las moléculas elicitoras. Estas moléculas elicitoras pueden ser abióticas, metales pesados, por ejemplo, o bióticas, las cuales se derivan de paredes celulares de hongos fitopatógenos, o de paredes celulares de plantas liberadas por las enzimas del hongo invasor (Davis et al., 1993). Respuestas tales como la expresión de quitinasa o biosíntesis de fitoalexinas pueden contribuir al lento crecimiento del patógeno, pero frecuentemente no bloquean la enfermedad (Maher et al., 1994; Zue et al., 1994). Por eso es importante distinguir entre elicitores específicos producidos como resultado de la expresión de genes *Avr* que confieren una efectiva resistencia al daño, y los elicitores no específicos, tales como fragmentos de paredes que inducen la respuesta de las

fitoalexinas antes mencionadas (Bent, 1996).

El concepto de fitoalexina fue propuesto por Müller y Börger en 1941, dándosele el significado de protector producido por las plantas. El postulado más importante de este término es que las fitoalexinas son sustancias que inhiben el desarrollo de hongos mediante una respuesta hipersensible del tejido formado, activado únicamente cuando la célula hospedera tiene un contacto íntimo con el parásito (Deverall, 1972). Esta respuesta hipersensible fue observada como granulación del citoplasma y color pardo en la célula hospedera limitando al parásito en el sitio de invasión.

La resistencia de las plantas a los componentes de pared de los hongos, está frecuentemente relacionada con el incremento en la actividad de las peroxididasas (Shimoni et al., 1991), actividad que podría estar involucrada con un amplio rango de oxidación de fenoles, uno de los principales causantes de la aparición de lesiones necróticas en las plantas y de una fuerte actividad antimicrobiana (Alam et al., 1991). Las peroxididasas, al catalizar la oxidación de diversas sustancias orgánicas (ej. componentes del medio nutritivo) a peróxidos que son altamente tóxicos para la célula, incrementan la toxicidad del medio; sin embargo, las catalasas descomponen esos peróxidos en agua y oxígeno que resultan inocuos para la actividad celular. De acuerdo con Brenton (1997), la peroxidación de las fitoalexinas producidas por la planta para detener a los hongos, puede ser más fungitóxicas que las fitoalexinas por sí mismas. Aunado a este proceso, está la entrada de cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula. El efecto que esto provoca es la reducción de la actividad antifúngica en la defensa de la planta (Broekaert et al., 1995).

La producción de compuestos que intentan detener el ataque de fitopatógenos tiene la potencialidad de ser aplicado en la agricultura para proteger los cultivos de las enfermedades. De acuerdo con Paxton (1988), el uso de elicitores en la agricultura es muy promisorio ya que las fitoalexinas tienen un importante papel en la resistencia a enfermedades, tienen actividad antimicrobiana y bajo peso molecular. Estos compuestos son sintetizados y acumulados en las plantas después de exponerse a microorganismos y su biosíntesis puede ser derivada de fenoles; las plantas los sintetizan del aminoácido aromático fenilalanina y es un proceso repetible; lo que le confiere un valor adicional en su uso es que se trata de un sistema inducible. También la infección por microorganismos patógenos induce la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios *in vitro*; de la misma forma, la adición de extractos microbianos induce la síntesis de compuestos como flavonoides, alcaloides y cumarinas de las células cultivadas *in*

*in vitro*. Ejemplos de ello son la producción de escopoletina en *Hevea brasiliensis*, la acumulación de este compuesto está directamente relacionada con la resistencia a dos hongos fitopatógenos (Brenton et al., 1997); así como la inducción de furanocumarina en cultivo de células vegetales de *Ruta graveolens* por medio de un elicitador, como resultado de la activación de enzimas de la ruta biosintética (Bohlmann et al., 1995).

## Capítulo 3

# Justificación

*H. quinquenervis* es una planta de interés para diferentes disciplinas como la etnobotánica, el cultivo de tejidos vegetales y la fitoquímica entre otras, debido a la producción de algunos metabolitos secundarios con actividad biológica comprobada, por la importancia que tiene como planta medicinal en algunas poblaciones de la Sierra Tarahumara y por sus implicaciones ecológicas, ya que algunos de sus compuestos resultan ser tóxicos para otras plantas e insectos. Esta especie crece en algunas localidades del estado de Chihuahua por lo que es de suma importancia conocer y proponer una estrategia de aprovechamiento y conservación. El hecho de que sean las raíces de las plantas la parte más aprovechada, la hacen susceptible de reducir sus poblaciones. Por otra parte, la cantidad de enecalina encontrada tanto en raíces como en hojas es mayoritaria dentro de los diferentes compuestos que produce de manera *in vivo*, siendo factible obtener suficiente cantidad de ellas. En este caso, la propagación por CTV garantizaría la existencia y aprovechamiento de la planta.

Para conocer la producción de los metabolitos de interés en el sistema de cultivo de tejidos, ya sea por cultivo de la planta o el cultivo de células en suspensión, se propone un sistema experimental que nos permita conocer los compuestos que produce la planta, y aunque es sabido que muchas plantas bajo este sistema no producen los compuestos de interés, también es cierto que una vez que se tienen las líneas celulares, es posible seleccionar, mejorar y transformar dichas células para obtener de ello algún provecho y producir información útil para el conocimiento de la biodiversidad, el conocimiento fitoquímico y etnobotánico, así como posibilitar un beneficio para la comunidad regional donde crece, por medio del aprovechamiento racional del recurso.

# Capítulo 4

## Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Detectar la presencia de cromenos (encecalina y desmetilencecalina) en diferentes cultivos *in vitro* de *Helianthella quinquenervis*.

### 4.2 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones óptimas de germinación *in vitro* y en suelo.
- Inducir cultivos de callo.
- Inducir cultivos de células en suspensión.
- Inducir cultivos de raíces *in vitro*.
- Elicitar el cultivo de células en suspensión con *Fusarium* sp.
- Identificar los compuestos producidos en los diferentes sistemas.



## Capítulo 5

# Materiales y Métodos

### 5.1 Estrategia general

#### 5.1.1 Primera etapa

Se colectó el material vegetal, que consistió en raíces, hojas y semillas, en algunas localidades de la Sierra Tarahumara de Chihuahua. Con este material se determinaron las condiciones óptimas de germinación *in vitro* y en suelo. Con las plantas obtenidas *in vitro* se diseñaron varios experimentos con los objetivos de:

1. obtener a partir de hojas y tallo, callo en medios nutritivos y con la adición de reguladores de crecimiento,
2. establecer a partir de este callo cultivo de células en suspensión y
3. determinar su cinética de crecimiento.

#### 5.1.2 Segunda etapa

Se utilizaron diferentes técnicas fitoquímicas como la extracción de compuestos mediante el uso de solventes y el uso de cromatografía de capa fina y de gases acoplada a espectrometría de masas, para detectar en los sistemas *in vivo* e *in vitro*, la presencia de los compuestos de interés, principalmente de la enecalina, desmetilencecalina y euparina.

### 5.1.3 Tercera etapa

La tercera etapa fue inducir el crecimiento de raíces en medios nutritivos, así como elicitación del cultivo de células en suspensión con *Fusarium* sp, para posteriormente hacerles un análisis químico. En el caso de la elicitación de los cultivos, se trató de inducir la síntesis de los compuestos de interés, estresando a la planta con un homogenizado esterilizado de un hongo patógeno (Saad, 1996). Por último, se hizo un ensayo biológico sobre semillas de *Echinochloa crusgalli* con los extractos obtenidos de estos sistemas para determinar su posible actividad fitotóxica. Esta especie es uno de varios modelos utilizados para determinar fitotoxicidad, ya que es una planta que puede desarrollarse como maleza en los cultivos agrícolas, además de presentar una respuesta rápida de germinación (42 horas) y por lo tanto de reacción ante los compuestos probados.

Con los experimentos anteriormente descritos, se pretende conocer más el comportamiento fisiológico de la planta expuesta a condiciones que pueden generar o inhibir la producción de algunos de sus metabolitos secundarios.

## 5.2 Material vegetal

Las semillas de *H. quinquenervis* se colectaron en el estado de Chihuahua en dos localidades, en la ladera Noreste del río San Ignacio Arareco a una altitud de 2,480 msnm y en la ladera del río Terros a una altitud de 2,480 msnm, en el mes de octubre de 1996. Las plantas herborizadas se encuentran en el Herbario Nacional de México (MEXU) Robert Bye No. de colecta 19202 y 21306.

## 5.3 Medios de cultivo

El medio básico utilizado con el material vegetal fue el Murashige-Skoog, MS (1962).

1. Medios sólidos. Los medios sólidos están constituidos por el medio MS, 30 g/l de sacarosa, 150 mg/l de ácido ascórbico y 9 g/l de agar. Estos medios se sometieron durante su preparación a una agitación constante y tiempos prolongados de calor para disolver el agar.
2. Medios líquidos. Están constituidos por los componentes del MS y 30 g/l de sacarosa, sin ácido ascórbico. Para el cultivo de células en suspensión se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio.

3. Medio PDA. Este medio se utilizó para inocular en él al hongo *Fusarium* sp y obtener biomasa suficiente para preparar el homogenizado. El medio se preparó con 100 g de papa cruda en trozos, éstos se enjuagaron varias veces y se esterilizaron en 250 ml de agua destilada durante 15 min en autoclave a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Posteriormente, se hizo un filtrado del extracto de papa y se le adicionaron 7 g de dextrosa (glucosa refinada del almidón de maíz) y 8 g de agar. Por último se aforó a 500 ml con agua destilada y se esterilizó en autoclave. Se agregaron aproximadamente 25 ml de medio a cada caja de Petri de 15x10 ml en condiciones estériles, se dejó solidificar y al día siguiente se utilizó para inocular un poco de micelio de *Fusarium* sp aislado de la especie *Piqueria trinervia* (Cav) (Saad, 1996), especie que crece en un hábitat parecido al de *H. quinquenervis* y que pertenece a la misma familia.

En los casos 1 y 2, los medios se aforaron al volumen de medio deseado, se ajustó el pH a 5.7 con NaOH 0.5 y 0.1 N y con HCl 0.5 N. Para los tratamientos con medio sólido, los frascos de cultivo de 150 ml contuvieron 25 ml de medio nutritivo. Todos los medios y diversos materiales esterilizados se sometieron a 1.5 kg/cm<sup>2</sup> de presión, 120° C durante 15 min (el suelo se esterilizó 20 min).

## 5.4 Germinación

Las variables que se consideraron para estandarizar la germinación de las semillas fueron:

**Escarificación:** semillas escarificadas, la escarificación consistió en la eliminación de la cubierta seminal de cada semilla y semillas sin escarificar, ambas sembradas en germinadores con algodón (frascos de 150 ml conteniendo algodón humedecido con 40 ml de agua destilada esterilizada). A partir de este experimento, todas las semillas utilizadas fueron escarificadas.

**Exposición a la luz:** semillas expuestas a fotoperiodo de 16 h luz y semillas expuestas a oscuridad, en germinadores con algodón.

**Sustrato utilizado:** semillas en germinadores con 30 ml de MS líquido, semillas en MS sólido y en suelo.

### 5.4.1 Desinfestación de las semillas

Para la germinación *in vitro*, las semillas se desinfestaron superficialmente de la siguiente manera: se lavaron con detergente comercial durante 5 min y se enjuagaron en agua corriente, se agitaron en etanol al 70% durante 1 min y posteriormente en hipoclorito de sodio al 2.4% durante 30 min. Las semillas se enjuagaron con agua destilada esterilizada en condiciones asépticas y la siembra se hizo en una campana de flujo laminar. Se sembraron 5 semillas por frasco con 6 repeticiones y la respuesta se evaluó considerando germinadas las semillas cuando el hipocótilo había emergido.

### 5.4.2 Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales para las semillas fueron: fotoperiodo largo de 16 h luz, 8 de oscuridad y luminancia de 1,600 lux a 27° C.

### 5.4.3 Siembra en suelo

Para la siembra en suelo, éste se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120° C y 1.5 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Una vez que se enfrió el suelo, las semillas se desinfestaron como se describió anteriormente y se colocaron 20 semillas por surco con cinco repeticiones para cada una de las dos variables, escarificadas y sin escarificar. Los germinadores permanecieron en condiciones de invernadero y se cuantificó la respuesta cada tercer día. Las plantas que se germinaron en el suelo, fueron transferidas posteriormente a bolsas de plástico con capacidad para 3 kg de suelo y se dejaron desarrollar en el invernadero.

## 5.5 Eliminación de la contaminación bacteriana

Debido a la alta frecuencia de contaminación detectada durante la germinación y el desarrollo de las plántulas, se procedió a hacer una evaluación del tipo de contaminante y las condiciones en que éste se presentó en los cultivos. Para ello, se tomaron muestras de semillas contaminadas y se hizo un monocultivo. De éste, se hicieron preparaciones en láminas y se observaron al microscopio.

El contaminante principal resultó ser un cultivo de bacterias, por lo que se utilizaron dos tipos de antibióticos, gentamicina y carbencilina en una concentración de 50 mg/l, que fueron adicionados por filtración al medio previamente

esterilizado y se evaluó su eficacia en dos colectas diferentes de semillas. Se realizaron también pruebas de hipersensibilidad con la inoculación de la bacteria en rodajas de papa y hojas de tabaco, en medio PDA y en MS. Estas pruebas se hicieron en el Colegio de Postgraduados de Chapingo, en el Instituto de Fitosanidad.

## 5.6 Inducción de callo

La inducción en callo se llevó a cabo en medio MS sólido. Explantes de secciones de tallo de 1.5 cm<sup>2</sup> (con entrenudo) y secciones de hojas inmaduras de 1.5 cm<sup>2</sup> se disectaron de plantas procedentes de semillas germinadas *in vitro* de dos meses de desarrollo. Los explantes fueron sembrados en MS con distintas combinaciones de BAP, ANA, 2,4-D y K.

Por cada tratamiento se colocaron 4 explantes con 10 repeticiones. La respuesta se cuantificó 30 días después de la siembra, por número de explantes que desarrollaron callo y biomasa (peso fresco) en ambos explantes.

## 5.7 Cultivo de células en suspensión

### 5.7.1 Establecimiento

Para inducir el cultivo de células en suspensión se tomaron aproximadamente 2 g de callo inducido en medio MS sólido y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de medio MS líquido. A partir de varias combinaciones de reguladores de crecimiento (ver resultados), se seleccionaron los de 1 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de 2,4-D. Estos cultivos líquidos primero se subcultivaron cada 25 días durante 4 meses y posteriormente se transfirieron a un medio denominado B3 (1 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA).

