



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

**ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CELULAS EN
SUSPENSION DE TAGETES ERECTA L. PARA LA
PRODUCCION DE TIOFENOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O**

P R E S E N T A :

VICTOR RAMIREZ FERNANDEZ

LOS REYES IZTACALA JUNIO 1992



El presente trabajo, se desarrolló en el Dpto. de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto politécnico Nacional, bajo la dirección del M. en C. Graciano Calva Calva.

DEDICO ESTA TESIS A:

En tu memoria: Caritina Fernández Salvador.

Con tu amanecer, llegaste del eden

Alegrando las mañanas con tu

Risa, como la flor al campo.

Incitando al mundo a la felicidad

Transcirrió tu caminar, y creaste tres

Imágenes, que te siguen amando y

Nunca te olvidan, a pesar de los

Años transcurridos, de aquel adiós.

En los momentos alegres y felices,

nunca pienso en tu ausencia, si no

que estas aquí, conmigo, como hoy.

A mi padre: Pedro Ramírez Mendez

Por tu apoyo incondicional,
que en los ratos más difíciles
siempre respondiste con hechos, y
bién sabias, que en esos momentos
bastaba tu sola presencia, pero
siempre diste más de tus posibilidades.

GRACIAS

A mis hermanos: Máximo Ramírez Fernández y

Francisca Ramírez Fernández

Por su apoyo y aliento, durante el andar de mis
días como estudiante.

A ti: ... Que no te tuve Jamás, pero te pierdo como si
hubieras sido siempre mía.

Y a todas aquellas personas, que de algun modo me han
alentado para seguir siempre adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Graciano Calva Calva. Por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos Arias Castro. Por su colaboración y sugerencias durante la revisión del presente trabajo

A la Q.F.B. Elvira Rios Leal. Por permitir el análisis cromatografico de los tiofenos.

A la I.Q.I. Victoria Labastida Galvan. Por su ayuda en el aislamiento y purificación de los tiofenos.

Y a todas aquellas personas que intervinieron en forma directa o indirectamente, pues sin su apoyo no hubiera llegado a su terminación.

INDICE

1. RESUMEN	1.
2. INTRODUCCION	3.
3. ANTECEDENTES	6.
3.1. Metabolitos primarios y secundarios	6.
3.2. Genero <i>Tageles</i>	7.
3.3. Cultivo de tejidos vegetales	12.
3.4. Cultivo <i>in vitro</i> de especies de <i>Tageles</i> , perspectivas para la producción de tiofenos	21.
4. OBJETIVOS	25.
Plan de trabajo	26.
5. MATERIALES Y METODOS	27.
5.1. Material vegetal	27.
5.2. Desinfestación y germinación de semillas	27.
5.3. Efecto de la relación 2,4-D/BAP/ANA sobre la inducción de callo	27.
5.4. Efecto de los medios semisólido y líquido agitado durante la inducción de cultivos <i>in vitro</i> a partir de diferentes órganos	28.
5.5. Efecto de la luz/obscuridad sobre el crecimiento de tejido calloso y su producción de tiofenos.	28.
5.6. Comparación entre cultivos de células en suspensión obtenidos a partir de callo y directamente de explante	29.
5.7. Efecto del medio de cultivo sobre los cultivos obtenidos a partir de callo y directamente de	

explante	29.
5.8. Aislamiento y purificación de tiofenos en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Taqetes erecta</i>	29.
5.9. extracción y cuantificación de tiofenos en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Taqetes erecta</i>	30.
6. RESULTADOS	32.
6.1. Desinfestación y germinación de semillas	32.
6.2. Efecto de la relación 2,4-D/BAP/ANA sobre la inducción de callos	32.
6.3. Efecto del medio semisólido y líquido agitado en el crecimiento y producción durante la inducción de los cultivos <i>in vitro</i> directamente de explantes de diferentes órganos	34.
6.4. Efecto de la luz y obscuridad sobre el crecimiento y producción de tiofenos en callos	35.
6.5. Comparación entre cultivos en suspensión establecidos a partir de callo y directamente de explante	36.
6.6. Efecto de los medios de cultivo (MS, SH, B5), sobre crecimiento de células en suspensión de <i>Taqetes erecta</i> producción de tiofenos por los tipos celulares aC, aE y bE	38.
7. Discusión	43.
8. Conclusiones	55
9. Sugerencias	57
10. Tablas	58.
11. Figuras	63.
12. Bibliografía	76.

INDICE DE ABREVIATURAS

α -T	α -tertiofeno
BBT	Butinilbitiofeno
BBT-Ac	4-acetoxibutinilbitiofeno
BBT-OH	4-hidroxibutinilbitiofeno
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
BAP	6-Bencilaminopurina
ANA	Acido naftalenacético
MS	Medio de Murashige y Skoog (1962)
SH	Medio de Shenk y Hildebrant (1972)
B5	Medio de Gamborg y col. (1968)
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
RC	Reguladores de crecimiento
IC	Indice de crecimiento
μ	Velocidad específica de crecimiento
td	Tiempo de duplicación
CCF	Cromatografía de capa fina
RMN	Resonancia magnética nuclear
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución

1.-RESUMEN

De la especie *Tageles erecta*, se han aislado diversos metabolitos secundarios de gran importancia biológica, dentro de los cuales se encuentran los tiofenos, que se caracterizan por tener un amplio espectro biocida. Dichos compuestos se producen en pequeñas cantidades *in vivo*, por lo que la técnica de cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa de producción.

En este trabajo, se establecieron el cultivo de callos y de células en suspensión de *Tageles erecta*, a partir de diferentes explantes de plantulas germinadas *in vitro*, en el medio de Murashige-Skoog 1962, detectandose la presencia de tiofenos.

Los reguladores de crecimiento (RC) 2,4-D y BAP en presencia y ausencia de ANA afectaron la formación de callos. En ausencia de ANA se observó, que conforme se aumentaba la concentración de BAP, el crecimiento del tejido calloso se incrementaba, mientras que al aumentar el 2,4-D, disminuía. Por otro lado, en presencia de ANA, el crecimiento solo aumentó en las combinaciones de ANA y BAP, mientras que cuando se combinaron los tres RC, hubo muy pocas variaciones en el crecimiento. De estos resultados, se eligió como concentraciones adecuadas de RC para el cultivo de callos 2.26 μM de 2,4-D y 33.3 μM de BAP.

Con respecto al efecto de un sistema semisólido y uno líquido agitado sobre crecimiento y producción de tiofenos, ambos parámetros fueron mayores en el sistema líquido agitado en relación al semisólido, y variaron según el órgano utilizado como explante. En callos, el mayor índice de crecimiento (IC) en base al PS, se obtuvo a partir de explantes de hojas (25.08), en tanto que para los cultivos en suspensión fué de cotiledón (54.7). Por otra parte, la producción de tiofenos fué mayor en los cultivos obtenidos a partir del cotiledón, detectandose 4.81 μg de tiofeno/g de PS en suspensiones celulares y 4.3 μg de tiofeno/g de PS en callos. También se observó, que tanto la concentración, como el tipo de tiofeno producido, variaron según el tipo de explante. En los cultivos provenientes de raíz y cotiledón predominó la producción del α -tertiofeno, mientras que del hipocotilo y hoja fué el butinilbitiofeno.

En cultivos de callos desarrollados en luz y oscuridad, se obtuvo una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.0989 d^{-1} y un tiempo de duplicación (td) de 9.0 d en luz, mientras que en oscuridad la μ fué de 0.051 d^{-1} y el td de 13.83 d. La producción de tiofenos, fué mayor en luz (1.58 μg de tiofeno/g de PS de callo) que en oscuridad (0.23 μg de tiofeno/g de PS de callo), el α -tertiofeno fué el que predominó en la fase estacionaria.

Durante la inducción de células en suspensión a partir de callos y diferentes explantes. Se observó que se origina un tipo celular a partir de callo (aC), mientras que los obtenidos directamente de diferentes explantes, producen dos tipos (aE y bE), donde los tipos aC y aE son morfológicamente iguales (suspensiones finas), mientras que el bE forma agregados celulares de 0.5 mm a 7mm de diámetro.

En las cinéticas de crecimiento de los tipos celulares en los medios MS, SH y B5. Se observó que independientemente de las variaciones en los parámetros cinéticos, el máximo crecimiento obtenido con los tipos aC y aE, fué de 6 g/l, en contraste con el de bE, que fué de 10 g/l. El tipo bE, es el que más produce (33,63 μg de tiofeno/g de peso seco (PS)), siguiendole el tipo aE (18.5 μg de tiofeno/g de PS) y aC 13.57 μg de tiofeno/g de PS). Por otro lado, tipos bE y aE producen más en el medio MS con respecto a SH y B5, mientras que el tipo aC produjo más en el medio SH.

2. INTRODUCCION

Entre los diversos compuestos del reino *Plantae*, se encuentran los metabolitos primarios, que constituyen la fuente principal de la organización celular y proveen la bases para el crecimiento y desarrollo del organismo, y son una fuente de alimentos: como las proteínas, ácidos grasos, carbohidratos, y vitaminas. Por otra parte, los llamados metabolitos secundarios, desempeñan un papel ecológico importante, y provienen las bases para la adaptación e interacción del organismo que lo produce con el medio ambiente, y su producción se restringe a grupos taxonómicos particulares. Entre estos compuestos se encuentran los alcaloides, terpenoides, poliacetilenos y compuestos fenólicos, que son de gran interés económico (Vickery y Vickery 1981; Crocomo y col 1981; Balandrin y col 1985; Man 1987).

Tradicionalmente, los metabolitos secundarios de los vegetales, han sido extraídos de plantas cultivados a gran escala (Yeoman 1986), pero actualmente la técnica de cultivo de tejidos vegetales (CTV), que se define como el crecimiento de células, tejidos u órganos en un medio nutritivo y en condiciones asépticas, ofrece una alternativa para la producción de dichos compuestos (Seabrook 1980; Biondi y Torpe 1981).

La especie *Fagetes erecta* (Compositae), produce diversos metabolitos secundarios de gran importancia biológica, tales como los terpenos, flavonoides, carotenoides y tiofenos. Los pigmentos carotenoides se explotan a nivel industrial como colorante, que se aislan de los pétalos de esta planta. Por otro lado, los tiofenos son de gran interés, debido a su amplio espectro biocida, entre

los principales tiofenos se encuentran: alfa-tertiofeno (α -T. 1); 5-(3-butienil)-2-2'-bitiofeno (BBT. 2), 5(4-hidroxi-1-butienil)-2-2'-bitiofeno (BBT-OH. 3) y 5(4-acetoxi-1-butienil)-2-2'-bitiofeno (BBT-Ac. 4) (fig. 3) (Bohlman y col 1973). Dichos compuestos se producen en pequeñas cantidades *in vivo*, por lo que la técnica de CTV se presenta como una alternativa para incrementar esa producción.