Una vez inducido el cultivo de células en suspensión, se mantuvo sin cambios en cuanto a la forma de las células y coloración del medio, los subcultivos se realizaron cada 15 días. En cada subcultivo, las células se filtraron con una malla metálica de 104 µm. Los matraces se mantuvieron en una plataforma de agitación orbital a 100 rpm, primero con fotoperiodo de 16 h luz y posteriormente se trasladaron a penumbra para evitar su oxidación.

Una segunda línea celular se indujo a partir de callo cultivado en medio MS con 1 mg/l de ANA. Este tratamiento fue elegido de experimentos previos con

este regulador, en concentraciones de 0.1 a 0.5  $\mu\text{g/l}$  y posteriormente se duplicó la concentración.

### 5.7.2 Efecto de la sacarosa sobre la turgencia celular.

Para determinar el posible efecto de la agitación de los cultivos y de la sacarosa sobre la turgencia de las células, se ensayaron las concentraciones de 20 g/l y 30 g/l. Se realizaron observaciones en el microscopio estereoscópico para determinar la apariencia (turgencia) celular.

### 5.7.3 Cinética de crecimiento

Para determinar la velocidad del crecimiento del cultivo de células, se pesaron 4 g de células del medio B3 previamente filtradas y se colocaron en matraces Erlenmeyer conteniendo 50 ml del mismo medio. Los 30 matraces se colocaron en un agitador orbital y se tomaron tres matraces por cada punto de la curva. Las muestras se tomaron diariamente los primeros cinco días para detectar la presencia de una fase "lag" y posteriormente cada 5 días. De cada muestra se cuantificó el paquete celular, el contenido de proteína, peso fresco y peso seco. Para medir el paquete celular, el volumen de cada matraz se transfirió a tubos de plástico graduados con capacidad de 50 ml y se centrifugaron en una centrifuga de columpio Beckman TJ-6, a 4,000 rpm durante 15 min, posteriormente se registró el volumen ocupado por las células; para el peso fresco, la biomasa centrifugada se pesó y este mismo material se utilizó para determinar el peso seco, para lo cual se colocaron las muestras en cajas de Petri y éstas en una estufa a 50° C durante una semana. Se sacó la media de los tres datos tomados por cada punto y se hizo la curva de crecimiento. La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Lowry aplicada a 100 $\mu\text{l}$  de muestra, tomada de una solución de 0.5 g de células del cultivo en suspensión en 5 ml de agua destilada. Se hizo una curva de calibración con albúmina.

### 5.7.4 Elicitación del cultivo en suspensión

Una vez que se contó con micelio suficiente en las cajas de Petri, se tomó 1 cm<sup>2</sup> del mismo para propagar el micelio a un volumen mayor, por lo que se sembró en matraces de 250 ml con 50 ml de medio PDA líquido y se mantuvo a 100 rpm. Debido a la consistencia del micelio, se homogenizó en una licuadora y se agregaron 5 ml de éste, en cada uno de los 10 tubos de ensayo utilizados para

facilitar su aplicación a los matraces, y se esterilizaron en autoclave. Se utilizó un tubo con el homogenizado del hongo por matraz con el cultivo de células en suspensión, se hicieron 6 repeticiones. La evaluación de elicitación se hizo durante las primeras 36 horas a partir de la adición del hongo.

Para la elicitación del cultivo, se agregaron 5 ml del homogenizado de *Fusarium* sp, a matraces con 50 ml de cultivo de células en suspensión y se dejó en estas condiciones durante 36 h. Transcurrido ese tiempo, las células se separaron del medio por filtración y se hizo una extracción con cloroformo tanto de las células elicidadas como del medio de cultivo.

## 5.8 Inducción de raíces

### 5.8.1 Cultivo de raíces obtenidas de plantas *in vitro*

Se disectaron las raíces desarrolladas en plantas germinadas *in vitro* de dos meses de edad, se enjuagaron sobre una malla metálica con agua destilada esterilizada para eliminar residuos de agar y se colocaron en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio MS líquido. Las auxinas utilizadas en los medios fueron 2,4-D, IBA y ANA en concentración de 0.25 mg/l. Se inocularon cinco matraces por cada concentración y se evaluó la respuesta a los 30 días de cultivo.

### 5.8.2 Cultivo de raíces a partir de tallo y hoja

La formación de raíces se indujo a partir de explantes de hoja y tallo de plantas *in vitro* con la finalidad de comprobar la necesidad de la diferenciación del tejido para la síntesis de los metabolitos de interés. Los explantes se colocaron en medio MS adicionado con 1 mg/l de ANA; 4 explantes por frasco con 10 repeticiones. Una vez que hubo formación de raíces, se sacaron del medio para su extracción.

## 5.9 Análisis fitoquímicos

Se hicieron extractos de las semillas colectadas, de hojas y raíces (tejido diferenciado) de plantas desarrolladas *in vitro* de dos meses de edad y de plantas colectadas en el campo, de callo de consistencia friable de distintos tratamientos, del cultivo de raíces *in vitro*, del cultivo de células en suspensión (tejido

indiferenciado), y finalmente del cultivo en suspensión elicitado. En estos dos últimos cultivos, se hizo una extracción de los medios líquidos.

Las extracciones se hicieron con el material vegetal fresco empleando cloroformo como disolvente de extracción. Los extractos se filtraron y concentraron en un evaporador, para posteriormente detectar la presencia de los constituyentes mayoritarios obtenidos previamente de las raíces de *H. quinquenervis*. La detección de estos metabolitos secundarios se realizó por CCF, mediante la coelución de los extractos obtenidos, con muestras auténticas de la encecalina, desmetilencecalina y euparina. Para ello, se emplearon placas de vidrio recubiertas con sílica gel y como sistema de elución, una mezcla de benceno-cloroformo en relación 9:1. Posteriormente, se procedió a visualizar las placa con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm). Como agente cromógeno se empleó una solución reactivo de sulfato cérico.

Para determinar la presencia de los compuestos de interés y cuantificarlos, se realizó el análisis por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para algunas de las muestras.

Los análisis mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases HP acoplado a un espectro de masas modelo Jeol JMS-SX 102 A, mediante la inyección de 0.1  $\mu$ l de cada una de las muestras de prueba, en una columna capilar PAS-1701-Tested Silicone HP5. Se utilizó helio como gas acarreador a una presión manométrica de 0.4 kg/cm<sup>2</sup> y con un flujo de 1 ml/min. La temperatura del inyector se mantuvo en 280°C, la temperatura inicial de la columna fue de 150°C y se programó para alcanzar una temperatura de 260°C con un calentamiento gradual de 10°C/min.

Para los registros de los espectros de masas para el impacto electrónico, se utilizó como condición experimental un voltaje de 70 eV. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 50 a 800 unidades de masa/carga (m/z) por segundo.

Los análisis de CG-EM se realizaron en la Unidad de Servicios en Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

En el caso del compuesto de color amarillo producido en el cultivo de células en suspensión, se realizaron análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa, IR (infrarojo), y RMN-<sup>1</sup>H (resonancia magnética nuclear protónica).



## 5.10 Pruebas biológicas

La actividad fitotóxica de los extractos obtenidos se determinó midiendo el efecto de los mismos sobre el crecimiento radicular de las semillas de *Echinochloa crusgalli*, de acuerdo con la siguiente metodología (Anaya et al., 1990).

Los extractos obtenidos de los sistemas *in vitro* se disolvieron en cloroformo para preparar disoluciones finales de 5, 50 y 500  $\mu\text{g/ml}$ . En cajas de Petri de 10x100 mm, se colocaron discos de papel filtro, a los que se adicionaron 2 ml de cada una de estas disoluciones y el disolvente se eliminó por evaporación. Posteriormente, se adicionaron 3 ml de agua destilada sobre los discos de papel y se colocaron 10 semillas de *Echinochloa crusgalli*. Las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron en una estufa a 30°C en la obscuridad. Transcurridas 48 h se cuantificó el porcentaje de germinación y el crecimiento radicular. Se usaron como controles negativos agua y cloroformo y 2,4-D como control positivo a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Se hicieron tres repeticiones por tratamiento; los resultados se analizaron mediante la prueba de ANOVA ( $p > 0.05$ ) y de Tukey para determinar diferencia significativa de los extractos utilizados en su carácter de inhibidores del crecimiento de raíz.

## 5.11 Estrategia general

La figura 5.1 ilustra, a manera de resumen, la metodología general utilizada a lo largo de toda la experimentación.

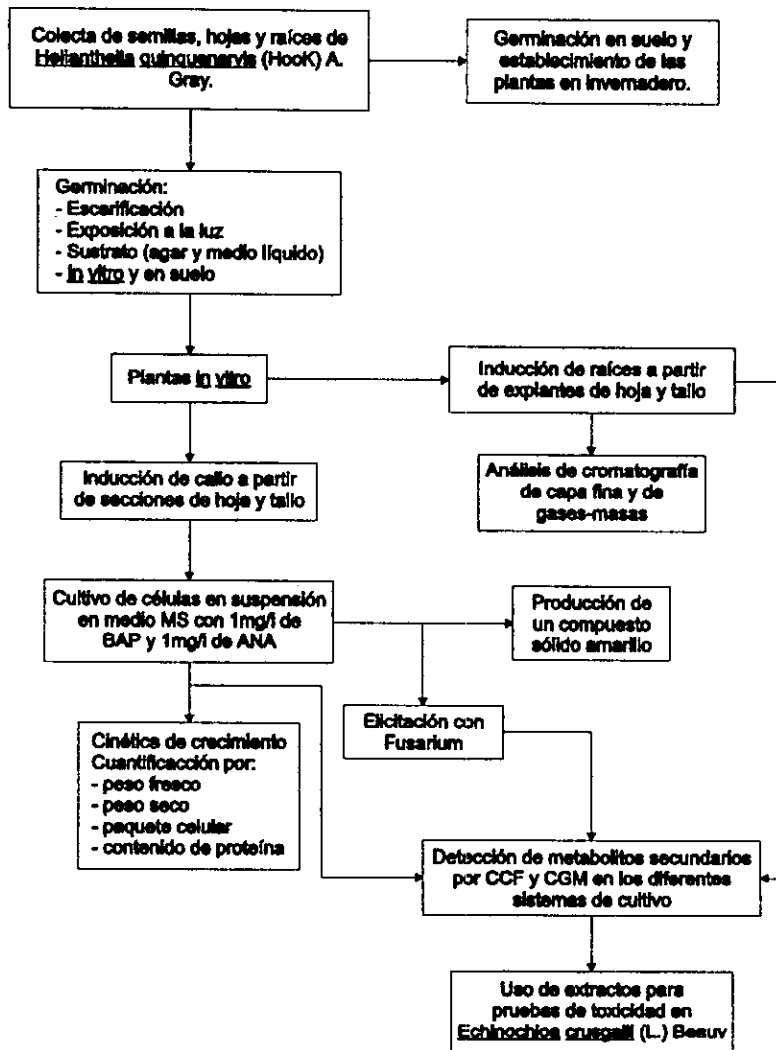


Figura 5.1: Metodología general.

## Capítulo 6

# Resultados y Discusión

### 6.1 Germinación

Los resultados de las diferentes variables evaluadas para optimizar la germinación, se muestran en la gráfica 6.1.

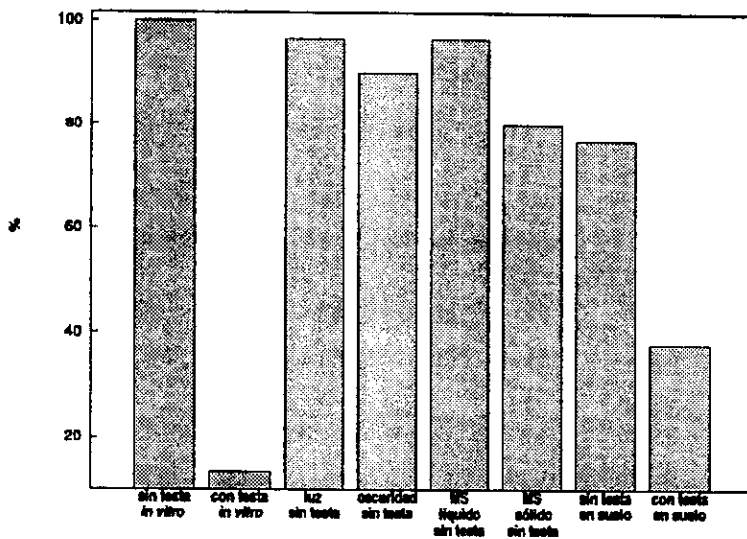


Figura 6.1: Germinación de *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray a los 25 días de siembra.

**Escarificación:** en germinadores de algodón, las semillas que fueron escarifica-

das mostraron una tasa de germinación de 100%, mientras que las semillas que mantuvieron la cubierta seminal mostraron tan solo un 13.3%, lo que corresponde a una proporción de 4/30. A partir de estos resultados las semillas utilizadas en los siguientes experimentos fueron escarificadas.

**Exposición a la luz:** en condiciones de obscuridad se obtuvo 90% de germinación; en este caso, las plantas crecieron etioladas, lo cual fue reversible cuando fueron colocadas en un lugar con iluminación. Las semillas expuestas a fotoperiodo de 16 h luz y 8 h obscuridad tuvieron una respuesta de germinación de 96%. En ambos casos las semillas tuvieron el mismo tipo de sustrato (germinadores con algodón) y la germinación presentó porcentajes altos.

**Sustrato utilizado:** en germinadores con MS líquido el porcentaje de germinación fue de 97% con una proporción de 29/30. En el caso de MS sólido, la proporción fue de 24/30, lo que corresponde al 80%. En suelo, las semillas sin escarificar presentaron tan solo un 38% de germinación a los 25 días de evaluación. Las semillas escarificadas bajo las mismas condiciones presentaron 77% de germinación (77/100).

Resultados similares a los del presente estudio son reportados por Smith y colaboradores (1997). Las semillas de pecana que ellos utilizaron, no fueron escarificadas y observaron que éstas germinaron lentamente, al removerse la cubierta seminal se redujeron los tiempos de germinación y se logró de manera uniforme.

En nuestro caso, la diferencia que presentaron los tratamientos con testa y sin testa, pueden deberse a la presencia de la cubierta seminal, pues aunque ésta es permeable al agua y gases, retarda la germinación por restricciones mecánicas que impiden la elongación radicular de la plántula en desarrollo. En el caso de las semillas con testa germinadas en suelo y en MS sólido, la diferencia es notoria, ya que en el segundo caso no alcanza un 15 % de germinación, lo que consideramos como una baja respuesta dados los resultados de 100% en el caso de las semillas sin testa en MS sólido.

## 6.2 Evaluación y eliminación de la contaminación en las semillas de *H. quinquenervis*

De acuerdo con Leifert y Waites (1990), la contaminación por microorganismos se considera como una de las causas más importantes de pérdida de plantas

durante el cultivo *in vitro*. La manera en que pueden permanecer los patógenos, principalmente bacterias, es en un estado latente o endógeno; en éste estado no presentan un desarrollo visible en la planta o en el medio de propagación, pero una vez adaptadas a las condiciones, pueden inducir la muerte de las plantas, esto se debe a que los medios nutritivos utilizados permiten que las bacterias se desarrollen más rápidamente que en el suelo y de ésta manera afectan a la planta. Los contaminantes bacterianos suelen establecerse en la rizósfera o en las superficies aéreas de la planta, aspecto que se detectó en las plántulas de *H. quinquenervis*.

Por la forma tan localizada en que se presentó la contaminación bacteriana sobre cada una de las semillas, se determinó que se trata de una bacteria sistémica debido a que la desinfección superficial no funcionó en su totalidad y el crecimiento de la bacteria apareció en cada semilla contaminada una vez que la plántula comenzó a emerger, siendo menor la proporción en las semillas que no habían germinado (tabla 6.1), además de que después de su contacto con

Tabla 6.1: Porcentaje de semillas contaminadas en dos colectas durante los meses de octubre de 1995 y 1996.

	1ª colecta		2ª colecta	
	No. de semillas	%	No. de semillas	%
Total semillas	288	100	160	100
Total germinadas	233	80.9	127	79.4
Germinadas contaminadas	102	43.7	9	7.08
Germinadas sin contaminar	131	56.2	118	92.9
Sin germinar contaminadas	9	3.12	0	0
Sin germinar no contaminadas	55	19.09	33	20.6

el medio, la bacteria tarda unos días en adaptarse y comenzar su desarrollo.

Los resultados de las pruebas de hipersensibilidad, muestran que el cultivo que se presentó colonizando el medio y las plantas *in vitro* (que presentan una coloración rojiza), no son fitopatógenas ya que no causaron pudrición en rodajas de papa y en hojas de tabaco. Esto resultados permiten sugerir que se trata de un contaminante saprófito. Considerando que el cultivo bacteriano mostró una reacción de tinción Gram negativo y un metabolismo oxidativo de la glucosa, se procedió a emplear los antibióticos adecuados para su eliminación.

De acuerdo con Young y Col. (1984) se conocen cuatro grupos de antibióticos que se utilizan como bactericidas: los aminoglucósidos (gentamicina, estreptomycinina), quinonas (tetraciclina, mitomicina), lactonas (eritromicina) y los

péptidos (polimicina). La acción de los aminoglucósidos es unirse a la subunidad 30S del ribosoma de la bacteria e inhibir la síntesis de proteínas, pero a altas concentraciones pueden ser fitotóxicas, por lo que su uso debe ser probado, o bien debe tratarse con combinaciones de antibióticos.

Las pruebas que se hicieron utilizando gentamicina 25 mg/l y 50 mg/l no disminuyeron la contaminación de manera efectiva. En tanto que para el caso de la carbencilina, perteneciente al grupo de los  $\beta$ -lactamos, a una concentración de 50 mg/l se obtuvo un incremento del 49 % de semillas sin contaminar. Este compuesto inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias y la concentración utilizada fue satisfactoria.

### 6.3 Inducción de callo

Los órganos de las plantas, cuando experimentan algún tipo de ataque, responden de manera natural con la formación de un tejido amorfo conocido como callo. En el caso de un cultivo de tejidos, la formación de callo se induce en los explantes con la adición de auxinas en un medio nutritivo y bajo condiciones ambientales controladas. Para la formación de callo en *H. quinquenervis* se probaron dos explantes, hoja y tallo, con aproximadamente 40 combinaciones de 3 auxinas y 2 citocininas. Los mejores resultados se obtuvieron con medio MS con 1.0 mg/l de BAP más 0.1 mg/l de 2,4-D (tabla 6.2), así como en presencia

Tabla 6.2: Inducción de callo a partir de explante de tallo de *H. quinquenervis* utilizando medio MS adicionado con BAP y 2,4-D, evaluados a los 30 días.

Regulador de crecimiento		Callo		Brotos		Sin respuesta		Características
BAP (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Proporción	%	Proporción	%	Proporción	%	
0.0	0.0	14/40	35	16/40	40	10/40	25	callo verde, escaso, con poco crecimiento
1.0	0.1	38/40	95	0/40	0	2/40	5	callo friable, abundante sin oxidación
1.0	0.5	35/40	87.5	0/40	0	5/40	12.5	callo color blanco friable
1.0	1.0	40/40	100	0/40	0	0/40	0	callo color café claro, friable

de MS más 1.0 mg/l de ANA (figura 6.2).

Los diversos experimentos que se han realizado y la respuesta atribuida a las

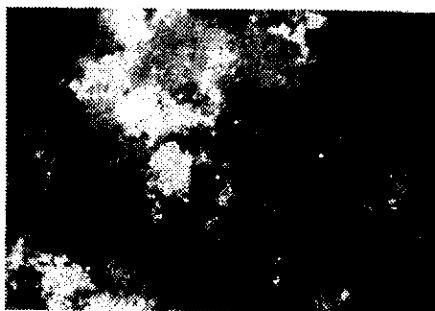


Figura 6.2: Callo desarrollado en MS mas 1.0 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de 2,4-D.

auxinas, sugieren fuertemente que éstas son el regulador central del desarrollo y crecimiento en las plantas; la adición exógena genera cambios correlacionados con los niveles del regulador y la sensibilidad del tejido (Leyser, 1997).

Aunque en todos los tratamientos se generó callo, la ausencia de consistencia friable fue un parámetro para descartar muchos de los tratamientos así como la presencia de oxidación del tejido (tablas , 6.3, 6.4 y 6.5). La elección de 1 mg/l de ANA para la inducción de callo, resultó de 5 experimentos con secciones de hoja con concentraciones de 0.1 a 0.5 mg/l, al aumentar la concentración a 1 mg/l se obtuvo callo y una segunda respuesta que fue la formación de raíces cerca del peciolo o la zona de corte, con AIA no hubo ningún tipo de respuesta pues todos los explantes presentaron clorosis y muerte (no se presentan datos).

Los dos tratamientos elegidos en los cuales se utilizaron los reguladores de crecimiento ANA y BAP, originaron callo y posteriormente el cultivo en suspensión. Esta respuesta es importante pues la generación de callo y posteriormente un cultivo en suspensión no es fácilmente inducible, además de que los cultivos en suspensión se pueden manipular de manera análoga a los procesos tradicionales de fermentación con microorganismos, aunque se pueden presentar problemas particulares al cultivo de células vegetales (Taticek et al.,1991). Este sistema permite una fácil manipulación de condiciones y la cuantificación de la biomasa producida. Uno de los beneficios del cultivo en suspensión es la posibilidad de producción de cientos de plantas a partir de las células individualizadas, además de la producción de compuestos que pueden ser excretados al medio o permanecer en sitios específicos en la célula (Wink, 1987).

La misma combinación de BAP (1 mg/l), con altas concentraciones de 2,4-D, mostró resultados positivos de formación de callo, pero algunos tratamientos presentaron contaminación bacteriana (tabla 6.3). La adición de reguladores de

crecimiento en estos medios, inhibió la organogénesis.

Tabla 6.3: Inducción de callo a partir de explante de tallo con concentraciones altas de auxina (2,4-D) evaluado a los 30 días.

Regulador de crecimiento. (mg/l)		Callo		No. explantes contaminados	Características
BAP	2,4-D	Proporción.	%		
1.0	1.0	24/25	96	0	friable, café claro, 0.2 a 0.5 cm <sup>2</sup>
1.0	1.5	24/25	96	0	friable, café claro, 0.5 a 1.0 cm <sup>2</sup>
1.0	2.0	25/25	100	15	friable, poco oxidado, 0.2 a 0.5 cm <sup>2</sup>
1.0	3.0	25/25	100	18	café claro, 0.5 cm <sup>2</sup>

Al aumentar las concentraciones de ANA en los medios MS con 1 mg/l de BAP, con explante de hoja, el crecimiento del callo fue superior al generado utilizando otros órganos como explantes (tabla 6.4).

Tabla 6.4: Inducción de callo a partir de explante de hoja con concentraciones altas de auxina (ANA), evaluado a los 30 días.

Regulador de crecimiento. (mg/l)		Callo		No. explantes contaminados	Características
BAP	ANA	Proporción.	%		
1.0	1.0	25/25	100	13	friable, ligeramente oxidado, 1.5 a 2.0 cm <sup>2</sup>
1.0	1.5	25/25	100	0	friable, de blanco a café claro, 0.5 a 1.5 cm <sup>2</sup>
1.0	2.0	24/25	96	0	friable, verde claro a café claro, 1.0 a 2.5 cm <sup>2</sup>
1.0	3.0	25/25	100	0	friable, café claro, 0.5 a 1.0 cm <sup>2</sup>

Para establecer los mejores tratamientos inductores de callo friable, se cuantificó por peso fresco la producción de biomasa con los explantes utilizados. Los resultados obtenidos con 1 mg/l de BAP mas 2 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP mas 0.1 mg/l de 2,4-D se muestran en la tabla 6.5. Como se desprende de los mismos, existe una diferencia apreciable en la producción de biomasa en relación con el explante. En el caso del tallo se obtuvo un peso promedio de 0.200 mg/explante con 1 mg/l de BAP y 2 mg/l de ANA, mientras que con medio MS con 1 mg/l de BAP mas 0.1 mg/l de 2,4-D, el promedio de peso



fresco fue de 0.216 mg/explante. Con explante de hoja, el peso promedio para 1 mg/l de BAP y 2 mg/l de ANA fue de 0.318 mg/explante, mientras que con medio MS con 1 mg/l de BAP mas 0.1 mg/l de 2,4-D, el promedio de peso fresco fue de 0.273 mg/explante. Para ambos tipos de explante, el 2,4-D resultó ser más efectivo en la producción de biomasa considerando que su concentración fue menor que en los tratamientos con ANA, posiblemente esta respuesta se deba en parte a la sensibilidad de las células de las hojas para desarrollar callo, en comparación con las secciones de tallo que contienen células lignificadas y más especializadas que las hojas.

Tabla 6.5: Inducción de callo a partir de explantes de hoja y tallo en medio MS con dos combinaciones de reguladores de crecimiento.

Tratamiento	BAP (1 mg/l) + ANA (2 mg/l)	BAP (1 mg/l) + 2,4-D (0.1 mg/l)	BAP (1 mg/l) + ANA (2 mg/l)	BAP (1 mg/l) + 2,4-D (0.1 mg/l)
Explante	Tallo		Hoja	
Proporción	21/36	24/40	37/40	36/40
∑ biomasa (g)	4.21	5.198	11.8	9.85
Peso promedio (mg/explante)	0.200	0.216	0.318	0.273

## 6.4 Cultivo en suspensión

### 6.4.1 Establecimiento

El cultivo de células en suspensión se logró obtener de callo generado a partir de secciones de hoja en medio MS sólido, con 1 mg/l de BAP y 0.1 mg/l de 2,4-D. Después de 6 meses de subcultivar el cultivo celular generado, se transfirió a un medio MS con 1 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, en penumbra donde el callo había sido friable y con muy poca oxidación (tabla 6.4). En este tratamiento las células comenzaron a presentar una fase de división más acelerada, lo cual hizo posible concentrar suficiente biomasa para establecer la cinética de crecimiento. El inóculo para cada matraz fue de 4 g y se obtuvo como máximo 22.3 g de biomasa fresca/matraz a los 15 días de iniciado el cultivo.

Los cúmulos celulares ya en suspensión se disgregaron fácilmente en el medio, y a través de observaciones con el microscopio se comprobó la turgencia de las mismas, así como la presencia de células redondeadas (figura 6.3) formando cadenas, pero la individualidad celular fue predominante en el medio.

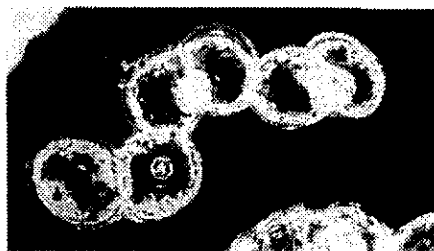


Figura 6.3: Agregación de células en cultivo en suspensión.

El segundo cultivo en suspensión, se logró establecer con medio MS adicionado con 1 mg/l de ANA. Éste presentó color verde claro y grandes conglomerados de células. Esta línea celular presenta poca disgregación celular, además de un crecimiento lento, por lo que no se realizó su cinética de crecimiento.

#### 6.4.2 Efecto de la sacarosa sobre la turgencia celular

Para determinar el efecto de la sacarosa sobre la turgencia y crecimiento celular, se ensayaron concentraciones de 20 g/l y 30 g/l. La elección de 30 g/l se tomó considerando la forma de las células observadas al microscopio (figura 6.4) y de manera cualitativa, la densidad celular lo cual le dió al cultivo una mayor turbidez que cuando se utilizaron 20 g/l de sacarosa.

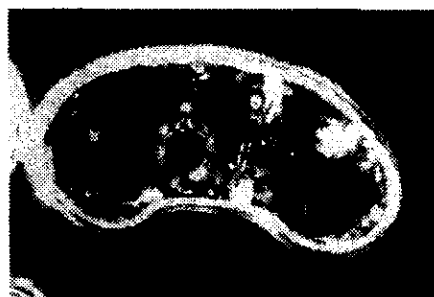


Figura 6.4: Celula turgente del cultivo en suspensión con 30 g/l de sacarosa.

El motivo por el cual se modificó la concentración de la fuente de carbono es por el efecto que ésta puede tener sobre la turgencia celular y sobre la producción de los metabolitos secundarios; se ha observado que las fuentes de carbono que son eficientemente utilizadas por los sistemas microbianos para el crecimiento ejercen un efecto negativo sobre la síntesis de los metabolitos (Santana et al.,

1994).

En este ensayo, observamos que no era el efecto de la concentración de sacarosa utilizada lo que estaba provocando la lisis celular, la velocidad de agitación estaba provocando este fenómeno por lo que se reguló y se descartó el cambio de concentración de sacarosa manteniéndose a 30 g/l de medio.

### 6.4.3 Cinética de crecimiento

Las muestras tomadas los primeros cinco días de la cinética de crecimiento permitieron observar que no hay fase "lag" que muestre un periodo de adaptación de las células al medio de cultivo.