Previos estudios sobre el cultivo *in vitro* de especies del género *Taqetes*, muestran la presencia de tiofenos en callos, pero con las resiembras la capacidad biosintética disminuye (Ketel y col 1986a y b; Groneman y col 1984; Solborg y col 1984), aunque no se suprime totalmente la presencia de las enzimas específicas (Ketel 1986b). Estas características se observan en callos que forman estructuras organoides tales como las raíces.

Por otro lado, se ha observado que la producción de tiofenos varía de un órgano a otro (Sutfeld 1982), así como la actividad de la enzima BBT-Ac esterasa de la vía biosintética de los tiofenos (Helsper y col 1988), por lo que en el presente estudio, se indujeron callos a partir de diferentes órganos para observar si se presentan diferencias en la producción de dichos compuestos.

No obstante que en algunos sistemas se ha observado, que independientemente del origen morfológico del explante, no hay diferencias significativas en la producción de metabolitos secundarios (Sasse y col 1982; Tabata y col 1970), esto puede ser debido a que el sistema de cultivo utilizado generalmente para la inducción de callos, es el medio semisólido, que se caracteriza por formar gradientes de nutrientes (Yeoman y Forche 1980). En el presente trabajo, se inocularon explantes de *T. erecta*

directamente al medio líquido para la inducción de cultivos de células en suspensión, y se compararon las diferencias en la producción con respecto al sistema semisólido. También se reportan resultados obtenidos al inducir cultivos de células en suspensión a partir de callo y directamente de explante.

3. ANTECEDENTES

3.1. METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

En todos los organismos, los constituyentes celulares y los compuesto químicos se sintetizan y degradan por medio de una serie de reacciones químicas mediadas por enzimas, que se conoce colectivamente como metabolismo. El metabolismo primario, se caracteriza por la formación y degradación de los ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos y otros intermediarios que constituyen la fuente principal de la organización celular, y que proveen las bases para el crecimiento y desarrollo del organismo. Mientras que en el metabolismo secundario ocurren otras reacciones, como la formación de aminoácidos no proteicos, alcaloides, terpenoides, poliacetilenos y compuestos fenólicos, que no son esenciales para el desarrollo de las plantas (Luckner y Nover 1977; Vickery y Vickery 1981; Crocomo y col 1981). Una característica del metabolismo primario es que es similar en todos los organismos, mientras que el metabolismo secundario se restringe a grupos taxonómicos particulares, como en especies, géneros y en algunos casos en familias (Crocomo y col 1981; Man 1987; Vickery y Vickery 1981; Balandrin y col 1985).

La biosíntesis de los metabolitos secundarios, usualmente se restringe a ciertas etapas del desarrollo de la planta y en ciertas células especializadas (Wierman 1981), esto indica, en la mayoría de los casos, que la expresión del metabolismo secundario está basado en un proceso de diferenciación celular, por lo que también es definido como biosíntesis, transformación y degradación de compuestos orgánicos por enzimas especializadas (Luckner y

Nover 1977).

Los metabolitos secundarios, desempeñan un papel ecológico importante, y proveen las bases para la adaptación e interacción del organismo que lo produce con su medio ambiente, y pueden funcionar como atrayentes de polinizadores, agentes de defensa química, y como productos de almacenamiento y de detoxificación (Crocomo y col 1981; Man 1987). Estos compuestos se cotizan muy caro en el mercado, debido principalmente a la dificultad de extracción, purificación y disponibilidad del material vegetal (Balandrin y col 1985). Tradicionalmente los metabolitos secundarios han sido extraídos del material vegetal crecidos en plantaciones (Yeoman 1987; Fowler 1987), aunque la síntesis química ha tratado de substituir la fuente vegetal, estos constituyen aún la fuente principal para mucho compuestos, sobre todo para aquellos que son difíciles y/o costosos de sintetizar, tales como las mezclas naturales complejas. Por otro lado la síntesis química, muchas veces produce una mezcla de isómeros que no pueden resolverse a gran escala (Yeoman y col 1980). Por lo que la técnica de cultivo tejidos vegetales ofrece una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios de interés.

3.2 GENERO TAGETES

El género *Tagetes* está clasificado dentro de la familia *Compositae*, subfamilia *Asteroidae* y en la tribu *Tageteae* (Heywood 1978). Está compuesto por especies aromáticas que crecen desde el suroeste de EU hasta Argentina, siendo el sur y centro de México el área de mayor diversidad (Neher 1968). El género está compuesto por unas 40 especies (Rzedowski y Rzedowski 1975), algunas

establecidas horticulturalmente, y su uso y domesticación data desde antes de la conquista (Neher 1968, Kaplan 1960).

El uso de las especies del género *Tagetes* puede ser dividido en dos categorías: en uso ceremonial u ornamental y medicinal. En el uso ceremonial u ornamental, las especies más utilizadas son: *T. erecta* y *T. patula* que se conocen en nuestro país como Cempoalxuchitl o flor de muerto (Neher 1968; Kaplan 1960). Aparte de estas dos especies, existe otra que recibe nombre de *T. lunulata*, que pertenece al complejo que dió origen a las formas cultivadas de *Tagetes* y cuyo arreglo sistemático no se ha definido de manera satisfactoria (Rzendowski y Rzendowski 1975). En el aspecto medicinal, las porciones de la planta más usadas son las flores y las hojas, y son utilizados en infusiones o cocidos. Las propiedades farmacológicas reportados incluyen su uso como antisépticos, carminativos, diuréticos, estimulantes, vermífugos y repelentes de gusanos (Neher 1968).

T. erecta se caracteriza por ser una planta anual y puede alcanzar una altura de 1.8 m. Se cultiva con fines ceremoniales y para la extracción de colorantes. De esta especie, existen muchas variedades que difieren sobre todo en el tamaño de la cabezuela (Rzendowski y Rzendowski 1975). Esta planta produce varios metabolitos secundarios de gran importancia biológica, tales como los flavonoides, carotenoides, terpenos y tiofenos (Ickes y col 1973). Los flavonoides aislados de las hojas y flores son: quercetage-trina, quercetage-tina, tagetina, kaemferitrina, 6-OH-kaemferol-7-O-glucosido, kaemferol, kaemferol-7-O-ramnosido (fig 1) (El-Emary y Ali 1983). Se ha observado que algunos extractos que contienen estos compuestos tienen actividad

antitumoral (Ickes y col 1973). Los carotenoides aislados de los pétalos, constituyen el 1.6% del peso seco, y el 89.6% corresponde a la luteína esterificada con los ácidos grasos palmítico, mirístico y esteárico, complejo clasificado dentro del grupo de las xantófilas (Philip y Berry 1975; Gau y col 1983; Gayle y col 1986) (fig 2). Las xantófilas son producidas comercialmente para la industria avícola (Philip y Berry 1976), y considerando la solubilidad de este compuesto en aceites vegetales, comparado con la poca solubilidad de los carotenoides sintéticos, es un factor importante para la aplicación de las xantófilas para alimento humano (Philip y Berry 1975). Del aceite esencial de esta planta se han identificado más de 50 compuestos tanto de las hojas como de las flores, y los terpenos constituyen el mayor porcentaje, observándose que el aceite tiene una buena actividad antibiótica y no irrita la piel humana, además es una fragancia natural (Wang-Yang y col 1988) (Tabla 1). Dentro de los tiofenos aislados de *Fagetas* están: el alfa-tertiofeno (α -T), butienilbitiofeno (BBT), hidroxibutienilbitiofeno (BBT-OH), acetixibutienilbitiofeno (BBT-Ac) (fig 3) (Bohlman y col 1973), que se caracterizan por tener un amplio espectro biocida (Towers y Wat 1978). La presencia de estos compuestos en *Fagetas* puede estar relacionado con algún mecanismo de defensa química, observándose el mayor contenido de estos compuestos en la etapa de floración (Downum y Towers 1983), y cuando la planta está infectada con algún microorganismo (Kourany y col 1988). La distribución de los tiofenos varía con la especie, órganos y edad de las plantas. Así, en plántulas el α -tertiofeno se sintetiza más en los cotiledones que en otros órganos, el hidroxibutienilbitiofeno ocurre en raíces, cotiledones

e hipocotilo y su producción varia enormemente en cada órgano, mientras que el acetoxibutinilbitiofeno, se acumula solamente en raíz e hipocotilo, así mismo el butienilbitiofeno es el compuesto que más se produce en la plántula y su concentración es alta en hipocotilo y raíces (Sutfeld 1982). En las hojas generalmente se encuentra BBT-OH y BBT-Ac, y BBT y α -T en las raíces (Downum y Towers 1983).

El efecto biocida de los tiofenos se ha observado en virus (Hudson y col 1986), bacterias (Arnoson y col 1981), hongos (Chan y col 1979; Kourany y col 1988), larvas de insectos (Arnoson y col 1981; Downum y Rodriguez 1986), plantas (Campbel y col 1982) y en tejidos humanos (Wat y col 1980). Causa aberración cromosómica (MacRae y col 1980) e inactiva las enzimas acetil-colinesterasa y glucosa-6P-deshidrogenasa (MacRae y col 1985) (tabla 2). Debido a esta característica de los tiofenos se han utilizado como insecticidas, y los resultados obtenidos con el α -tertiofeno, indican que pueden ser formulados en diversas formas sin una baja en la toxicidad hacia los mosquitos y ciertas especies no dañinas (Arnoson y col 1988; Philogéne y col 1986).

Los tiofenos se biosintetizan vía acetato-malonato. La síntesis de estos compuestos al igual que los poliacetilenos, se inicia con el ácido oleico, que por desaturación se convierte en ácido crepenínico. Los compuestos siguientes del ácido crepenínico se forman por desaturación a través de la α y β -oxidación, descarboxilación y oxidación como lo muestra la Figura 4 (Vickery y Vickery 1981; Bohlman y col 1973). Las enzimas que inician la vía metabólica de los poliacetilenos y los tiofenos, pueden clasificarse en el grupo de las lipooxigenasas, que presentan

actividad sobre el ácido linoleico y ácido crepenínico, un ejemplo es la enzima linolato: oxígeno reductasa, que cataliza la oxigenación de ácidos grasos que contienen sistemas 1(z),4(z)-pentadieno (1), como el ácido linoleico a hidroperoxi conjugados, encontrándose que los ácidos acetilénicos formados no



son sustrato para las enzimas lipooxigenas, pero sí inhibidores (Jente y col 1988). Una vez iniciada la vía, se forman intermediarios de diversas cadenas, algunos de los cuales son precursores de la vía de los tiofenos.

Todos los tiofenos acetilados son derivados del pentain-eno (11), que se ha aislado de un gran número de especies de la Familia *Compositae*.