El crecimiento del cultivo se evaluó por paquete celular (figura 6.5), peso

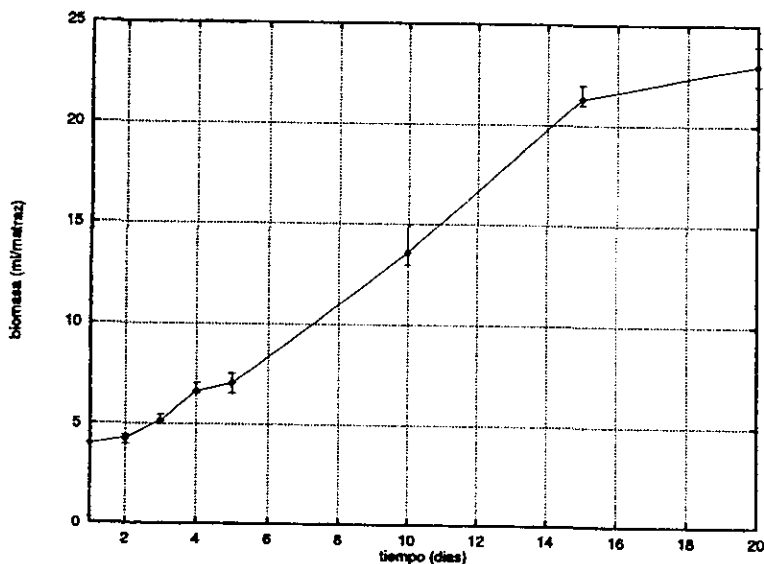


Figura 6.5: Cinética de crecimiento por paquete celular.

fresco (figura 6.6), peso seco (figura 6.7) y contenido de proteína (figura 6.8). Se observó claramente el comportamiento del crecimiento del cultivo, presentando desde el día 2 un crecimiento de tipo exponencial, llegando en el caso de la figura 6.7, la fase de desaceleración en el día 10 y estacionaria a partir del día 15. La biomasa producida por peso fresco alcanzó su máximo con 22.5 g/matraz a los 20 días, lo que puede estar relacionado con la cantidad de inóculo, que fue de 4 g por matraz y por la asimilación de los nutrientes. Después del día 20, el cultivo de células en suspensión presentó oxidación y saturación del cultivo.

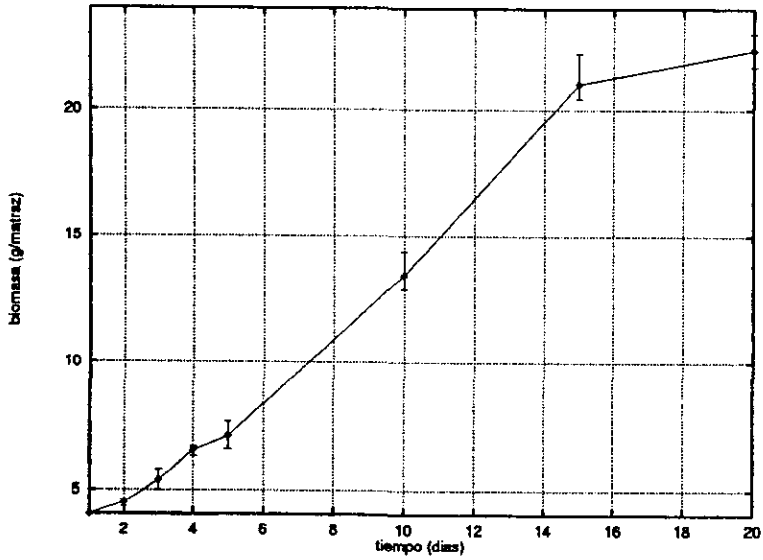


Figura 6.6: Cinética de crecimiento por peso fresco.

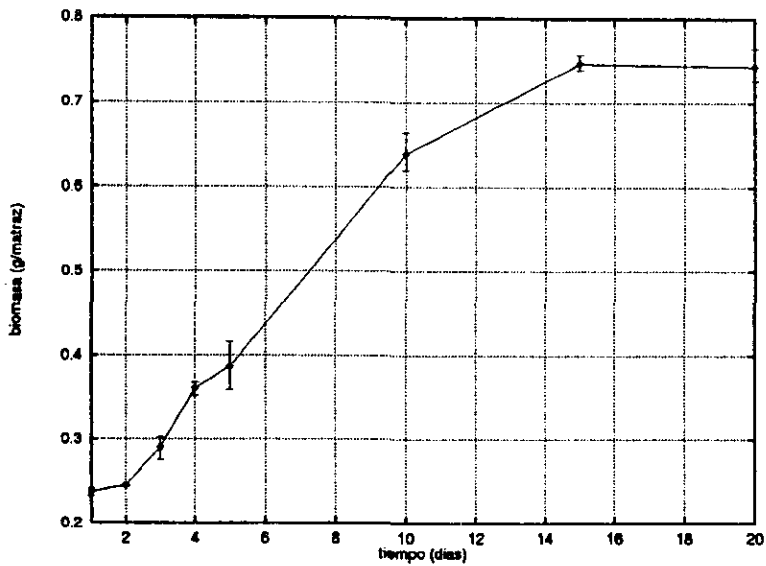


Figura 6.7: Cinética de crecimiento por peso seco.

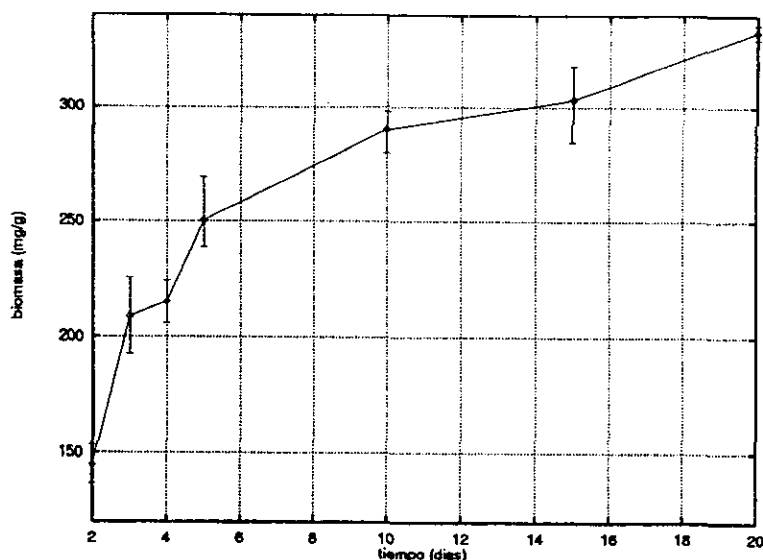


Figura 6.8: Cinética de crecimiento por contenido de proteína.

En la figura 6.8 se muestra que hay producción de proteínas totales de manera constante hasta el día 15.

De las diferentes formas utilizadas para cuantificar la cinética de crecimiento del cultivo en suspensión, el peso seco es el que presenta de una manera más clara el comportamiento del cultivo, ya que la variación del peso de la biomasa debida a la presencia de agua es mínima, aspecto que se comparte en menor grado con el peso fresco y con la cuantificación de proteína. En este caso, observamos que cuando se registra una desaceleración en el crecimiento del cultivo, el contenido de proteína se mantiene constante, esto nos indica que está habiendo síntesis de proteínas que no están involucradas en el crecimiento celular.

## 6.5 Inducción de raíces

### 6.5.1 Cultivo de raíces obtenidas a partir de plantas *in vitro*

Con base en la presencia de enecalina en la raíz de la planta madura (Gómez, 1993), se realizó un ensayo en el cual se propagaron raíces extraídas de plantas

desarrolladas *in vitro* en medio MS líquido con tres diferentes auxinas.

En el caso de la inducción de raíces de *H. quinquenervis* (tabla 6.6), las con-

**Tabla 6.6: Inducción de raíz en tres combinaciones de auxinas.**

Regulador de crecimiento (0.25 mg/l)	Proporción (matras)	Características de crecimiento
control	0/5	No hubo crecimiento de raíz
IBA	2/5	Se observó escasa elongación de los ápices radiculares
ANA	3/5	Hubo formación de callo a lo largo de la raíz, ligeramente friable
2,4-D	2/5	Se observó desarrollo de callo y posteriormente cultivo en suspensión.

centraciones de auxinas utilizadas no generaron resultados satisfactorios. Cuando se duplicó la concentración de los reguladores de crecimiento a 0.5 mg/l, tampoco se obtuvo crecimiento de las raíces. Sin embargo, hubo formación de callo a lo largo de éstas.

En algunas especies se ha obtenido exitosamente el cultivo de raíces para la producción de algunos metabolitos secundarios de interés, como en *Nicotiana tabacum* (Gyulai et al., 1995) y vincamina derivada de raíces pilosas transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* (Tanaka et al., 1995).

La producción de callo se presentó en los tres explantes utilizados, tallo, hoja y raíz. Por lo tanto, éste resultó con potencial para inducir cultivo de células en suspensión.

### 6.5.2 Cultivo de raíces obtenidas a partir de tallo y hoja

Las raíces originadas a partir de tallo y hoja se formaron de manera directa en el explante (figura 6.9) y en algunos casos vía indirecta, a partir de callo generado sobre el explante. La proporción de formación de raíz registrada utilizando como explante secciones de hoja fue de 24/160, lo que corresponde a un 15%. En el caso de la raíz formada a partir de secciones de tallo, la proporción fue mayor con 63/156, siendo un 40.38%. Los resultados obtenidos con los tallos, pueden deberse a la presencia de meristemos laterales que se encuentran en los entrenudos de los tallos y que respondieron con la formación de raíces ante el estímulo hormonal externo.



Figura 6.9: Raíces inducidas a partir de secciones de hoja.

## 6.6 Cultivo de células en suspensión elicitado

El cultivo de células en suspensión de *H. quinquenervis* elicitado con un homogenizado de *Fusarium* sp, presentó oxidación en las primeras horas de adicionado al cultivo. Como ya ha sido observado, este proceso ocurre en las plantas debido a algún tipo de daño estimulándose el metabolismo de los fenoles (Deberg y Read, 1991; Gabriel y Rolfe, 1990).

La estimulación de las células vegetales con los elicitores destruye una variedad de compuestos solubles en agua, incluyendo el AIA; esta actividad destructiva se manifiesta considerablemente a los 5 min de adicionar un elicitor. Esto muestra la rápida producción de  $H_2O_2$  por peroxidasas endógenas localizadas en la pared celular (Apostol et al., 1989). Al parecer, se trata de uno de los eventos más tempranos que se presentan cuando el tejido vegetal detecta un ataque, respondiendo con la oxidación del tejido que conduce a la generación de superóxido y la subsecuente acumulación de  $H_2O_2$ , que a su vez estimula un rápido flujo de  $Ca^{++}$  al interior de las células, lo que puede ocasionar su muerte fisiológica. Este evento de difusión de señales se tiene registrado en cultivo de células en suspensión de soya (Levine et al., 1996) y en cultivo de *Nicotiana tabacum* (Chappel et al., 1997).

De acuerdo con Levine et al. (1994), la presencia de  $H_2O_2$  promueve la expresión de una variedad de genes que producen enzimas y proteínas que protegen a la células. Las peroxidasas tienen una variedad de funciones, pues aparte de ser comprobado su incremento después de infecciones fúngicas en las plantas, pueden formar parte del sistema de defensa bajo condiciones de estrés, en la lignificación de la células, en el entrecruzamiento de polisacáridos en la pared celular, como regulador de la elongación y en varios procesos de oxidación como

la de los fenoles (Trevisan et al., 1997).

La producción de  $H_2O_2$  en cultivos de células en suspensión también estimula significativamente la producción de fitoalexinas. Con ello se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno es un elemento importante en las respuestas de defensa (Devlin et al., 1992). En este proceso, cuando se introduce una catalasa en el medio de cultivo, la producción de fitoalexinas se reduce significativamente (Apostol et al., 1989). Por otra parte, el color pardo o negruzco que van adquiriendo el medio y las células del cultivo en suspensión está relacionado con la presencia de radicales  $OH^\circ$  generados por el reactivo de Fenton ( $FeSO_4 + H_2O_2$ ), por la vía de activación de la polifenoloxidasas, pero no actúan en la síntesis de fitoalexinas (Castoria et al., 1995).

En la resistencia a patógenos, no todos los mecanismos de defensa son expresados rápidamente. Por ejemplo, algunas quinonas, taninos, fitoalexinas e inhibidores de proteinasa, generalmente aparecen antes que las enzimas hidrolíticas y éstas preceden a la biosíntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina. Otras células estabilizan mecanismos tardíos en la cronología de expresión de productos de defensa entre las 12 h y 24 h después de la elicitación, siendo los componentes más rápidos en la defensa los taninos y las fitoalexinas, inicialmente detectadas entre las 2 h y 4 h después de la estimulación con el elicitor (Apostol et al., 1989).

En los espectros de nuestro sistema elicitado, comparado con el del cultivo de células en suspensión testigo, se observó que hay mayor síntesis de compuestos que no están presentes en el testigo y que algunos de ellos están en mayor cantidad, aunque no se sabe qué tipo de moléculas son. Como en el caso de la elicitación, se tienen registros en otras plantas de la producción de fitoalexinas del tipo dibenzofuranos por elicitación con *Mespilus germanica*, estos compuestos al igual que la enecalina y desmetilencecalina de *H. quinquenervis* mostraron actividad antifúngica (Kokubun et al., 1995).

El modelo de elicitación ha servido para el estudio de la interacción planta-patógeno, biosíntesis de fitoalexinas, respuesta hipersensible así como la activación de genes y síntesis de proteínas ante un ataque por patógenos y cambios en la permeabilidad de la membrana como respuesta a la invasión.



## 6.7 Resultados obtenidos con los análisis de cromatografía de capa fina, y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los extractos derivados de los sistemas *in vitro*.

Los análisis químicos de las diferentes muestras se realizaron mediante las técnicas de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía de capa fina. Los resultados se indican en la tabla 6.7.

### 6.7.1 Extractos de hojas y raíces de plantas *in vitro* de dos meses de edad

Los análisis por el método de CG-EM de los extractos de hojas jóvenes, indicó que eran mezcla de diferentes constituyentes; el ion molecular 232 generado por el componente con  $m/z=17.93$ , permitió establecer que este metabolito secundario corresponde a la enecalina (cromatograma 1 y 2, espectro 1, 2 y 3). Por otro lado, el análisis de los extractos de las raíces con el mismo tiempo de desarrollo que las hojas, detectaron la presencia de la desmetilencecalina con un  $TR=18.29$  min (cromatograma 3 y espectro 4). Estos resultados apoyan fuertemente la idea de la sucesión de compuestos de acuerdo con la ontogenia y biología de la planta (Proksch et al, 1991) y en este caso, la biosíntesis de la enecalina en esta especie puede estar ocurriendo en las hojas y almacenándose en las raíces de la planta. En el caso de la desmetilencecalina, su biosíntesis parece ocurrir en las raíces y hojas maduras, pues no se detectó en las hojas jóvenes.

### 6.7.2 Extractos de callos cultivados en MS sólido.

En los extractos de los callos que se obtuvieron a partir de tallos y hojas, en los diferentes tratamientos en MS sólido, y analizados por CCF y por coelución con las muestras puras, no se detectó la presencia de la enecalina y desmetilencecalina (tabla 6.7). Los callos mostraban ligeras diferencias en cuanto al color y la friabilidad. Al no detectar los compuestos de interés, descartamos que estas características estuvieran relacionadas con la biosíntesis de estos metabolitos secundarios. Sin embargo, dos cultivos de callo se llevaron a cultivo en suspensión

Tabla 6.7: Detección de la encecalina y la desmetilencecalina en diferentes sistemas de cultivo en cromatografía de capa fina y CG-EM

Sistema	Tratamiento	Cromeno	Análisis
Semillas	-	-	ccf
Plantas completas in vitro de 2 meses	MS	encecalina	ccf
Hojas de plantas maduras	Colecta de campo	encecalina	ccf
Hojas de plantas in vitro de 2 meses	MS	encecalina	cg-em
Raíz de planta in vitro de 2 meses	MS	desmetilencecalina	cg-em
Raíz de plantas maduras	Colecta de campo	desmetilencecalina	cg-em
Raíces inducidas a partir de explante de hoja	MS + 1 mg/l de ANA	desmetilencecalina	cg-em
Raíces inducidas a partir de explante de tallo	MS + 1 mg/l de ANA	desmetilencecalina	cg-em
Callo originado a partir de tallo	MS + 2 mg/l de BAP + 2 mg/l de ANA	-	ccf
Callo originado a partir de hoja	MS + 2 mg/l de BAP + 2 mg/l de ANA	-	ccf
Callo originado a partir de tallo	MS + 1 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de 2,4-D	-	ccf
Callo originado a partir de hoja	MS + 1 mg/l de BAP + 0.1 mg/l de 2,4-D	-	ccf
Callo originado a partir de hoja	1 mg/l de ANA	-	ccf
Cultivo de células en suspensión (1ª línea celular)	MS + 1 mg/l de ANA + 1 mg/l de BAP	compuesto amarillo	cg-em
Cultivo de células en suspensión (2ª línea celular)	MS + 1 mg/l de ANA	-	cg-em
Cultivo de células en suspensión elicidadas con <i>Fusarium</i>	MS + 1 mg/l de ANA + 1 mg/l de BAP	compuesto amarillo	cg-em

ccf-cromatografía de capa fina

cg-em-cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

para analizar el comportamiento y los compuestos producidos en las células en este sistema.

### 6.7.3 Extractos de cultivo de células en suspensión.

Los cromatogramas obtenidos de las dos líneas celulares (cromatogramas 4, 5 y 6, espectro 5) no presentan los picos que permitieron identificar a los cromenos enecalina y desmetilencecalina. Esta respuesta coincide con los reportes de algunas plantas como *Papaver somniferum* para la producción de codeína y morfina. En CTV no se sintetizan estos compuestos pero aparecen otros alcaloides como la sanguinerina (Takayama, 1991). Otro ejemplo lo constituye *Ageratina adenophora* la cual contiene los mismos cromenos que *H. quinquenervis*, pero mediante el sistema de CTV no se obtuvo la síntesis de estos metabolitos secundarios (Proksch et al., 1987).

En las dos líneas celulares establecidas, no se detectaron compuestos parecidos, pero en el cultivo con 1:1 mg/l de ANA y BAP (B3) se detectó la presencia de un compuesto de color amarillo con TR=14.62 min (cromatograma 7, espectros 6) y que estuvo presente durante la cinética de crecimiento pero que no se detectó en los callos que dieron origen al cultivo en suspensión; el análisis comparativo mediante la técnica de CCF de ambos extractos con el obtenido de la planta silvestre, permite establecer que este producto natural no está presente en las raíces de *H. quinquenervis*. Este tipo de metabolitos se conocen como "compuestos nuevos", establecidos únicamente en cultivo de células, aunque se ha visto que pueden estar presentes en otras plantas y se trata de establecer si tienen actividad biológica (Alfermann y Petersen, 1995). Al compuesto amarillo se le hicieron algunos análisis como resonancia magnética nuclear, pero no fue purificado en su totalidad debido a lo complejo de la mezcla, por lo que no se conoce todavía la estructura química.

El hecho de que la enecalina y la desmetilencecalina se hayan encontrado en estructuras organizadas como hojas y raíces maduras y no en el cultivo de células en suspensión y en el callo, apoya fuertemente la teoría de la necesidad de la organización celular para su síntesis; muchos metabolitos secundarios están restringidos a sitios específicos de las plantas, y la concentración de sus precursores y el producto final dependen de la cantidad de enzimas y su actividad, por lo que el control molecular opera a nivel de expresión de los genes y cantidad de enzima, donde la cantidad de enzima puede ser modulada por la variación en la tasa de transcripción (Croes et al., 1995). Este tipo de respuestas pueden

estar influenciadas por la carencia de algún elemento que sea necesario para la transcripción de precursores o enzimas involucrados en la biosíntesis de los metabolitos de nuestro interés y por cambios ambientales.

#### 6.7.4 Cultivo de raíces a partir de hojas y tallos

Los cromatogramas 8 y 9, espectros 7 y 8, obtenidos de los análisis de los extractos de raíces inducidas a partir de hojas y tallo, muestran la presencia de la desmetilencecalina con un TR=18.34 min (hojas) y 18.32 min (tallo). Al igual que en los resultados de las raíces jóvenes obtenidas de plantas *in vitro*, no se detectó la presencia de la encecalina.

Nuestros resultados indican que la síntesis de la encecalina y la desmetilencecalina están íntimamente relacionadas con la diferenciación celular, con la biología de la planta y con los datos etnobotánicos aportados por algunos tarahumaras. En el caso de la diferenciación celular, está involucrada la síntesis de moléculas que van a formar parte de la célula y las diferentes estructuras de la planta, así como la formación de precursores que intervienen en la biosíntesis de compuestos del metabolismo secundario.

Se sabe que las hojas y raíces de *H. quinquenervis* son usadas cuando están maduras, fenómeno que sucede en época de invierno. Asimismo, se comprobó con los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, que la encecalina se encuentra en hojas jóvenes y maduras pero no en raíces jóvenes, volviéndose a encontrar en las raíces cuando son maduras. Estas variaciones son probablemente debidas a una translocación que está determinada por el desarrollo de la planta y la influencia de las condiciones ambientales.

#### 6.7.5 Cuantificación de los picos más intensos de los espectros 1, 4, 7 y 8.

El análisis de los espectros de extractos hechos a partir de estructuras organizadas (raíces y hojas), nos permitió cuantificar el porcentaje de los diferentes compuestos de cada extracto (tabla 6.8). En el caso del extracto de hojas de dos meses de edad, la encecalina fue el segundo compuesto mayoritario con un 23.69 % de 0.0211 g de extracto. Para las raíces de plantas *in vitro*, la desmetilencecalina presentó un 41.30 % que junto con el pico 5, integran el 82.60 %, las raíces derivadas de secciones de tallos, con un 53.12 % son las estructuras que han producido mayor cantidad de desmetilencecalina y por último en el espectro

7 del extracto de raíces de hojas, se obtuvo un 25.44 % de desmetilencecalina. Como se puede observar en la tabla 6.8, los cromenos enecalina y desmetilencecalina se obtienen entre el 17 y 53 % en comparación con los demás compuestos presentes en los extractos. Estos datos nos indican en qué proporción se están produciendo los compuestos de interés y con ello definir de qué estructuras se pueden extraer en mayor cantidad.

Tabla 6.8: Cuantificación de la enecalina y desmetilencecalina en los espectros 1, 4, 7 y 8 de *H. quinquenervis*.

Espectro	Extracto	No. pico	TR	%	Fórmula	Nombre
1	Hojas de plantas in vitro de 2 meses	1	15.45	0.47	-	-
		2	16.20	7.58	-	-
		3	17.93	23.69	$C_{14}H_{16}O_3$	Enecalina
		4	18.81	4.73	-	-
		5	19.20	0.47	-	-
		6	19.27	8.53	-	-
		7	21.01	51.65	-	-
		8	21.03	0	-	-
		9	21.04	0.47	-	-
		10	23.90	2.37	-	-
4	Raíces de plantas in vitro de 2 meses	1	18.29	41.30	$C_{12}H_{14}O_2$	Desmetilencecalina
		2	18.86	2.17	-	-
		3	21.01	2.17	-	-
		4	22.90	13.04	-	-
		5	24.21	41.30	-	-
7	raíces derivadas de hojas	1	15.22	24.26	-	-
		2	17.51	4.14	-	-
		3	18.34	25.44	$C_{12}H_{14}O_2$	Desmetilencecalina
		4	19.07	12.42	-	-
		5	19.67	10.06	-	-
		6	24.26	23.67	-	-
8	Raíces derivada de tallos	2	14.49	1.56	-	-
		3	18.32	53.12	$C_{12}H_{14}O_2$	Desmetilencecalina
		4	21.01	15.62	-	-
		5	22.90	1.56	-	-
		6	24.21	28.12	-	-

### 6.7.6 Cultivo de células en suspensión elicitado con *Fusarium* sp.

El análisis de los espectros del cultivo, antes (cromatograma 11) y después de ser elicitado (cromatogramas 10 y 12), mostró una ligera disminución en

la concentración del compuesto amarillo (espectro 9) y la aparición de nuevos compuestos. Se cree que su origen puede ser inducido precisamente por la interacción entre los componentes del hongo con la célula vegetal.

No fue posible detectar la presencia de la enecalina o desmetilencecalina bajo este sistema, sin embargo, se logró observar que existe un reconocimiento del patógeno y una producción de compuestos para nosotros desconocidos, y que probablemente pueden tener acción antifúngica.

### 6.7.7 Pruebas biológicas.

La tabla 6.9 resume los resultados obtenidos de la evaluación del efecto fitotóxico de los diferentes extractos ensayados, en tres concentraciones (500, 50 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Tabla 6.9: Efecto de los diferentes extractos obtenidos de los sistemas *in vitro* de *H. quinquenervis* sobre la germinación de semillas de *Echinochloa crusgalli*.

Extracto	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Germinación (%)	Longitud de la raíz (cm)		Crecimiento radicular (%)	Inhibición <sup>b</sup> (%)
			media	promedio <sup>a</sup>		
A	0	89.66	2.17 $\pm$ 0.14	2.12	100.00	0.00
P	5000	83.33	0.03 $\pm$ 0.01	0.03	1.41 <sup>c</sup>	98.59
C	0	89.29	2.20 $\pm$ 0.20	2.22	104.40	-4.40
T1	500	85.71	0.89 $\pm$ 0.19	0.93	43.80 <sup>c</sup>	56.20
T2	50	92.59	1.21 $\pm$ 0.29	1.21	57.14 <sup>c</sup>	42.86
T3	5	92.86	1.70 $\pm$ 0.18	1.70	80.06	19.94
H1	500	92.59	1.15 $\pm$ 0.08	1.13	53.06 <sup>c</sup>	46.94
H2	50	86.21	1.74 $\pm$ 0.28	1.78	83.83	16.17
H3	5	82.14	1.87 $\pm$ 0.75	1.78	83.59	16.41
E1	500	82.76	1.29 $\pm$ 0.26	1.25	58.87 <sup>c</sup>	41.13
E2	50	89.66	1.06 $\pm$ 0.13	1.10	51.65 <sup>c</sup>	48.35
E3	5	89.66	1.22 $\pm$ 0.29	1.23	58.06 <sup>c</sup>	41.92
B1	500	100.00	1.30 $\pm$ 0.34	1.30	61.38 <sup>c</sup>	38.62
B2	50	92.86	1.56 $\pm$ 0.12	1.56	73.47 <sup>c</sup>	26.53
B3	5	82.14	1.59 $\pm$ 0.26	1.64	77.24	22.76

a) Promedio de 3 muestras.

b) Porcentajes en relación con la respuesta del control de agua.

c)  $p \leq 0.05$  (ANOVA).

A= agua P= control positivo C= cloroformo.

T1, T2 y T3= extractos de raíces originados a partir de tallo\*.

H1, H2 y H3= extractos de raíces originados a partir de hojas\*.

E1, E2 y E3= extracto del cultivo elicitado\*.

B1, B2 y B3= extracto de cultivo de células en suspensión\*

\*en concentraciones de 500, 50 y 5  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

Los resultados de los análisis estadísticos, indican que los extractos de los

sistemas de raíces originadas a partir de tallo mostraron un efecto significativo como inhibidor del crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*. Al parecer, esta respuesta es dependiente de la concentración y está relacionada con la presencia de la desmetilencecalina, detectada en este extracto mediante la técnica de CG-EM. De los extractos utilizados, T1 presentó mayor efecto inhibidor del crecimiento radicular que T2 y que H1, en el que también se detectó la presencia de la desmetilencecalina. En el caso del extracto del cultivo elicitado, la inhibición fue superior al 41%. En este extracto, alguno de los compuestos presentes puede estar otorgando el efecto inhibitorio, aunque debido a su origen pueden ser varios los que estén interviniendo. Por último, el extracto de células del cultivo en suspensión (B) presentó un efecto fitotóxico moderado sobre las semillas de prueba, ya que demostró un 38.53% de inhibición.

## Capítulo 7

### Conclusiones

- Las condiciones establecidas como óptimas para la germinación de *H. quinquenervis* fueron la eliminación de la cubierta seminal de las semillas, el uso de germinadores con MS líquido y MS sólido. De acuerdo con los resultados, las semillas no son dependientes de la luz para germinar.
- El uso de secciones de tallo, hojas y raíces presentaron alta potencialidad para la inducción de callo.
- Con el uso de los reguladores de crecimiento se indujo el crecimiento de callo, pero fueron selectivos los tratamientos en los cuales se utilizó medio MS con 1 mg/l de BAP mas 0.1 mg/l de 2,4-D usando como explante secciones de tallo y hoja, y el medio MS con 1 mg/l de ANA con los mismos explantes.
- El cultivo en suspensión se indujo con medio MS adicionado con 1 mg/l de BAP mas 0.1 mg/l de 2,4-D y posteriormente se logró aumentar la producción de biomasa, transfiriéndolo al medio MS, pero adicionado con 1 mg/l de BAP mas 1 mg/l de ANA.
- Los análisis realizados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas indican que la biosíntesis de la enecalina se está produciendo en las hojas y no en las raíces de las plantas desarrolladas *in vitro* de la misma edad.
- En los cultivos de callo y posteriormente en los cultivos de células en suspensión, no se detectó ninguno de los cromenos y benzofuranos que se encuentran en la planta silvestre.



- Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas reveló la presencia de la desmetilencecalina en los extractos de las raíces inducidas a partir de explante de tallo y hoja. El que en el cultivo de células en suspensión y en callo no se hayan detectado la encecalina y desmetilencecalina, indica que la biosíntesis de los metabolitos encontrados en *H. quinquenervis*, está relacionada con la diferenciación del tejido.
- El cultivo de células en suspensión inducido a partir de 1 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, produjo un compuesto sólido de color amarillo; este es un compuesto que no se ha detectado en la planta silvestre.
- En el sistema de elicitación con *Fusarium* sp se observó una clara respuesta de interacción planta-patógeno con la oxidación del medio de cultivo y del tejido, producido probablemente por la liberación de fenoles, ocasionando la muerte celular.
- En el extracto de hojas de dos meses de edad, la encecalina fue el segundo compuesto mayoritario con un 23.69 % de 0.0211 g de extracto. Para las raíces de plantas *in vitro*, la desmetilencecalina presentó un 41.30 %. Las raíces derivadas de secciones de tallos, con un 53.12 %, son las estructuras que han producido mayor cantidad de desmetilencecalina. Por último, del extracto de raíces de hojas, se obtuvo un 25.44 % de desmetilencecalina.
- De los extractos utilizados en las pruebas biológicas, el obtenido de raíces originadas a partir de tallo presentó el mayor efecto inhibitor sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*.
- Los extractos de los diferentes sistemas *in vitro* probados en *Echinochloa crusgalli*, presentaron un grado de inhibición en el crecimiento radicular por lo que se considera que tienen actividad biológica potencial contra esta especie arvense.

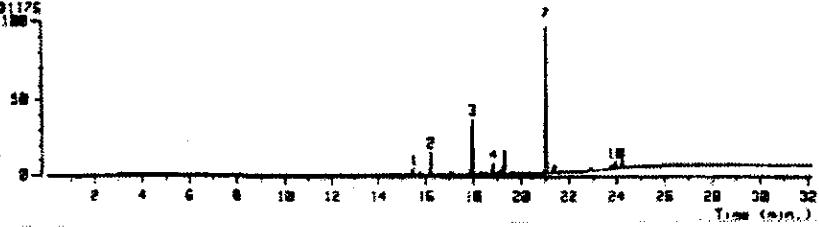
# Medio de Cultivo Murashige-Skoog

Tabla 7.1: Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

Stock	Compuesto	g/20 l
<b>Macronutrientes</b>	$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	33
<b>Stock 1</b>	$\text{KNO}_3$	38
20 l x 400 ml	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.4
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3.5
<b>Cloruro de calcio</b>	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.8
<b>Stock 2</b>		
20 l x 200 ml		
<b>Micronutrientes</b>	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.033802
<b>Stock 3</b>	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.172
20 l x 200 ml	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.124
	KI	0.0166
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0005
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0005
<b>Stock 4</b>	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.556
20 l x 200 ml	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	0.746
<b>Vitaminas</b>	Tiamina	0.002
<b>Stock 5</b>	Ac. Nicotínico	0.01
20 l x 200 ml	Piridoxina	0.01
<b>Stock 6</b>	Inositol	2.0
20 l x 200 ml		
<b>Stock 7</b>	Glicina	0.04
20 l x 200 ml		

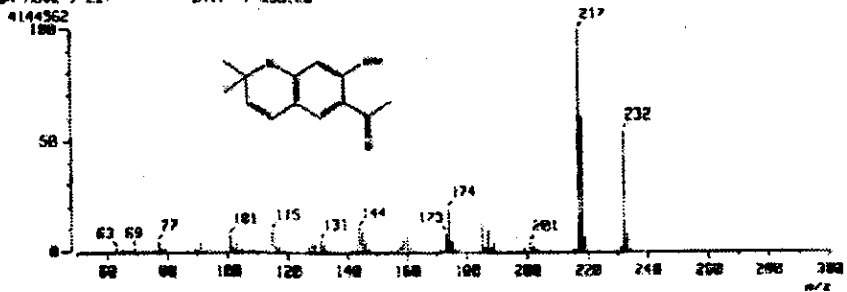
# Espectros

[ TIC ]  
Data : DT15\_Ext0.6\_003 Date : 20-Nov-97 17:16  
Sample:  
Note : UERI, Fac. de Quimica, UNPM.  
Inlet : GC Ion Mode : EI+  
Ion Species : Normal Ion [RF-Linear]  
TIC Range : m/z 50 to 300 Output RT Range : 0.00 to 32.10 min  
5019175



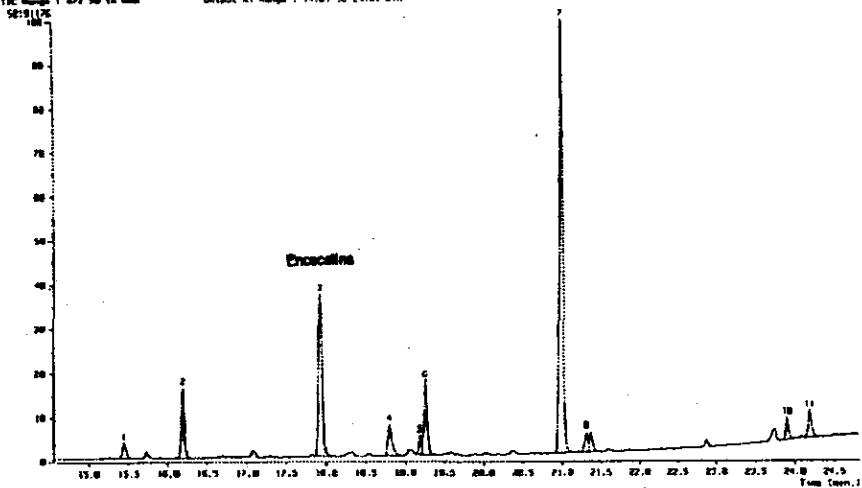
Cromatograma 1

[ Mass Spectrum ]  
RT : 17.93 min Scan# : 694-892-700 Temp : 29.8 deg.C  
Ion Mode : EI+ Int. : 355.26



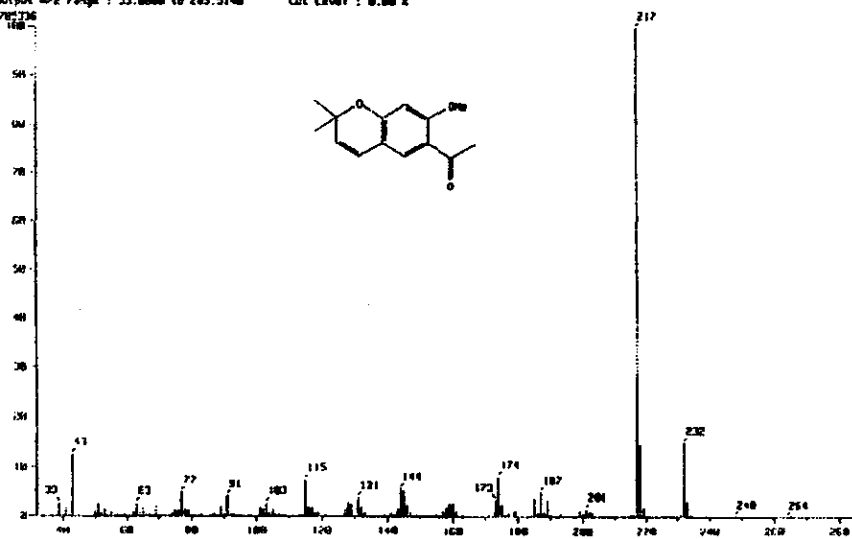
Espectro 1

E TIC 2  
 Date : 01/05/2005 Extra: 0.000 Date : 20-Nov-04 17:16  
 Sample:  
 Note : LPI, Fac. de Quimica, UNPA.  
 Solen : GC Ion Type : ESI  
 Scan Speed : Normal Ion (10^-4 Linear) Direct RI Range : 14.01 to 24.01 min  
 TIC Range : 14.01 to 24.01 min  
 50:0 (1%)

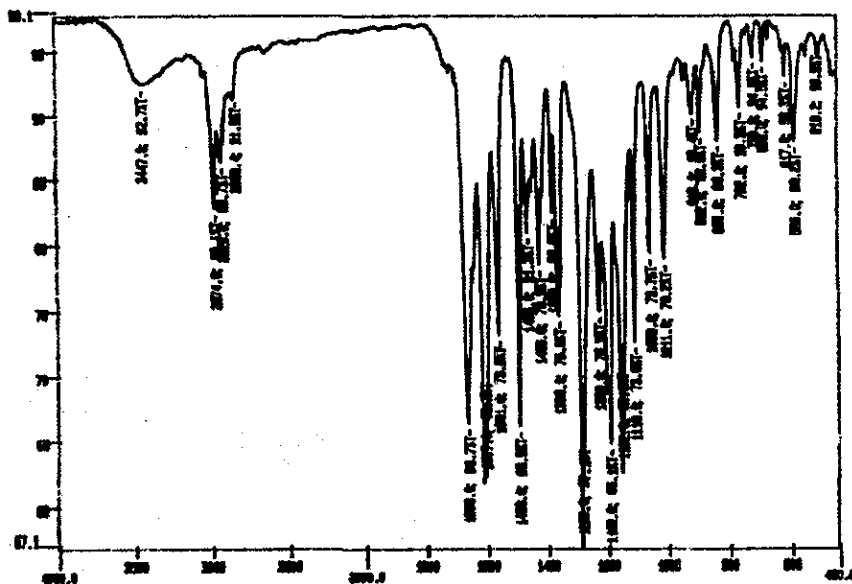


Cromatograma 2

(Mass Spectrum 1  
 Name : eucodina  
 Sample : 1  
 Note : D-(-)-Racem-Heterosides  
 Inlet : Direct Ion Mode : ESI  
 Scan Type : Regular (10^-4 Linear)  
 RI : 18.26 min Scan#: 18,163 Temp : 57.2 deg.C  
 BP : m/z 217.0000 Int. : 361.00  
 Output m/z range : 33.0000 to 265.5140 Cut Level : 0.00 %  
 179:230  
 100

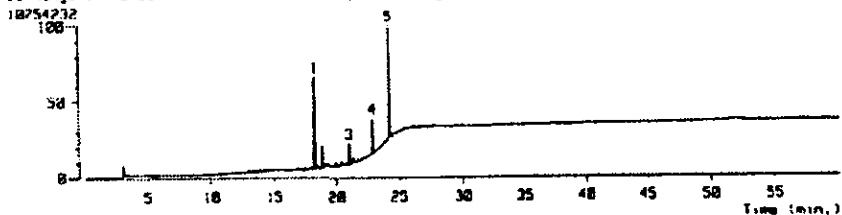


Espectro 2



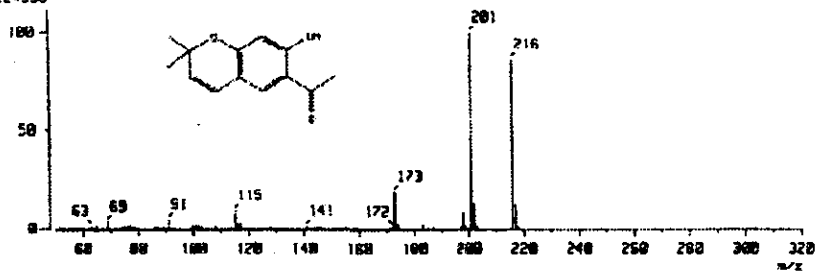
Espectro 3

TIC 1  
 Date : 20-Nov-97 14:16  
 Sample:  
 Note : USRI, Fac. de Quimica, UNFM.  
 Inlet : GC Ion Mode : EI+  
 Ion Species : Normal Ion [NF-Linear]  
 TIC Range : m/z 58 to 888 Output RT Range : 0.00 to 33.99 min



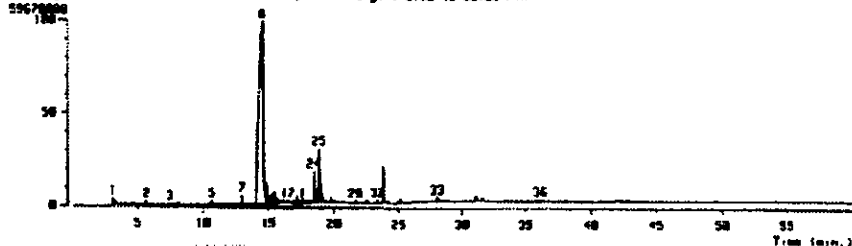
Cromatograma 3

[ Mass Spectrum ]  
 RT : 18.23 min Scan# : 700-704-714 Temp : 28.8 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 191.85  
 2224356



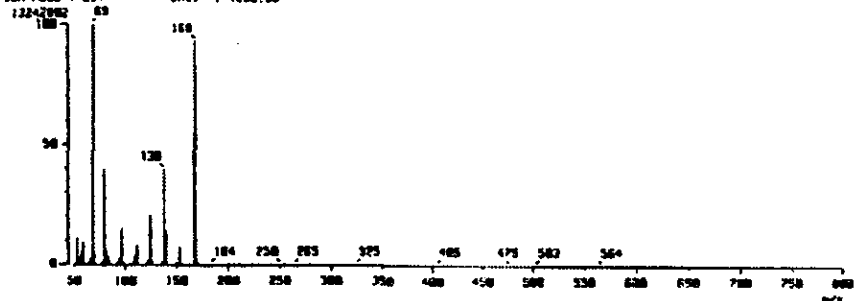
Espectro 4

[ TIC ]  
 Data : D7636 Exp. 02\_004 Date : 18-Apr-98 08:15  
 Sample : C2/01  
 Name : USP1, Fac. de Quimica, UNPL  
 Inlet : GC Ion Mode : EI+  
 Ion Species : Normal Ion (F-Linear)  
 TIC Range : run 90 to 900 Output RT Range : 8.00 to 88.00 min  
 55670000

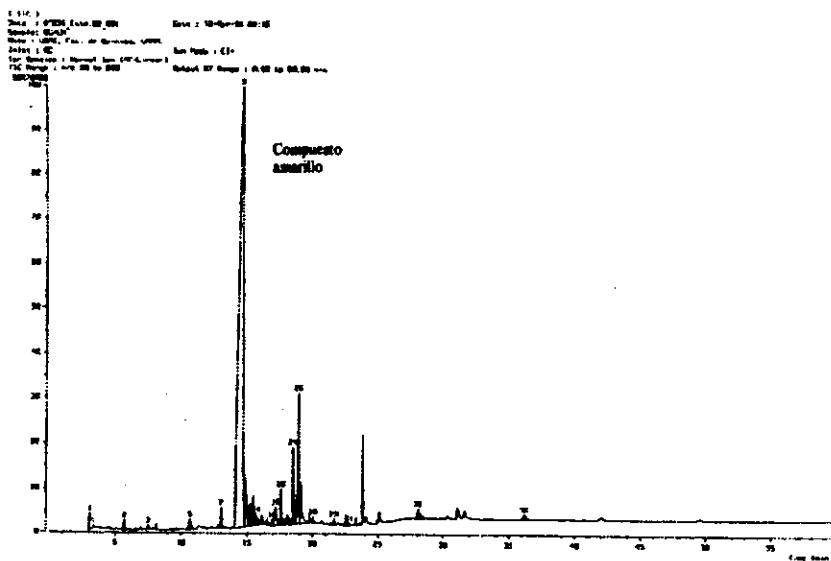


Cromatograma 4

[ Mass Spectrum ]  
 RT : 14.62 min Scan# : 582-531-530 Temp : 27.8 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 1252.93  
 12242082