La formación de los tiofenos tiene lugar por la adición de grupos SH_2 al pentain-eno (11), de donde se derivan los monotiofenos, ditiofenos y tertiofenos (Bohlman y col 1973; Jente y col 1981, 1988). Entre las enzimas involucradas en la biosíntesis de los tiofenos se conoce la 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2-2'-bitiofeno: acetato esterasa (E6), que transforma 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2-2'-bitiofeno (6) a 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2-2'-bitiofeno (1) (Sutfel y Towers 1981). La transformación de 3,4-(diacetoxi-1-butinil)-2-2'-bitiofeno (3), es catalizado por otra acetato-esterasa (E3) a 3-hidroxi-4-acetoxibutinilbitiofeno (3*) mediante la transformación de este último producto por E6 aparece

3,4-dihidroxi-*butirilbitiofeno* (0) (Pensel y Sutfeld 1985) . La reacción inversa es catalizada por la enzima acetil-CoA:4-hidroxi-*butirilbitiofeno*-O-acetil- transferasa (A1), que acila 1 y 0 en presencia de donadores de acilos como la acetil-CoA, la acilación de 3 puede intervenir otra enzima no identificada (A?) (Metschulant y Sutfeld 1987) (Fig. 5). Hasta ahora 0 y 1 son derivados de precursores aún no identificados, teniendo como productos finales BBT y α -T. Los hidroxiderivados 0 y 1, sintetizados en exceso en ciertas etapas de desarrollo de la planta, sufren acetilación, transporte y almacenamiento, en ciertos compartimentos celulares (cuadro con línea en guiones de la fig 6), en este caso la enzima A1 puede ser el suministrador de los substratos a este compartimento. Los productos formados aquí son sustratos para la actividad de E6 y E3 (Sutfeld 1988).

3.3. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

La técnica de cultivo de tejidos vegetales (CTV), se refiere al crecimiento *in vitro* de cualquier parte de una planta, ya sea células, tejidos u órganos en condiciones asépticas (Seabrook 1980; Biondi y Torphe 1981). La parte de la planta con que se inicia el cultivo se le llama explante (Kurz y Constabel 1979). Por conveniencia la técnica de CTV puede ser dividido en cinco clases:

- 1) Cultivo de callos: se refiere al cultivo de masas celulares en un medio nutritivo con agar y producido a partir de un explante.
- 2) Cultivo de células: es el cultivo de células en suspensión, los cuales son producidos por la transferencia de callos a medio

líquido y aireados por agitación.

3) Cultivo de órganos: es el cultivo aséptico en medio nutritivo de embriones, anteras (microesporas), ovarios, raíces, tallos u otros órganos vegetales.

4) Cultivo de meristemos y morfogénesis: es el cultivo aséptico de meristemos de tallos u otros explantes, en medio nutritivo con el propósito de crecer plantas completas.

5) Cultivo de protoplastos: es el aislamiento aséptico y cultivo de células sin pared celular, iniciados a partir de células en suspensión o tejido de una planta (Gamborg y Shyluk 1981).

La aplicación de la técnica de CTV en cualquier especie vegetal generalmente involucra el crecimiento del tejido calloso, que aparece naturalmente, cuando la planta sufre un daño superficial y persiste por un periodo corto de tiempo (Yeoman y Forche 1980). *In vitro* es obtenido en presencia de reguladores de crecimiento (RC) y se caracteriza por ser un tejido amorfo con células altamente vacuoladas (Seabrook 1980). El principio básico de la técnica de CTV es el de la totipotencia, que se refiere a que una célula del tejido de un vegetal diploide, en donde la diferenciación terminal no se haya llevado a cabo, puede por la influencia de un estímulo adecuado regenerar la habilidad para producir una nueva planta (Street 1976).

Los requerimientos nutricionales para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, varía considerablemente de especie a especie, y de acuerdo al tipo de órgano en cuestión, pero hay ciertos requerimientos generales que pueden ser reconocidos. Puesto que muchos cultivos *in vitro* son incapaces de fotosintetizar, requieren de una fuente de carbono, que se suministra en forma de

sacarosa u otros carbohidratos. Aunado a esos requerimientos, a los medios de cultivo, se les adicionan reguladores de crecimiento (RC), suplementos orgánicos, sales minerales y a veces algún agente solidificante. De lo anterior, los constituyentes de los medios de cultivo para células vegetales, pueden agruparse en los siguientes grupos:

-Macronutrientes

-Micronutrientes

-Reguladores de crecimiento (RC) y

-Suplementos orgánicos (vitaminas y aminoácidos).

Los macronutrientes generalmente se requieren en grandes cantidades. Aparte de C, H y O, se requieren el N, P, K, Mg, S y Ca, mientras que los micronutrientes requeridos en pequeñas cantidades son: Fe, Mo, Mn, Zn, Bo, Cu y Co. Los reguladores de crecimiento (RC) que son usados para la obtención de los cultivos *in vitro*, generalmente pertenecen al grupo de las auxinas y las citocininas. Las auxinas estimulan el alargamiento celular y la acción puede estar relacionada con la estimulación del ADN y ARN y síntesis de proteínas. Las citocininas están involucrada en la división celular (Everett y col 1978). Las vitaminas de uso general en CTV, son las hidrosolubles o grupo B, como la tiamina, niacina, piridoxina y ácido pantoténico. De los medios de cultivo, el de Murashige-Skoog MS (1962) y el de Shenk-Hildebrandt SH (1972), son los más comúnmente utilizados en el cultivo de células vegetales (Dixon 1985). A diferencia del medio de Gamborg y col (1968) denominado B5, tanto el MS y SH utilizan la misma fuente de Fe. La fuente de N es más del doble en el medio MS con respecto a B5 y SH, mientras que el P es alto en SH, siguiéndole B5, así

mismo el S se presenta en mayor cantidad en B5 en relación al MS y SH.

En el establecimiento del tejido calloso, es necesario elegir una fuente de explante, procurando que esté en un estado fisiológico conveniente. Generalmente un tejido joven resulta más idóneo (Dixon 1985). El explante generalmente está contaminado con una amplia variedad de microorganismos, y para evitar que proliferen en el medio de cultivo e interfieran con el crecimiento de los callos, debe ser sometido a un proceso de desinfestación (Yeoman y Macleod 1977; Seabrook 1980), para ello existe una gran variedad de agentes químicos, cuya selección y tiempo de tratamiento depende de la sensibilidad del material vegetal. Cabe mencionar que el desinfestante no solo remueve completamente los microorganismos, si no que también es letal para el tejido, por lo que debe ser removido del explante. La efectividad de los agentes desinfestantes se puede incrementar añadiendo una pequeña cantidad de detergente como el tween a la solución del agente, la adición de este compuesto, afecta la tensión superficial del tejido y permite que el agente penetre y destruya al microorganismo (Yeoman y Macleod 1977). Aunado a estos tratamientos, se le puede dar un pretratamiento al explante antes de la desinfestación, exponiendo éste al alcohol etílico absoluto (Dixon 1985). Una vez que el explante ha sido desinfestado y el medio de cultivo elegido, el proceso de inducción del tejido calloso se inicia. EL callo obtenido puede ser mantenido por subcultivos periódicos, transfiriendo fracciones de callos al medio de cultivo nuevo.

Un cultivo en suspensión consiste de células individuales, agregados celulares dispersados creciendo en un medio líquido

agitado (Street 1977). Tales cultivos se inician por la transferencia de fragmentos de callos friables al medio líquido de la misma composición que el utilizado para crecer callos. Los cultivos en suspensión pueden ser establecidos directamente del explante, sin embargo, puede haber limitación, debido principalmente al largo periodo que se necesita para iniciarlos, y a la disponibilidad del equipo de agitación. Algunas de esas limitaciones puede ser minimizados, si el explante es disgregado con enzimas como la pectinasa, antes de la iniciación del cultivo (Dougall 1980). Otra vía para iniciar directamente los cultivos en suspensión a partir del explante, es mediante un rompimiento suave con un homogenizador, transfiriendo el homogenizado al medio líquido (Street 1977).

Los cambios metabólicos en el explante pueden dividirse en tres etapas durante la inducción del tejido calloso: inducción, división y diferenciación. Durante la inducción, las células se preparan a dividirse, el metabolismo se activa y el tamaño celular permanece constante, esto es seguido por una fase de síntesis activa y la disminución del tamaño celular se inicia por la división en las capas superficiales. Durante esta fase, el cambio regresivo involucra un retorno progresivo al estado meristemático, que se conoce como desdiferenciación, en esta fase, la división se efectúa en todas las regiones del callo y eventualmente forman estructuras diferenciadas, este nuevo curso es marcado por un incremento de la diferenciación celular através de la maduración de algunas células y expansión de otras (Aitchison y col 1977).

La aplicación de la técnica de CTV, se puede dividir en dos grandes aspectos: La micropropagación y la producción de

metabolitos secundarios. La micropropagación a nivel industrial se ha considerado no sólo como un medio de propagación de plantas importantes económicamente, si no también como un método para desarrollar nuevas variedades, el escalamiento a este nivel implica la mecanización desde el inicio de la técnica (Giles y Morgan 1987). Otro aspecto importante, es la producción de semillas artificiales para la propagación de los vegetales (Fujii y col 1987). La aplicación potencial de la micropropagación puede resumirse en las siguientes categorías: propagación masiva de las plantas alimenticias, regeneración de las plantas potencialmente útiles, recuperación de las plantas en peligro de extinción, obtención de plantas libres de virus, preservación del germoplasma e inducción de la variabilidad genética (Rublúo 1985).

En la producción de metabolitos secundarios, como una alternativa de producción de compuestos de gran importancia biológica, como los productos farmacéuticos, saborizantes, fragancias, pigmentos y los agroindustriales como los pesticidas (Tabata 1977; Whitaker y Evans 1987; Heinstejn y Emery 1988). El CTV presenta ventajas sobre el cultivo convencional, en que los compuestos de interés, pueden ser producidos en condiciones controladas independientemente de los cambios climatológicos, de suelo y libres de organismos patógenos, como los virus. Además las células de plantas tropicales o alpinos, pueden multiplicarse fácilmente para obtener sus metabolitos específicos, y el control del crecimiento celular y la regulación racional de los procesos metabólicos pueden contribuir a la reducción del costo e incrementar la productividad (Tabata 1977).

En la producción de metabolitos secundarios por esta técnica,

se han seguido diversas estrategias, que van desde el uso del tejido calloso, células en suspensión, rediferenciación a órganos, hasta el cultivo de células transformadas y cultivo de órganos (Misawa 1977; Flores y col 1987; Staba 1985). Una ventaja de la producción por cultivo de órganos, es que tienen la capacidad de producir los compuestos deseados en cantidades similares o mayores a los de las planta intacta, y son genéticamente más estables (Staba 1985).

Uno de los prerequisites para el uso de las células vegetales en la producción de metabolitos secundarios es su adaptabilidad a las condiciones de cultivo sumergido, y esto puede ser posible mediante el cultivo de células en suspensión a gran escala (Kurz y Constabel 1979). El cultivo de células en suspensión, puede potencialmente crecer a la misma escala que las fermentaciones microbianas, sin embargo, el tamaño de las células vegetales, baja velocidad de crecimiento, fragilidad, aglomeración y sus requerimientos nutricionales, son problemas asociado al proceso. Además el período de cultivo prolongado, incrementa el riesgo de contaminación (Ellis 1986; Rhodes y col 1987).