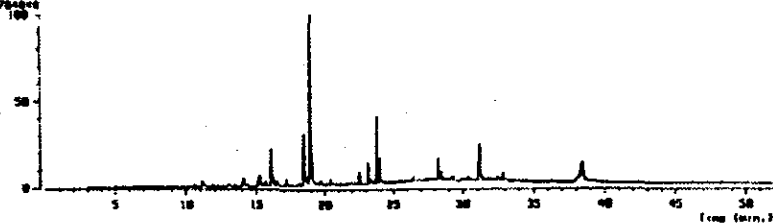


Espectro 5

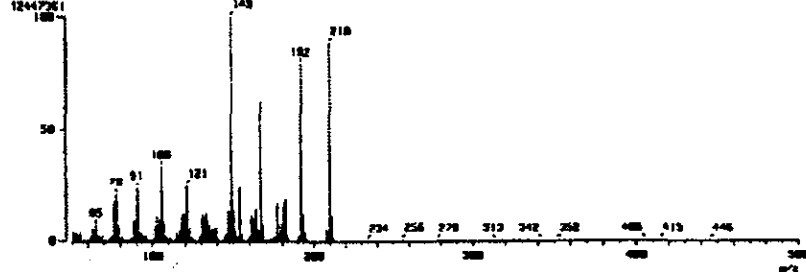


Cromatograma 5

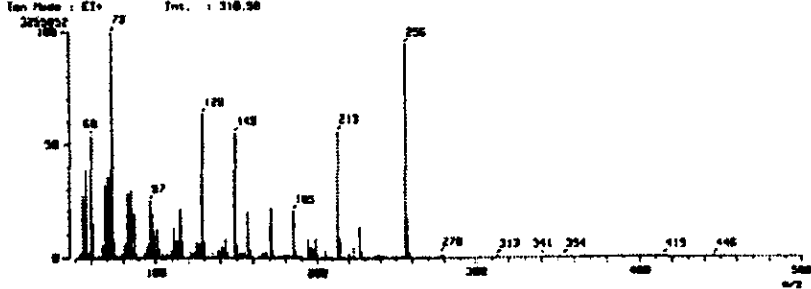
TIC 1  
 Date : 07057\_Cata.16\_022 Date : 17-Apr-99 10:11  
 Sample: CC-57  
 Name : L291, Fac. de Quimica, USP.  
 Inlet : CC Ion Mode : EI+  
 Ion Species : Normal Ion (M<sup>+</sup>,Linear)  
 TIC Range : exp 50 to 600 Output RT Range : 8.88 to 51.89 min  
 14178498



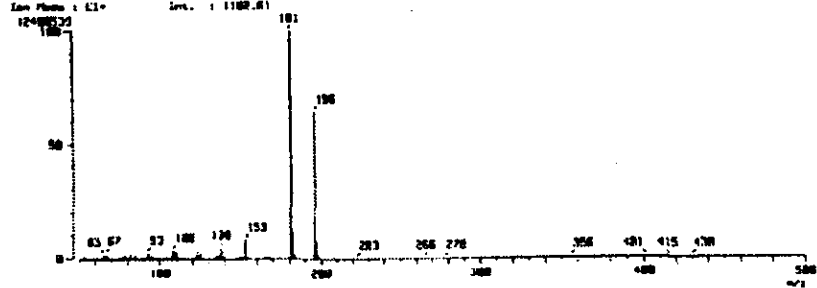
[Mass Spectrum 1]  
 RT : 18.94 min Scan# : 1727,7281-6(718+796)... Temp : 8.4 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 1187.87  
 12447361



[Mass Spectrum 2]  
 RT : 18.47 min Scan# : 1716,7112-6(702+718)... Temp : 8.4 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 318.38  
 12447362

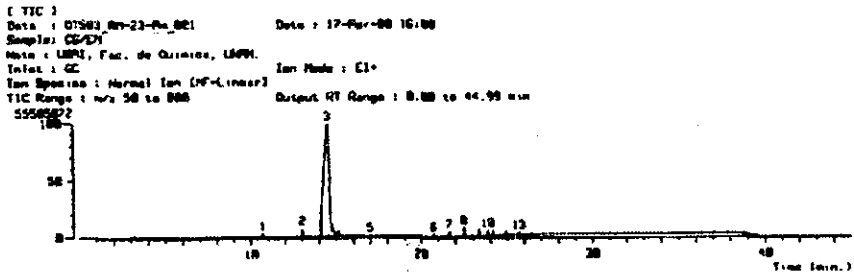


[Mass Spectrum 3]  
 RT : 18.88 min Scan# : 518-6(888+921)(s)-1.01 Temp : 38.8 deg.C  
 Ion Mode : EI+ Int. : 1188.81  
 12448222

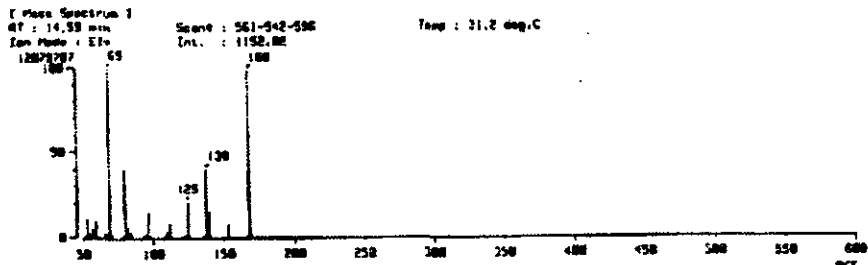




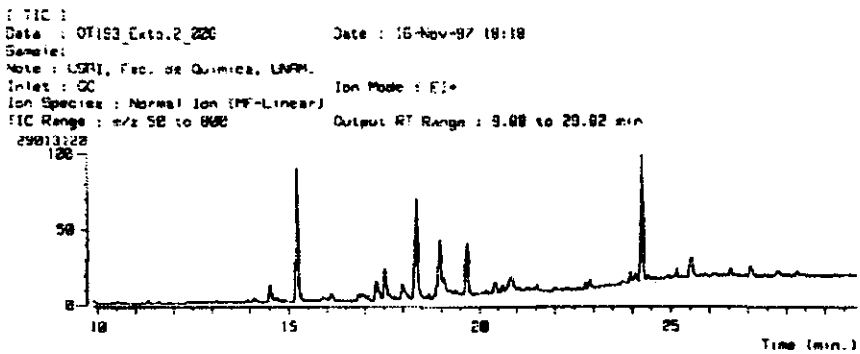
## Cromatograma 6



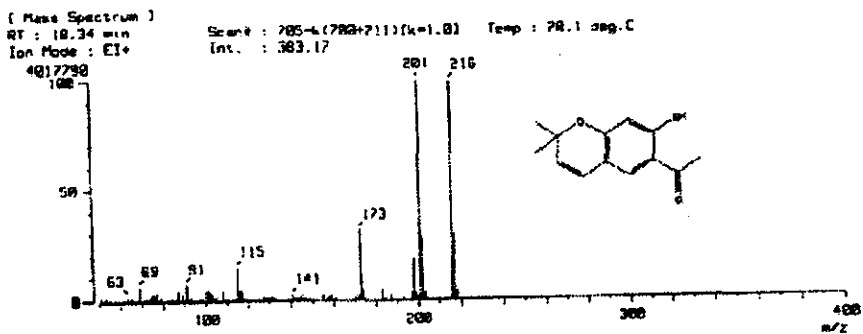
## Cromatograma 7



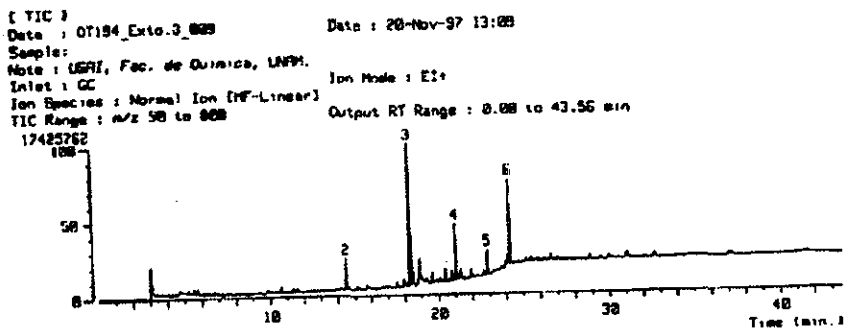
## Espectro 6



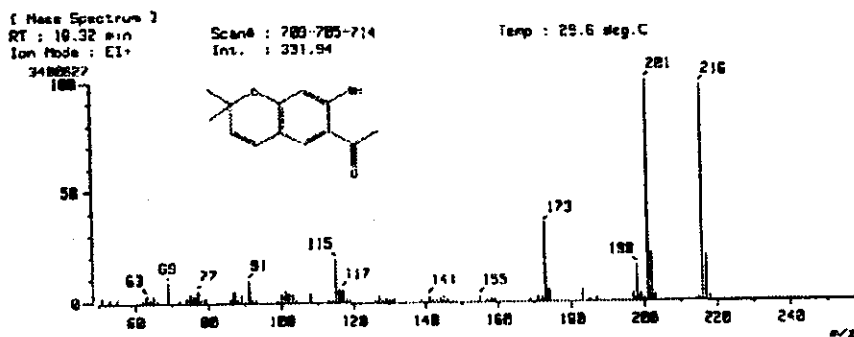
## Cromatograma 8



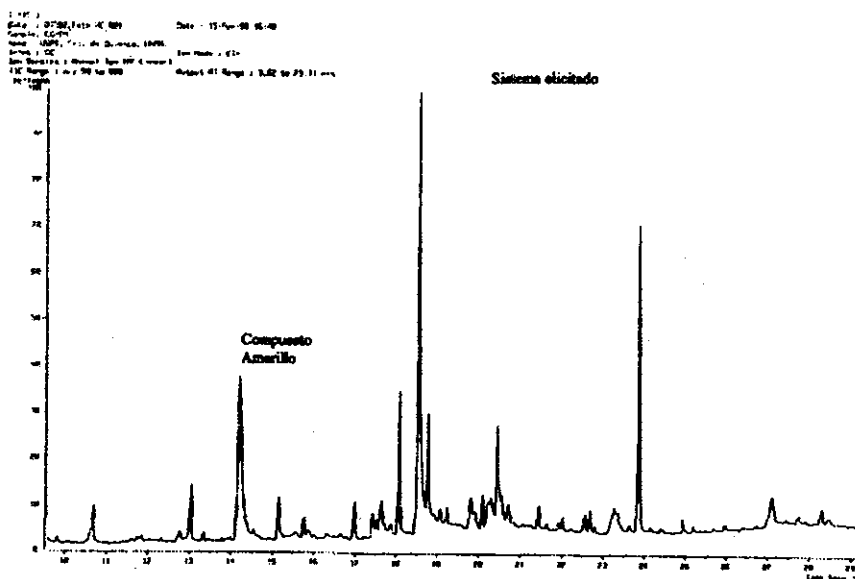
Espectro 7



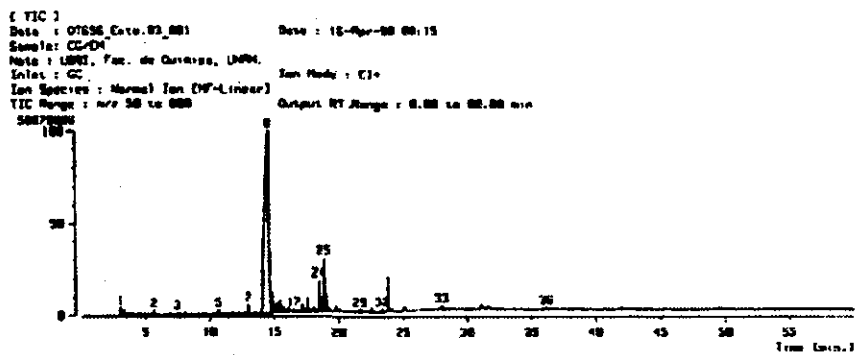
Cromatograma 9



Espectro 8

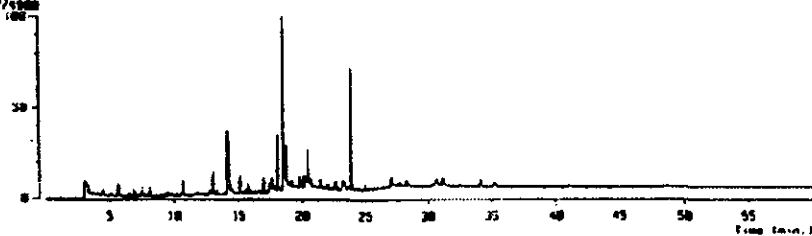


Cromatograma 10



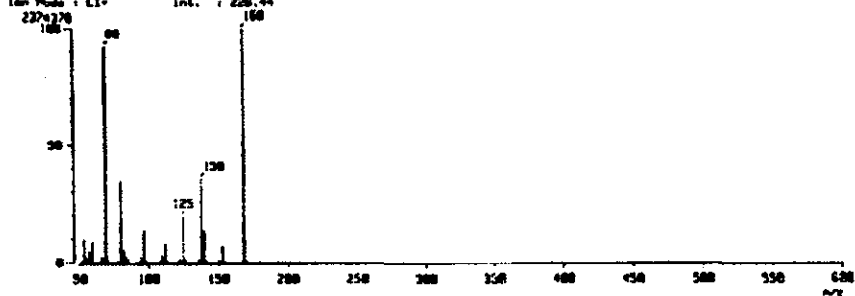
Espectro 9

[ TIC ]  
 Data : 07582\_Extra-C\_001 Date : 15-Nov-98 10:48  
 Sample: CG/CH  
 Note : LGRT, Fac. de Quimica, UNFM.  
 Inlet : GC Ion Mode : ESI  
 Ion Species : Normal Ion (V-Linear)  
 TIC Range : ave 50 to 600 Output RT Range : 0.00 to 58.00 min  
 28779988



Cromatograma 11

[ Mass Spectrum ]  
 RT : 14.17 min Scan# : 545-532-362 Temp : 20.5 deg.C  
 Ion Mode : ESI Int. : 228.44



Espectro 10

# Bibliografía

- AKERELE, O. 1990. Medicinal Plants in Traditional Medicine. En: H. Wagner, y N. Farnsworth (eds.): Economic and Medicinal Plant Research. Vol. 4. Academic Press, London. pp 5-16.
- ANAYA, A.L., CALERA, M.R., MATA, R., y PEREDA-MIRANDA, R. 1991. Allelopathic potencial of compounds isolated from *Ipomea tricolor* CAV (Convolvulaceae). J. Chem. Ecol. 16:2145
- APOSTOL, I., HEINSTEIN, P., y LOW, P. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Plant Physiol 90: 109-116.
- AKIU, S., SUSUKI, Y., FUJINUMA, Y., ASAHARA, T., y FUKUDA, M. 1988. Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis: Biochemical study in cultured B16 melanoma cell and effect on the UV-induced pigmentation in human skin. Proc. Jpn. Soc. Invest. Dermatol. 12: 138-139. En: J. Stocking., Orbitz, P., Falkenhagen, H., Lutterbach, R. y Endreb, S. 1995. Natural products and enzymes from plant cell cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43:97-109.
- ALFERMANN, A. W. y PETERSEN M. 1995. Natural Product formation by plant cell biotechnology. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43:199-205.
- ALAM, M., SATTAR, A. y JANARDHANAN, K. 1991. Changes in phenol and peroxidase with high disease of *Java citronella* infected with *Curvularia andropogonis*. Biol. Plantarum 33: 212-215.
- BAJAJ, Y. P. S., FURMANOWA, M. y OLSZOWSKA, O. 1988. Biotechnology of the Micropropagation of Medicinal and Aromatic Plants. En:

- Y.P.S. Bajaj (Eds.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 4. Medicinal and Aromatic Plants I*. Springer-Verlag, Berlin pp.60-103.
- BAKER, B., ZAMBRYSKI, P., STASKAWICZ, B., y DINESH-KUMAR, S. P. 1997. Signaling in Plant-Microbe interactions. *Science*. 276 (2): 726-733.
  - BENT, A. 1996. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. *The Plant Cell* 8: 1757-1771.
  - BERLIN, J. 1988. Formation of Secondary Metabolites in Cultured Plant Cells and Its Impact on Pharmacy. En: Y. P. S. Bajaj (Eds.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4. Medicinal and Aromatic Plants* Springer-Verlag, Berlin. pp. 37-59.
  - BOHLMANN, J., GIBALTARSKAYA, E. y EILERT U. 1995. Elicitor induction of furanocoumarin biosynthetic pathway in cell cultures of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 155-161.
  - BRENTON, F., SANIER, C., y D'AUZAC J. 1997. Scopoletin production and degradation in relation to resistance of *Hevea brasiliensis* to *Corynespora cassiicola*. *J. Plant Physiol.* 151: 595-602.
  - BROEKAERT, W., TERRAS, F., CAMMUE, B. y OSBORN, W. 1995. Plant Defensins: Novel Antimicrobial Peptides as Components of the Host defense System. *Plant Physiol.* 108:1353-1358.
  - BYE, R. 1985. En: *Two Mummies from Chihuahua: A Multidisciplinary Study*. R. A. Tyson and D. V. Elerick (eds). San Diego Museum Paper. pp 77-104.
  - CALVO, M. C. y SÁNCHEZ-GRAS M. C. 1993. Acumulation of monoterpenes in shoot-proliferation cultures of *Lavandula latifolia* Med. *Plant Science* 91: 207-212.
  - CASTAÑEDA, P., GÓMEZ, L., MATA, R., LOTINA-HENNSENA, B., ANAYA, L. y BYE, R. 1996. Phyto-growth-Inhibitor and Antifungal Constituents of *Helianthella quinquenervis*. *J. Nat. Prod.* 59: 323-326.
  - CASTAÑEDA, P. 1998. Potencial herbicida de los cromenos y benzofuranos mayoritarios aislados de *Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray. (Asteraceae). Tesis de Doctorado. UNAM. México, D.F. 213 pp.

- CASTORIA, R., ALTAMURA, M., FABRI, A., TOMASSI, M. y FANELLI, C. 1995. Interrelationships between Browning and Phytoalexin Accumulation Elicited by Arachidonic Acid. *J. Plant Physiol* 145:209-214.
- CURTIN, M. E. 1983. Harvesting profitable products from tissue culture. *Bio/Technology* 1: 649-657.
- CHAPPELL, J., LEVINE, A., TENHAKEN, R., LUSSO, M. y LAMB, C. 1997. Characterization of a Diffusible Signal Capable of Inducing Defense Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* 113: 621-629.
- DARNELL J., LODISH H., y BALTIMORE, D. 1990. *Molecular Cell Biology*. Second Edition. New York, *Scientific American Books* New York. pp. 944-946.
- DAVIS, D., MERIDA, J., LEGENDRE, L., LOW, P. y HEINSTEIN, P. 1993. Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. *Phytochemistry* 32: 607-611.
- DEBERGH, P., y READ, P. E. 1991. Micropropagation. En: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (Eds.). *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp.1-29.
- DEVERALL, B. J. 1972. Fitoalexins. En: Harbone, J. B. (Ed.). *Phytochemical Ecology*. Academic Press Inc. London. pp.217-233.
- DEVLIN, W. y GUSTINE, D. 1992. Involvement of the Oxidative Burst in Phytoalexin Accumulation and the Hypersensitive Reaction. *Plant Physiol.* 100: 1189-1195.
- DIXON, R. y HARRISON, J. 1994. Early Events in the Activation of Plant Defense Responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32: 479-501.
- FLORES, H., HOY, M. W. y PICKARD, J. 1987. Secondary metabolites from root culture. *Tibtech.* 5( 3): 64-69.
- FUJITA, Y. 1988. Shikonin: production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell culture. En: Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 4. *Medicinal and Aromatic Plants* Springer-Verlag, Berlin. pp. 224-236.
- GABRIEL, D. y ROLFE, G. 1990. Working Models of Specific Recognition in Plant-Microbe Interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 365-391.

- GEE, M., HAGEN, G. y GUILFOYLE, T. 1991. Tissue-specific and organ-specific expression of soybean auxin-responsive transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell* 3: 419-430.
- GODDJN, O., de KAM, R., ZANETTI, A., SCHILPEROORT, R. y HOGE, J. 1992. Auxin rapidly down-regulates transcription of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*. *Plant Mol. Biol.* 18: 1113-1120.
- GOTTLIEB, O. 1990. Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry*. 29 (6) :1715-1724.
- GÓMEZ, L. 1993. Estudio químico y biológico preliminar de *Helianthella quinquenervis*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México. D. F.
- HAMBURGER, M. y K, HOSTETTMANN. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30 (12): 3864-3874.
- HERZ, W. Y KULANTHAIVEL, P. 1984. Chromans from *Helianthella quinquenervis*. *Phytochemistry* 23: 435-437.
- HIRASUMA, T., PESTCHANKER, L., SRINIVASAN, V. y SHULER, M. 1996. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 95-102.
- HIRATA, K., MIYAMOTO, K., y Y, MIURA. 1994. *Catharantus roseus* L. (Periwinkle): Production of Vindoline and Catharanthine in Multiple Shoots Cultures. En: Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 26. Medicinal and Aromatic Plants VI Springer-Verlag, Berlin. pp. 46-54.
- KOKUBUN, T., HARBORNE, J., EAGLES, J. y WATERMAN, P. 1995. Four dibenzofuran phytoalexins from the sapwood of *Mespilus germanica*. *Phytochemistry* 39: 1039-1042.
- KOZAI, T., KUBOTA, CH. y JEONG, B. R. 1997. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 49-56.



- KUNZE, A., ARREGUIN, M., RODRÍGUEZ, E. y PROKSCH, P. 1996. Fate of chromene enecalinal in the interaction of *Encelia farinosa* and its specialized herbivore *Trirhabda geminata*. *J. Chem. Ecol.* 22 (3): 491-498.
- LEIFERT, C. y WAITES, W. M. 1990. Contaminants of plant tissue culture. *Newsletter* 60: 2-13.
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R. y LAMB, C. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- LEVINE, A., PENNELL, R., ALVAREZ, M., PALMER, R. y LAMB, C. 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6 (4): 427-437.
- LEYSER, O. 1997. Auxin: Lessons from a mutant weed. *Physiologia Plantarum* 100: 407-414.
- LOYOLA, V. M. y REYES, J. 1985. El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales. En: Robert, M. y Loyola, V. M. (Comp). *El Cultivo de tejidos vegetales en México*. CICY y CONACYT. México. pp.125-132.
- LOZOYA, H. 1987. Micropropagación Vegetal. CONACYT. México. pp. 63-69.
- LOZOYA, X. 1990. An Overview of the System of Traditional Medicine Currently Practised in México. En: H. Wagner. y N. Farnsworth. (eds.): *Economic and Medicinal Plant Research*. Academic Press, London Vol. 4. pp. 71-93.
- MACDONALD, H. 1997. Auxin perception and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 100: 423-230.
- MAHER, E. A., BATE, N. J., ELKIND, W. T., DIXON, R. A. y LAMB, C. J. 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91: 7802-7806.
- MAVITUNA, F. 1992. Application of Plant Biotechnology in Industry and Agriculture. En: F. Varda. y S. S. Sukan. (Eds.), *Recent Advances in Biotechnology*, Klumer Academic Publishers. Netherlands. PP. 209-226

- MÜLLER, K. O. y BÖRGER, H. 1941. Arb. biol. Anst. (Reichsanst) Berl. 23, 189-231.
- MERRILL, G. 1989. Eupatoriochromene and enecalinal, plant growth regulators from yellow starthistle (*Centaurea solstitialis* L.). J.Chem. Ecol. 15: 2073-2087.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- NIGG, H. y SEIGLER, D. 1992. Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture. Plenum Press, New York, pp. 33-73.
- PAXTON, J. 1988. Fungal Phytoalexins and their Potential Use in Agriculture. En: Cutler. (Eds.) Biologically Active Natural Products Potential Use in Agriculture. pp. 108-119.
- PARR, J. 1989. The Production of Secondary Metabolites by Plant Cell Culture. Journal of Biotechnology 10: 1-26.
- PROKSCH, P. 1991. *Ageratina adenophora* (Spreng.) K. & R.: *In vitro* Culture and the Production of Secondary Metabolites. En: Y. P. S. Bajaj (Eds.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 15. Medicinal and Aromatics Plants III. Springer-Verlag, Berlin.
- PROKSCH, P. y RODRIGUEZ, E. 1983. Chromenes and benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. Phytochemistry 22: 2335-2348.
- PROKSCH, P., PALMER, J. y HARTMANN, T. 1986. Metabolism and bioconversion of chromene derivatives in *Ageratina adenophora* (Asteraceae). Planta 169: 130-134.
- PROKSCH, P., WITTE, V., WRAY, L. y RAHANUS, I. 1987. Accumulation and Biotransformation of Chromanes in a Cell Suspension Culture of *Ageratina adenophora*. Planta Medica 488-492.
- ROBERT, L. M., REYES, J., y LOYOLA, V. M. 1991. Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. En Roca, M. y Mroginski, L. A. (Eds.), Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. pp. 211-237.

- SAAD, I. 1996. Efecto de elicitores sobre la producción de metabolitos secundarios en *Piqueria trinervia* Cav. Tesis de maestría, UNAM. México, D. F. pp. 75
- SCHÜLLING, T., SCHÄFER, S. y ROMANOV, G. 1997. Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiologia Plantarum* 100: 505-519.
- SHIMONI, M., BAR-ZUR, A., y REUVENI, R. 1991. The association of peroxidase activity and resistance of corn to *Exserohilum turcicum*. *J. Phytopathology* 131: 315-321.
- SIEBERTZ, R., PROKSCH, P., WITTE, V., y WRAY, L. 1989. Accumulation and Biosynthesis of Benzofurans in Root Culture of *Eupatorium cannabinum*. *Phytochemistry* 28 (3): 789-793.
- SITBON, F. y PERROT-RECHENMANN, C. 1997. Expression of auxin-regulated genes. *Physiologia plantarum* 100: 443-455.
- SMITH, M., CHEARY, B. y CARROLL, B. 1997. Effect of Water Bath Temperature and Stratification on Germination of Pecan Seed. *HortScience* 32 (7): 1272-1273.
- SRIVASTAVA, R. y PROKSCH, P. 1990. Toxicity and feeding deterrence of natural chromene and benzofuran derivatives to *Epilachna varivestis*. *Naturwiss.* 77: 438-439.
- STÖCKIGT, J., ORBITZ, P., FALKENHAGEN, H., LUTTERBACH, R. y ENDREB, S. 1995. Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43: 97-109.
- SUGA, C. y FUJITA, Y. 1991. Pharmaceuticals. Production of Vinca Alkaloids. En: A., Kumamine. M, Misawa. M. y F, DiCosmo (Eds.), *Plant Cell Culture in Japan. Progress in Production of Useful Plant Metabolites by Japanese Enterprises Using Plant Cell Culture Technology.* CMC Co. Ltd. pp. 11-18.
- SZABADOS, L., MROGINSKI, L. y ROCA, W. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. 174-207. En Roca, M. y Mroginski, L. A. (Eds.). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones.* CIAT.

- TAKAYAMA, S. 1991. Antitumor agents from Woody Plants. En: A, Kumamine. M, Misawa. y F, DiCosmo. Plant Cell Culture in Japan. Progress in Production of Useful Plant Metabolites by Japanese (Eds.), Enterprises Using Plant Cell Culture Technology. CMC Co., Ltd. pp. 19-26.
- TAIIVONEN, L. 1993. Utilization of Hairy Root Culture for Production of Secondary Metabolites. Biotechnol. Prog. 9: 12-20.
- TATICEK, R., MOO-YOUNG, M. y LEGGE, R. 1991. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 24: 139-158.
- TREVISAN, M. T. S., SCHEFFER, J. C. y VERPOORTE, R. 1997. Effect of elicitation on the peroxidase activity in some cell suspension cultures of hop, *Humulus lupulus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 121-126.
- VAN DER PLAS, L., EIJKELBOON, C., y HAGENDOORN, J. M. 1995. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 43: 111-116.
- VILLAREAL, M. L., ARIAS, C., FERIA-VELASCO, A., RAMIREZ, O. y QUINTERO, R. 1997. Cell Suspension Culture of *Solanum chrysoctrichum* (Schldl.).- A plant producing an Antifungal Spirostanol Saponin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 39-44.
- WEBER, W. 1952. The Genus *Helianthella* (Compositae). The American Midland Naturalist 48 (1) 1-25.
- WINK, M. 1987. Physiology of the Accumulation of Secondary Metabolites with Special Reference to Alkaloids. En: F, Constabel. y I, Vasil. (Eds.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 4. Cell Culture in Phytochemistry. Academic Press. London. pp. 17-35.
- YOUNG, P., HUTCHINS, A. y CANFIELD, M. 1984. Use of antibiotics to control bacteria in Shoot culture of woody plants. Plant Science Letter 34: 203-209.
- ZHU, Q., MAHER, E. A., MASOUD, S., DIXON, R. A. y LAMB, C. J. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitu-

tive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco.  
*BioTechnology* 12: 807-812.