Una desventaja de los cultivos vegetales *in vitro*, es que generalmente no producen o tienen una baja capacidad biosintética de los compuestos deseados, esto obviamente limita su aplicación a nivel industrial. Existen sin embargo, varias especies vegetales, en donde se ha igualado o superado la producción a los de la planta intacta (Dougall 1985; Rokem y Goldberg 1985). Para resolver este problema se ha propuesto diversas estrategias: 1) selección de plantas altamente productoras, 2) establecimiento de cultivo de células de esas plantas, 3) selección clonal repetida

de las líneas celulares obtenidos usando un procedimiento analítico sensible, 4) establecimiento de las líneas celulares estables capaces de producir grandes cantidades de metabolito y 5) desarrollo de un medio de producción (Deus y Zenk 1982).

Las diferencias en composición que presenta cada medio de cultivo pueden influir en la producción de metabolitos secundarios. Un ejemplo de esto es el comportamiento observado con las células de *Lithospermum erythrorhizon*, cuando fueron cultivadas en el medio de Linsmaier-Skoog (LS) (1965) no produjeron shikonina, pero si lo hicieron cuando se empleó el medio de White's (W) (1943). Posteriormente se comprobó que la razón de este comportamiento fué debido al fuente de nitrógeno presentes en dichos medios de cultivo. La presencia de amonio inhibió la producción de shikonina (medio LS), mientras que el nitrato la estimuló (medio W) (Fujita y Tabata 1987). Por otra parte, la producción de alcaloides carbolinos en *Phaseolus vulgaris*, se observó solamente cuando se le adicionó el triptófano como una fuente adicional de nitrógeno (Veliky 1972). La fuente de carbono, generalmente sacarosa, juega un papel importante no solo en la estimulación del crecimiento, si no también en el incremento de la síntesis de producto, así por ejemplo en cultivos en suspensión de *Eatharantus roseus*, se demostró que al incrementar 4 veces la concentración de sacarosa se obtuvo un aumento de 2.6 veces en la producción de antocianinas (Knobloch y col 1982). En forma similar los cultivos de *Eschscholzia californica*, produjeron siete veces más alcaloides benzophenantridina (Berlin y col 1983), y *Dioscorea deltoidea* duplicó su producción de diosgenina cuando se incrementaron las concentraciones de la fuente de carbono (Gressel

y Goldberg 1982). En forma similar, la limitación de fosforo en el medio de cultivo generalmente favorece la producción de metabolitos secundarios, ejemplo de ello, es el incremento en la síntesis de alcaloides β -carbolinos y serotoninas en *Pegamum harmala* (Sasse y col 1982), y de putrecinas en *Nicotiana tabacum* (Knobloch y col 1981).

Otros componentes que influyen en la producción son los reguladores de crecimiento (RC), tanto las auxinas y citocininas. Se ha observado que el 2,4-D inhibe la morfogénesis y la producción en algunos sistemas (Mantell y Smith 1983). Al suplementar el medio de cultivo con 2,4-D y ANA, no se incrementaron las cantidades relativas de las coumarinas en *Datura*, en tanto que las antocianinas se acumularon en grandes cantidades en células crecidas en bajas concentraciones de ANA, indicando que ANA reprime la producción. Así mismo ambos RC afectaron la producción de etileno (Gamborg y col 1970).

La relación entre crecimiento y producción, puede llevar a adoptar algún tipo de proceso de producción, como el de una fase, en donde el crecimiento y producción se lleva a cabo en el mismo proceso, o el proceso de dos fases, en donde se elige un medio para el crecimiento y otro para la producción (Fowler 1987; Fujita y Tabata 1987). Otras estrategias para activar la producción, son la inmovilización de las células, adición de precursores, así como las condiciones de cultivo empleados, como la luz, PH y aireación.

Actualmente es aceptado que el proceso de diferenciación es un factor importante en la producción de metabolitos secundarios, normalmente *in vivo* la biosíntesis de estos productos usualmente se restringe a etapas de desarrollo específico del organismo y en

células específicas (Luckner y Nover 1977; Wierman 1981). En los cultivos *in vitro*, cierto grado de diferenciación se hace evidente en agregados celulares, desarrollo de cloroplastos o pigmentación en las células o bien en forma definitiva en los cultivos de estructuras organizadas como embriones, tallos, raíces, etc., todos estos aspectos son conocidos como citodiferenciación (Yeoman 1987).

Generalmente cuando mayor es el grado de citodiferenciación mayor es la producción de metabolitos secundarios. Así por ejemplo, en los cultivos de *Datura*, *Palanum*, *Atropa* y *Rioscymuss*, los callos con pigmentación y crecimiento lento, producen mayor cantidad de alcaloides, que los callos sin diferenciación y crecimiento rápido, similares resultados se obtienen con células en suspensión (Lindsey y Yeoman 1983). En la producción de saborizantes, la rediferenciación del callo es necesario para la producción en cultivos de cebolla (Collin y col. 1986), similares resultado se ha obtenido en otros sistemas (Kamo y col 1986; Collinge y Yeoman 1986). En especies de *Fageles*, aparentemente hay una correlación entre diferenciación morfológica y acumulación de tiofenos (Croes y col 1987 a y b).

El efecto del producto final en la producción es importante, ya que puede regular su biosíntesis (regulación por producto final), como se ha observado en los microorganismos (Vinig 1986). En cultivo de células vegetales, se ha demostrado un comportamiento similar (Knoop y Beiderbeck 1983).

3 4. CULTIVO *in vitro* DE ESPECIES DE *Fagates*: PERSPECTIVAS PARA LA PRODUCCION DE TIOFENOS.

En la regeneración de *F. erecta* se ha utilizado diferentes partes de la planta como fuente de explante para la inducción del tejido calloso, tales como la hoja (Kotari y Chandra 1984), capítulo (Moham-Ram y col 1982), flores (Kotari y Chandra 1986), tallos (Jain 1977) y de hojas de diferentes edades (Ketel y col 1985).

Jain (1977), reporta la producción de isopiretrinas en callos de *F. minuta*, los cuales muestra un efecto de insecticida sobre *Trilobium* sp y *Fragoderma* sp similar al estandar de piretrinas. Sin embargo estudios posteriores indicaron que las especies de *Fagates* produce tiofenos tanto *in vivo* como *in vitro*, y no se confirmó la producción de isopiretrinas (Solborg y col 1984; Groneman y col 1984).

En la producción de tiofenos en callos con estructuras organoides de las especies de *F. erecta*, *F. minuta* y *F. patula* se ha observado que conforme se resiembran, la capacidad biosintética desaparece, y la producción varía de una especie a otra (Ketel 1987). Además, independientemente de la nutrición mineral el número de compuestos no polares es similar (Ketel 1986a). Por otra parte, en cultivos de células en suspensión de *F. minuta* no se detectó la producción de tiofenos (Groneman y col 1984; Ketel 1987). Aunque al inducir células en suspensión a partir de callos con una o dos resiembras, la producción de tiofenos se prolongó por más tiempo luego desapareció, y no varió en suspensiones inducidas a partir de callos caracterizados por un alto o bajo nivel de producción (Ketel 1988). Por otra parte, en cultivos de

células en suspensión que muestra diferenciación en forma de agregados celulares , produjeron tiofenos y liberaron el tiofeno polar hidroxibutinilbitiofeno al medio de cultivo (Ketel 1988), posteriormente se observó que el tamaño de agregados optimo para la producción estaba en el rango de 11 a 13 mm (Hulst y col 1989). Asi mismo, al someter cultivos de células en suspensión de 2 años de edad de *J. minuta* a un sistema de inmovilización, se observó la producción de tiofenos (Ketel y col 1987). En otros sistemas, donde se utilizó el cultivo de raíces transformadas, se observó una alta producción de estos compuestos, pero al igual que los callos, con las resiembras la producción disminuyó (Norton y col 1985).

Por otro lado, en cultivos de callos se ha observado, que no se suprime totalmente la presencia de enzimas específicas de la vía de los tiofenos (Ketel 1986b), y la variación de la actividad de las enzimas acetato: estererasas decrece en el siguiente orden: hojas , flores , tallos , Cultivo de células , callos y raíces (Helsper y col 1988). lo anterior se relaciona con los resultados obtenidos por Sutfeld (1982), que reporta la variación de la producción de tiofenos en los diferentes órganos de *Tagetes patula*.

No obstante, también se ha observado que independientemente del origen morfológico de los cultivos no hay diferencias en la producción de metabolitos secundarios (Sasse y col 1982; Tabata y col 1970). Esto puede ser debido a que la inducción del tejido calloso se lleva a cabo en un sistema semisólido en donde se forman gradientes de nutrientes, que conlleva a que no todas las células aprovechen totalmente los nutrimentos y por ende afecte al

crecimiento y producción. Y considerando las variaciones metabólicas que sufre el explante durante la iniciación de los cultivos *in vitro*, tales como la variación de: a) la acumulación de ARN (MacLeod y col 1979), b) las enzimas involucradas en la síntesis de ADN (Harland y col 1973), c) las enzimas de la vía de las purina (Komamine y Shimizu 1975), d) la variación de la composición de los aminoácidos, así como su distribución en las proteínas durante la inducción de callos (Kemp y Sutton 1972), e) la variación de las aspartatocinasas al inocular los explantes en medio líquido (Sakano y Komamine 1975) f) la regulación por producto final, que puede llevarse a cabo en caso de que haya producción en callos y el compuesto no puede ser removido de la superficie del tejido (Becker 1987). Entoces al inducir células en suspensión directamente de explante, habría diferencias en crecimiento y producción con respecto al sistema semisólido. De igual modo, las suspensiones obtenidos a partir de callo y directamente de explante presentarían diferencias.

4.-OBJETIVOS

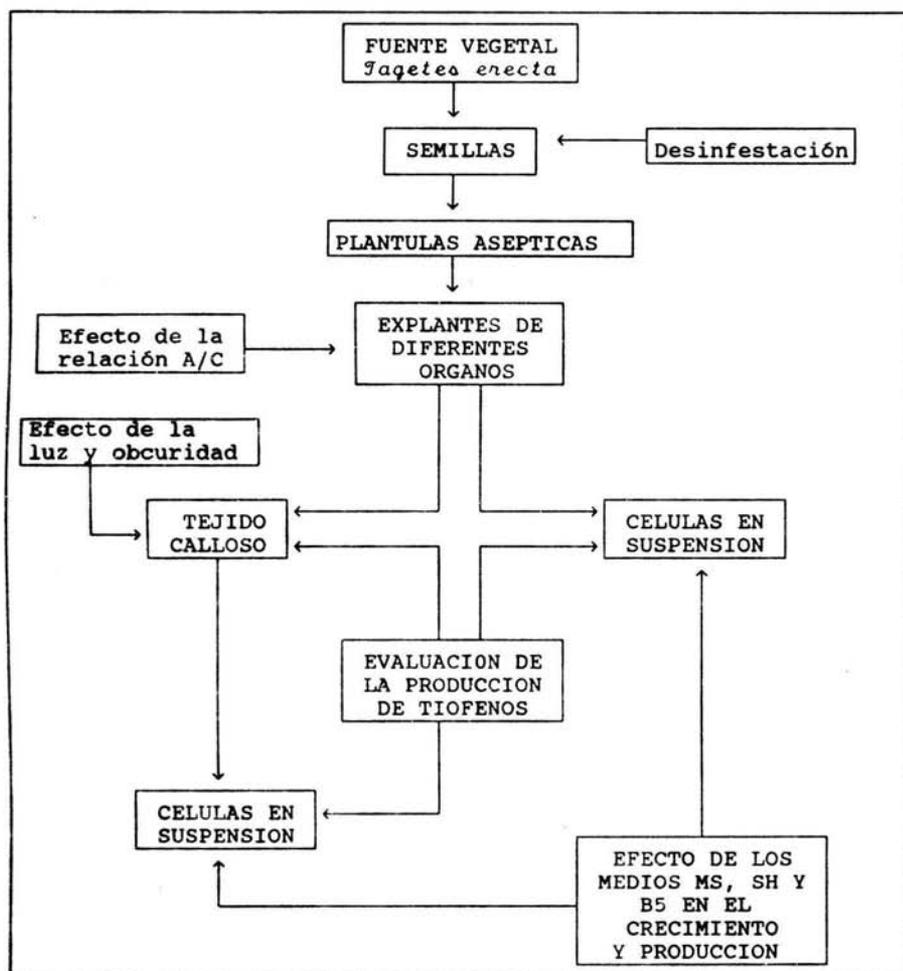
OBJETIVO GENERAL

COMPARAR LA PRODUCCION DE TIOFENOS EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Fagetes erecta* L, ESTABLECIDOS A PARTIR DE CALLOS Y DIRECTAMENTE DE EXPLANTE.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión de *Fagetes erecta*.
- 2.-Establecimiento de los métodos de extracción y cantificación de tiofenos.
- 3.-Comparar cultivos de células en suspensión obtenidos a partir de callo y directamente de explante.
- 4.-Estudiar el efecto de los medios de cultivo y de la influencia de luz/obscuridad sobre el crecimiento y producción de tiofenos por cultivos de callos y células en suspensión.

PLAN DE TRABAJO



5. MATERIALES Y METODOS.

5.1.-MATERIAL VEGETAL.

Se emplearon semillas de *Taquetos erecta* L. donadas por la compañía Bioquimex.

5.2.- DESINFESTACION Y GERMINACION DE LAS SEMILLAS.

Para la obtención de plántulas asépticas, las semillas se hidrataron por una hora con agua destilada, luego se colocaron en alcohol etílico absoluto por un minuto, se lavaron 3 veces con agua destilada y se sometieron a un proceso de desinfestación a diferentes tiempos de exposición dentro de una solución de hipoclorito de sodio al 5% con una gota de tween-20. Posteriormente se lavaron varias veces con agua destilada estéril y se colocaron en frascos con 25 ml de medio de Murashige-Skoog (MS) (1962) suplementado con 2% de sacarosa y 1.5 g/l de gelrite. Para cada tratamiento se utilizaron 10 frascos con 10 semillas cada uno y se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C y una intensidad luminosa de 8400 lux.

5.3. EFECTO DE LA RELACION 2,4-D/ANA/BAP SOBRE LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO.

Por medio de un diseño factorial $4 \times 4 \times 2$, se determinó el efecto del ácido 2,4-diclofenoxiacético (0-9.04 μM) y Benzil aminopurina (0-33.3 μM), en ausencia y presencia de 2.68 μM del ácido naftalenacético sobre la formación de tejido calloso. Se usaron explantes del hipocotilo de 1.5 cm, que se incubaron en medio (MS) suplementado con 2% de sacarosa. Cada tratamiento se realizó por triplicado, y se evaluó el crecimiento, mediante el peso fresco (PF) y peso seco (PS). El PF se evaluó pesando el

tejido sobre un papel aluminio previamente puesto a peso constante, el PS poniendo el callo sobre el mismo papel y secándolo hasta peso constante en una estufa con vacío y a 60°C. Se determinó el índice de crecimiento (IC), con la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{Peso final (PF)} - \text{Peso inicial (PI)}}{\text{Peso inicial}}$$

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza.

Modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{l(ijk)}$$

Donde: Y= Variable respuesta; μ = gran media A= Factor 2,4-D; B= Factor BAP; C= Factor ANA; E= Error exponencial; i= Niveles de A; j= Niveles de B; k= Niveles de C; l= Número de repeticiones.

5.4. EFECTO DE LOS MEDIOS SEMISOLIDO Y LIQUIDO AGITADO SOBRE LA INDUCCION DE CULTIVOS *in vitro* A PARTIR DE DIFERENTES ORGANOS.

Para este experimento se indujo callo (en medio semisólido) y células en suspensión (en medio líquido agitado) a partir de tres explantes de tallos (1.5 cm), dos hojas completas, dos cotiledones completos y raíces completas (4 cm) de plántulas de 25 días de edad. Se usaron frascos con 25 ml de medio MS conteniendo 2% de sacarosa y gelificado con gelrite y matraces con 50 ml del mismo medio de cultivo no gelificado. La concentración de RC

determinados previamente de acuerdo a 5.3. El crecimiento de los cultivos y la producción de tiofenos se evaluó a los treinta días.

5.5. EFECTO DE LA LUZ/OBSCURIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO DE TEJIDO CALLOSO Y SU PRODUCCION DE TIOFENOS.

Para este experimento se realizaron cinéticas de crecimiento en luz (8400 lux) y en obscuridad permanente, en ambos casos se usó un gramo de peso fresco de callo y cuantificó el PF, PS y producción de tiofenos cada tercer día. Para las determinaciones de PF ,PS y tiofenos, el callo se dividió en dos partes iguales, y en una se determinó el PF y PS, mientras que en la otra se evaluó la producción.

5.6. COMPARACION ENTRE LOS CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION OBTENIDAS A PARTIR DE CALLO Y DIRECTAMENTE DEL EXPLANTE.

El cultivo de células en suspensión a partir de callo, se obtuvo por la transferencia de 5 gramos de callo fresco a 100 ml de medio de cultivo. Por otro lado, se inocularon explantes de 1.5 cm de tallo, dos hojas, dos cotiledones ó la raíz completa, en 50 ml de medio líquido. La concentración de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo fué la misma que la utilizada para crecer callos (inciso 5.3). Los cultivos se incubaron en una agitadora orbital a 80 rpm, 25 °C y 8400 lux.

5.7. EFECTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO SOBRE LAS SUSPENSIONES CELULARES, OBTENIDAS A PARTIR DE CALLO Y DIRECTAMENTE DE EXPLANTE.

Para el efecto de los medios de cultivo, se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de tiofenos en los medios de Murashige-Skoog 1962 (MS), Shenk- Hildebrant 1972 (SH) y Gamborg y col 1968 (B5). los cultivos de células en suspensión utilizados

fueron aquellos originados a partir de callo y directamente del explante hoja. En todos los casos se cuantificó el crecimiento celular y la producción de tiofenos cada tercer día.

5.8. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE TIOFENOS EN CULTIVOS *in vitro* DE *Taqetes erecta*.

Inicialmente, se determinó la presencia de estos en los cultivos de callos y células en suspensión por cromatografía de capa fina (CCF) preparados en placas de vidrio con silica-gel 60 y se revelaron con luz UV a 260 nm (Chan y col 1975). Como fase móvil se utilizó éter de petróleo: éter etílico:acetona (9:1:1). Posteriormente la misma fase móvil se utilizó para purificar los tiofenos contenidos en los extratos de callo y células en suspensión por cromatografía en columna. Se determinó la identidad de los tiofenos por resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

5.9. EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE TIOFENOS EN CULTIVOS *in vitro*.

Los tiofenos de los cultivos de callo y células en suspensión se extrajeron según el método de Norton y col (1985), que consiste en homogenizar las células en etanol absoluto (1 g de PF/5ml de etanol), filtrar y agregar un volumen igual de agua destilada. Luego se hizo extracción con igual volumen de éter de petróleo (EP) por tres veces. El EP se evaporó a sequedad. Por otro lado del medio líquido libre de células se extrajeron los tiofenos de acuerdo con Ketel (1987), donde al medio se agregó igual volumen de hexano, se puso por una hora en agitación constante, después la fracción de hexano se separó y se evaporó a sequedad. Todos los extractos provenientes de biomasa y medio líquido se

resuspendieron en 250 μ l alcohol etílico absoluto y se almacenaron a 0-4 °C para llevar a cabo posteriormente la cuantificación de la producción de los tiofenos por CLAR.

En la cuantificación de la producción de tiofenos, se utilizó como fase móvil Metanol:Agua:Acido acético (80:18:2 v/v), en una columna HPLC de fase reversa, nucleosil C₁₈ detector UV a 340nm y un flujo de 1.5 ml/min. Todos los picos eluidos después del solvente y antes del α -tertiofeno se consideraron como tiofenos.

6. RESULTADOS

6.1. DESINFESTACION Y GERMINACION DE SEMILLAS

Con el objetivo de determinar el tiempo más adecuado de exposición de las semillas al agente desinfectante (NaClO), estas se expusieron durante 5, 7.5, 10 y 12.5 minutos a una solución de NaClO al 5% y una gota de tween-80. Se observó que conforme se incrementaba el tiempo de exposición al agente desinfectante, la contaminación disminuía (fig. 7). Por otra parte, los porcentajes más altos de germinación se obtuvieron después de 10 y 12.5 minutos de exposición. En base a ello se eligió 12.5 min. como tiempo adecuado de exposición para obtener plántulas asépticas requeridos para los experimentos posteriores.

6.2. EFECTO DE LA RELACION 2,4-D/BAP/ANA SOBRE LA INDUCCION DE CALLOS

En este experimento se empleó un diseño factorial de 4x4x2 (fig. 8), para estudiar el efecto de los RC Benzilaminopurina (BAP) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en ausencia o presencia de ácido naftalenácético (ANA), sobre la inducción de callo a partir de explantes provenientes de tallos de aproximadamente 1.5 cm de longitud. De los 32 tratamientos, 5 empezaron a formar callos a los 4 días, y con el transcurso del tiempo, en los que contenían solamente BAP Y ANA, formaron callos con raíces ó solamente raíces y, en ausencia de RC formaron raíces, mientras que en las que contenían 2,4-D formaron callos sin diferenciación morfológica.

En ausencia de ANA, se observó que conforme se incrementaba

la concentración de BAP el crecimiento aumentaba, mientras que al incrementar el 2,4-D disminuía (Fig. 8a). El Índice de Crecimiento (IC) "máximo" que se obtuvo fué de 4.17 con la concentración de 33.3 μM de BAP y 2.26 μM de 2,4-D.

En presencia de 2.68 μM de ANA (Fig. 8b), este es capaz de inducir callos, y al combinarse con BAP, se obtienen callos con diferenciación morfológica en forma de raíces, en tanto que al combinarse con 2,4-D y en la presencia de los tres RC se formaron callos sin diferenciación morfológica. En este diseño se observó un pico máximo de crecimiento, con 22.2 μM de BAP y 2.68 μM de ANA, con IC de 1.48, mientras que en la presencia de los tres RC, el IC máximo fué 0.53 en 4.44 μM de BAP, 4.52 μM de 2,4-D y 2.68 μM de ANA. Los callos obtenidos en las combinaciones de los tres RC se caracterizaron por ser muy friables. Al aplicar el análisis estadístico trifactorial, se observó que existe efecto de todos los factores, excepto con el ANA y la interacción ANA*BAP en un nivel de significancia del 0.01 como se observa en la (Tabla III).

De los resultados anteriores, se eligió la concentración de BAP (33.3 μM de BAP), 2,4-D (2.26 μM) y de ANA (0 μM) para los siguientes experimentos. Debido a que en esta concentración se obtuvieron callos con el mayor IC y sin formación de estructuras organoides. Esta concentración se utilizó después para inducir células en suspensión, y una vez obtenidos esos cultivos, se usó la biomasa para reiniciar cultivo de callos.

Lo anterior se hizo mediante un diseño factorial de 3x3, para corroborar si se estaban usando las concentraciones adecuada de RC. En este estudio se obtuvieron muy pocas variaciones en el crecimiento en presencia de BAP, pero al incrementar 2,4-D el

crecimiento tendió a disminuir (Figura 9). Se aplicó un análisis de varianza bifactorial, y se obtuvo que en un nivel de significancia del 0.5, el único factor que influyó en el crecimiento fué el 2,4-D (Tabla IV). Debido a lo anterior, se decidió seguir utilizando la concentración 33.3 μM de BAP y 2.26 μM de 2,4-D para los siguientes experimentos.

6.3 EFECTO DEL MEDIO SEMISOLIDO Y LIQUIDO AGITADO EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DURANTE LA INDUCCION DE LOS CULTIVOS *in vitro* DIRECTAMENTE DE EXPLANTES DE DIFERENTES ORGANOS

La identificación de la presencia de tiofenos en los cultivos *in vitro*, se realizó mediante cromatografía de capa fina (CCF) (Tabla V), usando como estándar un extracto de flor de *Taqetes erecta*, y como fase móvil éter de petróleo: acetona: éter etílico (9:1:1 v/v). En la Tabla IV, se observó la presencia de 4 compuestos fluorescentes y tres en los cultivos de callos y células en suspensión. Posteriormente, empleando el α -tertiofeno (α -T) como estándar en CCF se observó que una de las bandas fluorescentes de los cultivos *in vitro* con Rf 0.97, comigró con α -T. Para identificar las otras dos bandas fluorescentes de las células cultivadas *in vitro*, todos los extractos de las células cultivadas se juntaron y se purificaron por cromatografía en columna (CC) y CCF preparativa, de la mezcla se obtuvieron tres bandas fluorescentes, a las que se les determinó el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN). En la figura (10) se observa el espectro de RMN del α -T, y la de los compuestos del extracto de flor y de células cultivadas *in vitro* que fueron purificados por CC y CCF preparativa, y que fluorescieron en luz UV absorbieron en el rango que lo hacen los tiofenos, y espectro de la muestra que tuvo el rf

0.97 , es similar al del α -T, mientras que los que tuvieron el rf de 0.7 y el 0.51 se consideraron como butinibitiofeno (BBT), y acetoxibutinilbitiofeno (BBT-Ac). En la figura 11 se corrobora por CLAR la presencia de α -T en los cultivos de callos . En base a estos resultados se discutirán la producción de estos compuestos en los cultivos *in vitro*, pero la producción se reporta como tiofenos totales, cuantificados con base en el α -t como estándar.

Los resultados de la tabla VI, muestran que al inducir células en suspensión directamente a partir de explantes de cualquiera de los órganos, se obtiene mayor cantidad de biomasa en relación a la inducción de callos. La cantidad de biomasa varió según el órgano y sistema empleado. El órgano que presentó mayor crecimiento en el medio líquido fué el cotiledón, con un IC de 54.7, mientras que en sistema semisólido fué la hoja con un IC de 25.08. Resultados similares se observaron con la producción, que fué mayor en los cultivos de células en suspensión (Tabla VII). La mayor producción se obtuvo del cotiledon , tanto en cultivo de células en suspensión como el de callos, por otra parte, no se detectó producción en los cultivos en suspensión originados a partir de hoja, ni en callos obtenidos de tallo. Los tiofenos que se detectaron en la mayoría de los casos fueron el α -T y BBT, tanto en callos como en suspensiones. El que predominó en las raíces y cotiledones fué el α -T, mientras que en otros órganos y medio líquidos libres de células fué el BBT.

6.4. EFECTO DE LA LUZ Y OSCURIDAD SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TIOFENOS EN CALLOS:

En este experimento se emplearon callos que habían sido propagados tanto en luz como en oscuridad durante 9 resiembras de

15 días cada una. En ambos casos, se inició con un 1 g de callo fresco, y se determinó su crecimiento y producción de tiofenos cada tercer día. Para los estudios en luz, los callos se expusieron a 8400 lux.

Los resultados representados gráficamente en la figura 12, muestran una fase de adaptación de 3 días en la luz, mientras que en la obscuridad no se aprecia este período. La duración de la fase exponencial también varió, fué desde los 3 hasta los 21 días en luz y de los 1-2 a los 27 en la obscuridad. Con los datos obtenidos en luz, se obtuvo una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.0989 d^{-1} y un tiempo de duplicación (td) de 7 días (d), mientras que en obscuridad la μ fué 0.0501 d^{-1} y el td fué 13.83 d.

En la producción de tiofenos, se observó que la biosíntesis varió en luz y obscuridad (figura 12). En luz, los tiofenos se presentaron en todo el ciclo de crecimiento, y se observó una caída de la producción a los 12 días que estaba dentro de la fase exponencial y en la fase lineal prácticamente se mantuvo constante y se incrementó nuevamente al inicio de la fase estacionaria. Durante la fase estacionaria se obtuvo la máxima producción (1.58 μg de tiofeno/g de PS de callo). El tiofeno de mayor concentración en la fase estacionaria fué α -T, mientras que en las otras fases probablemente fué el BBT. En la obscuridad, la producción solo se detectó tres veces durante toda la cinética., y fué en la fase lineal de la sigmoide de la curva diáuxica, en donde se obtuvo una producción máxima de 0.25 μg de tiofeno/g de PS de callo.

6.5. COMPARACION ENTRE CULTIVOS EN SUSPENSION ESTABLECIDOS A PARTIR DE CALLO Y DIRECTAMENTE DE EXPLANTE.

Los cultivos de células en suspensión fueron establecidos por dos vías: a partir de tejido calloso y directamente de explante. Los cultivos en suspensión a partir de callo, se establecieron a los 6 días, y se caracterizaron por formar suspensiones con agregados celulares muy pequeñas (finas) , mientras que los obtenidos a partir de explante, empezaron a formarse a los 10 días y a los 25 ya se tenían los cultivos. En este último caso se observó que el explante no se disgregaba totalmente, y al parecer, las suspensiones se formaron de las células periféricas de este y luego se multiplicaban. Las células en suspensión así obtenidos, se caracterizaron por formar suspensiones celulares mixtas, muy similares morfológicamente a los obtenidos con el tejido calloso y otras que formaron agregados celulares de aproximadamente 0.5 mm a 7 mm de diámetro. Tanto los agregados celulares como los que no formaron dichos agregados, se separaron por sedimentación, una vez separados, se clasificaron para su mejor manejo. Las células en suspensión obtenidos a partir de callos se clasificó como tipo aC, donde la letra "a" minúscula indica el tipo y la letra C mayúscula indica que fué originado a partir de callo, mientras que a las suspensiones obtenidas directamente de explantes muy similares a los cultivos en suspensión originados de callos, se les clasificó como el mismo tipo aE, poniéndole la letra E para indicar que fué originado de explante y a los agregados celulares se les clasificó como tipo bE (Figura 14).

En la figura 14, se muestra la fotografía de ambos tipos celulares, donde visualmente los tipos aC y aE pertenecen al mismo

tipo celular.

Adicionalmente, debido a que se obtuvieron primero los cultivos de células en suspensión a partir de callo, se determinó el tamaño del inóculo adecuado, que se utilizó para el mantenimiento, subcultivo y cinética de crecimiento de ambos tipos celulares. Donde se varió la concentración celular desde 0.5 hasta 3 g de PS de células en suspensión/l, y se cuantificó el crecimiento e IC. En la figura 13 se observa que el rango de crecimiento que alcanzaron los diferentes inoculos fué de 4.5-6.3 g/l. Al aplicar un análisis estadístico de "t" de Students se obtuvo que la producción de biomasa en base al PS, no varió significativamente en un nivel de 0.5. Por otro lado conforme se incrementó el tamaño de inóculo el IC disminuyó. El IC máximo fué de 8.79 en el inóculo 0.53 g de PS/l. De estos resultados, se eligió 0.75 g de PS/l, con un IC de 7.13 para llevar a cabo las cinéticas de crecimiento de las células en suspensión.

6.6. EFECTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO (MS, SH Y B₅) SOBRE EL CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Fegetes erecta* Y PRODUCCION DE TIOFENOS POR LOS TIPOS CELULARES aC, aE Y bE

En la figura (15a) se presentaron las cinéticas de crecimiento de las células en suspensión tipo aC, llevado a cabo en los medios MS, SH y B₅. Las células crecidas en el medio MS, presentan una curva de crecimiento diáuxico, en donde este tipo de crecimiento fué repetitivo en tres diferentes cinéticas de este tipo celular. En la primera fase de crecimiento diáxico, se presentó una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.18 d^{-1} y un td de 3.8 d, en la segunda fase la μ fué de 0.05 d^{-1} y el td de 13.37 d. Las células crecidas en el medio SH y B₅, presentaron una curva de de crecimiento típica, con una fase lag de tres a seis

días en ambos casos, la fase de crecimiento exponencial fué diferente, lo cual hace que los cultivos crecidos en el medio SH entren a la fase estacionaria a lo 15 días, mientras que los crecidos en B5 lo hacen hasta los 18 días. Para los cultivos en SH la μ fué de 0.15 d^{-1} con un t_d de 4.4 d, y para los crecidos en B5 la μ fué de 0.205 d^{-1} y t_d de 3.3 d. El crecimiento máximo que presentó este tipo celular es de 5.93 g de PS/l .

Por otro lado las cinéticas de crecimiento de las células en suspensión tipo aE, originados directamente de explante , y que son muy similares en morfología a las células en suspensión originados de callo se muestra en la figura (15b). Estas cinéticas se caracterizaron por ser muy similares en todos los medios de cultivo, con fase lag de aproximadamente nueve días y una fase de crecimiento que culminó a los 18 días. En estas células, la variación que se obtuvo fué principalmente en el crecimiento máximo, que para el caso de las células crecidos en el medio MS fué de 5.25 g de PS/l, en SH de 6.6g de PS/l y para el B5 de 5.9g de PS/l La μ en MS fué de 0.13 d^{-1} , y un t_d de 5.29 d, para SH de 0.208 d^{-1} y el t_d de 3.32 d, y para B5 de 0.175 d^{-1} y t_d de 3.94 d.

En la figura (15c), se presentan las cinéticas de crecimiento de las células tipo bE, que formaron agregados celulares de 0.5 mm hasta 7 mm de diámetro. En esta figura se puede observar que la fase lag de este tipo celular duró de 3-6 días en todos los medios de cultivo, pero alcanzaron la fase estacionaria a diferentes tiempos, los crecidos en B5 lo hicieron a los 15 días, mientras los de MS y SH lo hicieron a los 18 días. El crecimiento máximo varió en todos los casos. En el medio MS fué de 8.73g de PS/l, en SH fué de 9.24 g de PS/l y en B5 de 7.6 g de PS/l. En MS se obtuvo una μ

de 0.1783 d^{-1} y un td de 3.88 d, para SH la μ fué de 0.155 d^{-1} y el td de 4.4 d, mientras que para B5 se obtuvo una μ de 0.242 d^{-1} y un td de 2.85 d.

Respecto a la producción de tiofenos, en la figura 11, se muestran los cromatogramas del α -tertiofeno (σ), que se utilizó como estándar y la de dos muestras de cultivo de callos utilizados (a) α -tertiofeno, b) a los 12 días y c) a los 27 días de la cinética de crecimiento). Se puede observar que el tiempo de retención del extracto de células de 27 días, es muy similar al estándar α -tertiofeno, con base a lo anterior y debido a que también se presentaron los mismos tiempo de retención en los extractos de los cultivos de células en suspensión a analizarlos por CLAR, se corroboró que suspensiones celulares producen α -T, adicionalmente, las técnicas de RMN y CCF indican la producción de por lo menos tres tipos diferentes de tiofenos tanto en callos como en suspensiones celulares, por lo que, todos los picos que salieron antes de este pico se consideraron como otro tipo de tiofenos, y debido a estos datos, la producción se reporta como tiofenos totales, relativos al α -T.

En la figura 15a se presenta la producción intracelular de tiofenos retenidos en las células en suspensión del tipo aC, en los diferentes medios de cultivo empleados. En el medio MS la producción se presentó en casi todo el ciclo del cultivo excepto en la fase lag., predominando la producción del α -tertiofeno en la fase estacionaria. La máxima producción que se presentó fué de $6.76 \mu\text{g}$ de tiofeno/g de PS de células en la fase exponencial de la primera curva de crecimiento, mientras que en la segunda fase de crecimiento la máxima producción fué de $3.85 \mu\text{g}$ de tiofeno/g de PS

de células. Por otro lado la producción de tiofenos en el medio SH, solo se detectó a los tres días y fué de 13.57 μg de tiofeno/g de PS de células, en tanto que en el medio B5 solo se detectó una sola vez durante toda la cinética y la concentración fué de 11.9 μg de tiofeno/ g de PS de célula.

En los cultivos en suspensión del tipo aE figura 15b, la producción solo se detectó una sola vez en las células crecidos en MS y SH, con 18.5 μg de tiofeno/g de PS y 7.3 μg de tiofeno/g de PS respectivamente.

Finalmente la producción de tiofenos en las células tipo bE, se presenta en la figura (15c), con concentraciones de 33.63 μg de tiofeno/g de PS a los 6 días para los cultivos crecidos en el medio MS, 22.09 μg de tiofeno/g de PS en el medio SH a los tres días y 2.28 $\mu\text{g/g}$ de PS en el medio B5.

Los tiofenos que fueron secretados al medio de cultivo por el tipo celular aC se presentan en la figura 16a. En el medio MS la concentración máxima de tiofenos fué de 0.547 $\mu\text{g/l}$ de medio de cultivo, mientras que en medio SH se detectó tres veces durante la cinética, y la máxima concentración que se obtuvo fué 2.076 μg de tiofeno/l de medio de cultivo a los 6 días. En tanto que en el medio B5, la producción fué 0.36 $\mu\text{g/l}$.

En los cultivos en suspensión del tipo aE figura 16b, la secreción de tiofenos al medio de cultivo fué 0.15 $\mu\text{g/l}$ a los tres días en el medio MS, en tanto que en SH, fué de 0.15 $\mu\text{g/l}$ en el medio de cultivo a los 18 días, y en medio B5 este fué de 0.185 $\mu\text{g/l}$ a los 9 días.

Por otro lado, en las células tipo bE (figura 16c), los tiofenos presentes en el medio se detectaron a una concentración

de 0.25 $\mu\text{g}/\text{l}$ a los 15 días en los cultivos crecidos en el medio MS, en tanto que los crecidos en SH, la máxima concentración fué de 1.26 $\mu\text{g}/\text{l}$ de medio de cultivo a los 15 días, y en B5 no se detectaron.

En la tabla VIII, se resume el efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento y producción, donde se observa que el tipo celular aC creció más rápido en el medio B5, pero en el medio SH produce más tiofenos en relación al MS y B5, y en medio MS presentó un crecimiento diáuxico. Mientras que el tipo aE crece más rápido en SH, pero la mayor producción se presentó en el medio MS. En tanto el tipo bE crece más rápido en B5 y produce más tiofenos en MS. Un aspecto importante es que las células tipo bE, produce más tiofenos que los tipos a en MS y SH, mientras que en b5 la producción es baja. Adicionalmente, el crecimiento que alcanzaron tanto el tipo aC como el aE fué de 6 g de PS/l, mientras que el tipo bE fué de 10 g de PS/l.

7. DISCUSION

El procedimiento empleado para la desinfestación de las semillas de *Taquetes erecta*, permitió la obtención de plantulas asépticas necesarias para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, debido a la acción combinada de: a) el pretratamiento con alcohol absoluto, que elimina cierta cantidad de lípidos y ceras (Heinsteín y Emery 1988), b) la adición del detergente (Tween), que ayuda a humedecer y abrir los poros de la membrana superficial de las semillas, y permite el paso del agente desinfestante (Yeoman y McLeod 1979), y c) la exposición de las semillas, por un período lo suficientemente prolongado (10-12.5 min), para permitir la eliminación de microorganismos por la acción biocida del cloro libre presente en el agente desinfestante (HClO) (Wildgoose 1972; Mennie 1971).

Durante la iniciación de los cultivos *in vitro*, se observó en la inducción de callos, que conforme se incrementó la concentración de BAP el crecimiento aumentó, mientras que al incrementar la concentración de 2,4-D esta disminuyó (Fig. 8a). Este efecto de la citocinina BAP en el crecimiento, concuerda con el hecho de que las citocininas funcionan como promotores de la división celular, y aunque no se sabe el mecanismo de acción, se especula que puede ser a nivel traduccional, que actúan vía síntesis de proteínas en G2 del ciclo celular o en la transición de G2 a mitosis (Everett y col 1978; Wang y col 1981). Por otro lado, aunque se sabe que en general que las auxinas influyen en el crecimiento ó elongación, no se sabe en que parte del ciclo celular actúa el 2,4-D, aunque Everett y col (1981) sugieren que la estimulación de la división celular por 2,4-D puede ser indirecta

y no debido a la activación de un punto de control del ciclo celular.

Adicionalmente se ha observado que el 2,4-D forma complejos con histonas ricos en lisina en etapas tempranas de la inducción de callo (Yasuda y Yamada 1970), y se ha documentado que una característica muy importante del efecto del 2,4-D, es la inhibición de la diferenciación morfológica (Mantell y Smith 1983), este punto de vista se corrobora en estos estudios, ya que en todos los medios que contenían 2,4-D no se observó diferenciación morfológica, en este caso, el máximo crecimiento que se obtuvo fué en la concentración de 33.3 μM de BAP y 2.26 μM de 2,4-D (Fig.8a). En tanto que en presencia de ANA (Fig. 8b), se observó que en las concentraciones donde se combinó con BAP, se obtuvieron callos con diferenciación morfológica en forma de raíces, en este caso, el mayor crecimiento se observó en la concentración de 2.68 μM de ANA y 22.2 μM de BAP, concentración similar reportado previamente y utilizado para los cultivos *in vitro* de especies de *Taquetes* por Ketel y col.(1986a), donde también reporta que obtiene diferenciación morfológica en forma de raíces en cultivo de callos y en forma de agregados celulares en cultivos de células en suspensión (Ketel y col 1986), similares resultados obtiene Kotari y Chandra (1986), que al trabajar con las combinaciones de ANA y AIA observaron diferenciación morfológica tanto en callos como en células en suspensión de *Taquetes erecta*. En otros sistemas de cultivo, también se ha ensayado la inducción de callos con ANA , 2,4-D y BAP con similares resultados, en este aspecto, Polanco y col (1988), obtienen callos en todos los explante de *Lens culinaris* con 2,4-D,

pero sólo o en combinación con otra auxina y/o citocinina no induce morfogenesis, mientras con BAP induce dicho fenómeno, similares resultados se ha obtenido con *Capsicum annum* (Agrawal y col 1989), en tanto se obtienen mayor crecimiento con 2,4-D en en el cultivo de *Camellia sinensis* (Frisch y camper 1987), y King y Morehart (1987) observaron que el cultivo de callos de *Acer rubrum* es afectado por la presencia de los RC, en este caso, se confirma que el crecimiento "óptimo" depende de la relación auxinas/citocininas, así como de su concentración en el medio. En el presente trabajo se demostró que la concentración de 33.3 μM de BAP y 2.56 μM de 2,4-D en ausencia de ANA como la adecuada. Dicha concentración fué la que se utilizó en todos los experimentos.

En la influencia de un medio semisólido y un medio líquido en el crecimiento y producción, en la tabla (VI), se observa que hay diferencias significativas en el crecimiento y producción dependiendo del sistema de cultivo empleado, así como el origen del explante.

En el crecimiento (Tabla VI), este fué mayor en el medio líquido agitado que en el medio semisólido. La razón de estas diferencias en el crecimiento, puede ser debido a que en el medio semisólido se forman gradientes de nutrientes, intercambio gaseoso, polarización y durante la inducción del tejido calloso solo ciertas partes del explante está en contacto con la superficie del medio de cultivo, en contraste con el medio líquido agitado, donde todo el explante está en contacto con el medio de cultivo y se elimina el gradiente de nutrientes, la polarización y facilita el intercambio gaseoso (Yeoman y Macleod 1977), y como consecuencia de estas características en ambos sistemas de

cultivo, se observó mayor crecimiento en el medio líquido agitado. Adicionalmente, se observa que el origen del explante influye en el crecimiento como se representa en la Tabla IVa, donde la hoja es el que indujo callos con mayor índice de crecimiento, mientras que el mayor crecimiento en la inducción de células en suspensión directamente del explante se obtuvo con el órgano cotiledon, estos resultados coinciden con los obtenidos por Calva (1989), donde reporta que el origen del explante influye en la inducción de callos y el órgano cotiledon es el que induce callos con mayor biomasa en cultivos de *Capsicum annum*.

En la producción de tiofenos, los datos que indican la presencia de estos en nuestros cultivos, son los obtenidos con las técnicas de CCF, CLAR y RMN. En el caso de la CCF (Tabla III), al desarrollar un extracto de semillas de *Fageles erecta*, se obtuvieron cuatro bandas fluorescentes al revelarlas en luz UV, similares resultados fueron reportadas por Chan y col (1975,1979), mientras que en los cultivos de callos y de células en suspensión se detectaron tres bandas. Por otra parte, cuando se desarrolló el estándar α -tertiofeno junto con un extracto de células en suspensión en CCF, se observó que una de las bandas del extracto migró al mismo Rf que el α -tertiofeno (Figura 8). En forma similar, con los espectros de RMN, se observó que todas las bandas que se purificaron de los cultivos *in vitro*, absorbieron en la region de los tiofenos reportados por Bohlman y col (1973), y aunque en algunos casos se observó muy poca resolución (Figura 7), esto ultimo puede ser debido a la pequeña cantidad de tiofenos obtenidos de los cultivos *in vitro*.

En el presente estudio, la producción de tiofenos varió

dependiendo del origen del explante, tanto en el medio semisólido como en el medio líquido agitado, y como se observa en la tabla (VII) el cotiledon es el que más produjo, resultados que difieren a lo reportado por Tabata y col (1970) y Sasse y col (1982), que obtuvieron que el origen del explante no influyó en la producción de metabolitos secundarios.

Por otra parte, el tipo de tiofeno producido por cada explante también varió. En los cultivos derivados de raíz y cotiledon el tiofeno principal producido fué el α -tertiofeno, mientras que en el hipocotilo y la hoja fué el BBT. Este comportamiento es muy similar a lo observado *in vivo* con *T. patula* por Sutfeld (1982), donde el cotiledon y la raíz fueron los órganos que produjeron más α -tertiofeno, mientras que en hoja y tallo fué el BBT. El hecho de que la producción sea muy similar a lo observado *in vivo*, puede ser debido a la presencia ciertas células diferenciadas, que se mantuvieron en el medio de cultivo durante la inducción de callos y células en suspensión.

De acuerdo a Ketel (1986a) con las resiembras, la capacidad biosintética de los cultivos de callos de *T. erecta* disminuye, y considerando que en las células indiferenciadas no hay producción de metabolitos secundarios. En el presente estudio, las cinéticas de crecimiento y producción de callos de un año de edad (Fig. 12) que no muestran diferenciación morfológica, mostraron la producción de tiofenos.

Las diferencias que se presentaron por el efecto de la luz y oscuridad en el crecimiento y producción de tiofenos es debido indiscutiblemente a los parametros probados, ya que en ambos casos los callos fueron acondicionados a la luz y oscuridad por más de

cuatro meses (9 resiembras). La producción de tiofenos, fué mayor en los callos expuestos a la luz que en obscuridad, resultados que coinciden con los de Oropeza y col (1990), donde callos transformados de *J. erecta* var. criolla, que no forman raíces, acumularon tiofenos en presencia de luz. Sin embargo, difieren con los resultados obtenidos con la misma especie pero que forma raíces (Oropeza y col 1990), y con los obtenidos con *J. patula* por Croes y col (1988 y 1989a) y Adamase (1990), que observaron mayor producción en obscuridad. Aunque Oropeza y col (1990) postulan que estas diferencias pueden ser modulado por la diferencia en especie, grado de diferenciación y transformación, nuestros resultados obtenidos en la cinética de crecimiento y producción en callos (Fig. 12), la producción podría ser debido al tipo celular presente en el cultivo (ver más adelante), que posiblemente este en un estado de diferenciación más avanzada, que es influenciado por los medios de cultivo y concentración de RC. Por otra parte, en el presente estudio, los tiofenos principales producidos fueron el α -tertiofeno y posiblemente BBT, lo cual está en contraste con Adamase (1990), Croes y col 1988 y 1989a, cuyo cultivos acumularon BBT-Ac y BBT-OH.

En este contexto, la combinación de BAP y 2,4-D es capaz de inducir la biosíntesis de tiofenos, en tanto que con BAP y ANA la producción desaparece con el tiempo, como lo reporta Ketel 1987, mientras que Croes y col (1989b) obtuvieron un incremento de la producción a bajas concentraciones de AIA en cultivo de raíces transformadas, este comentario se debe al hecho de que el 2,4-D inhibe la producción de metabolitos secundarios en la mayoría de los sistemas *in vitro* (Mantell y Smith 1987) y como se muestra en

la figura 12, en estos estudios la inhibición no se presentó.

Por otro lado, se ha postulado una relación directa entre la producción de tiofenos y diferenciación morfológica (Croes y col 1988 y 1989a). La producción de tiofenos en el presente estudio, donde los cultivos se caracterizaron por no presentar diferenciación morfológica, no apoya esta hipótesis. Esta diferencia puede ser atribuida, a que en cultivo de órganos como las raíces, durante su desarrollo, algunas células adquieren cambios más profundos que otras (Esau 1972), que forman un complejo de diferentes tipos celulares algunos de los cuales pudiera especializarse para la producción de tiofenos, en tanto que en nuestros cultivos, pudieran sobrevivir algún tipo celular que se encuentra en un estado de diferenciación específica, que involucra la producción de tiofeno. Este punto de vista, es apoyado por lo observado por Ketel (1987), que reporta que con las resiembras de los cultivos de callos, la producción de tiofenos desaparece, en tanto que al inducir células en suspensión a partir de callos primarios, secundarios y terciarios, la producción de tiofenos se prolonga por más tiempo (Ketel 1988), estos resultados pudieran indicar la presencia de algún tipo celular, que produce tiofenos, pero que con el tiempo desaparece, debido posiblemente a que entra en un estado de diferenciación terminal o que los constituyentes del medio de cultivo, no permite que sobreviva. Además de que los tiofenos solo se producen, cuando las células forman grandes agregados en cultivos en suspensión, en estos agregados celulares, es donde pudieran existir células con capacidad proliferativa comprometidas hacia un camino de diferenciación específica y que no están terminalmente

diferenciados, dichas células se les conoce como "stem cell" o células troncales (Kuri-Harcuch y Castro 1986), lo cual se conoce como citodiferenciación (Yeoman 1987).

Con respecto a lo anterior, los resultados obtenidos con células en suspensión originados a partir de tejido caloso y directamente de explante, aportaron otros datos.

Debido a necesidad de determinar un tamaño del inóculo adecuado para el mantenimiento los cultivos de células en suspensión (Fig. 14), ya que este es un parámetro de extrema importancia, como lo reportan Krogstrup (1990) y Drapeau y col (1987), donde la densidad celular afectó la proliferación de células embriogénicas y producción de metabolitos secundarios respectivamente, en este aspecto, determinamos 0.75 g de PS/1 como el adecuados para el mantenimiento de los cultivos, resultados que coinciden con lo obtenido por Veliky y Martin (1970), que observaron que un inóculo de 0.5 a 1.0 g de PS/1 se obtienen buenos resultados de crecimiento.

En las suspensiones celulares originados a partir de callo se obtiene un solo tipo celular, el aC, mientras que en las obtenidas a partir de explante se observaron dos, el aE y bE (Figura 13A). En la figuras 15 se observa que los tipos aC y aE presentaron pequeñas diferencias en el perfil de crecimiento, pero morfológicamente eran iguales y en ambos casos, el máximo crecimiento fué de 6 g de PS/1 en la fase estacionaria por lo se podría concluir que pertenecen al mismo tipo celular. Comparando estas cinéticas con las del tipo bE (Figura 15b), se observa que son diferentes tanto morfológicamente como en el perfil de crecimiento, y el crecimiento máximo que alcanza este tipo celular

es de 9 g de PS/1 con respecto a los 6 g de PS/1 de los tipos "a".

Esta diferencia puede atribuirse a que, al inducir células en suspensión a partir de explante, los diferentes tipos celulares presentes en este, tienen más posibilidades de sobrevivir que en el callo, ya que se observó, que las originadas directamente del explante, se formaron de las células periféricas y el explante no se disgregó totalmente. Este hecho, puede argumentarse como una liberación celular del explante al medio líquido, que apoya a lo observado por Endo y col (1987), que obtuvo suspensiones celulares finas al inducir cultivo de raíces. Mientras que las inducidas de callo, este se disgregó totalmente. Adicionalmente, Yeoman y Forche (1980) postulan que que una vez establecido el callo y sometido a manipulación y subcultivo, puede efectivamente seleccionar ciertos tipos celulares y eliminar otros. Por lo tanto, al inducir células en suspensión a partir de callos de *J erecta*, las células tipo bE, que no se presentan en el cultivo de células en suspensión inducidos a partir de callo, probablemente existieron inicialmente, pero no sobrevivieron. Esta última suposición implica, que desde el inicio del cultivo, el sistema semisólido ejerce una presión de selección, donde solo sobreviven ciertos tipos celulares.

Con base a lo anterior, estos resultados no apoyan a la hipótesis de que las células se desdiferencian durante la inducción de callos, como lo mencionan diversos autores (Constabel y col 1974; Seabrook 1980; Aitchison y col 1977; Yeoman y Mcleod 1977), más bien apoyan a lo que se entiende por modulación, que en este caso, es el efecto que ejerce el medio de cultivo sobre la expresión de funciones especializadas, que al obtenerse de un

organismo un tejido diferenciado y disociarlo para cultivar *in vitro*, las células que lo constituyen pierden con rapidez algunas de las características bioquímicas y/o morfológicas que poseían *in vivo*, pero la población mantenida *in vitro* no está menos diferenciadas que cuando se encuentra en el organismo vivo, sino que expresan aquellas funciones que son necesarias para la sobrevivencia celular y cuando las células se mantienen en condiciones adecuadas vuelven a manifiesta el fenotipo (Kuri-Harcuch y Castro 1986), esto es lo que podría ocurrir durante la inducción de callos, y adicionalmente solo ciertos tipos celulares pueden sobrevivir como se muestra en nuestros resultados (Fig. 13A y 13B). En este caso preferentemente se cultivaron células meristemáticas y parenquimáticas, ya que se ha reportado, que el tejido calloso se forma a partir de cambium, cortex y floema (tejidos compuestos por meristemas y/o parenquima) (Frisch y Camper 1987), que serían las que sobrevivirían en los cultivos, debido a que este tipo de células se encuentran en toda la planta y se reconocen como células totipotenciales (Esau 1972).

Por otro lado, la producción de tiofenos por los tres tipos celulares, se observa en la figura (15 Y 16). Los tipos aC, después de más de un año de resiembras siguieron produciendo tiofenos, estos resultados está en contraste con lo obtenido por Groneman en (1984) y Ketel y col (1987) con células en suspensión de *Fagetes minuta*, quienes observaron, que con las resiembras, la producción de tiofenos desaparece. Los tipos de tiofenos producidos por nuestros cultivos es el α -T y BBT, y se observó que el tipo bE produce más tiofenos que los tipos a, este resultado es similar al obtenido por Hulst y col (1989), quienes encontraron que a mayor

tamaño del agregado celular mayor producción, observándose como tamaño "optimo" el comprendido entre 11 a 13 mm. En ese caso los agregados solo producen el BBT-OH, mientras que en el presente estudio los tipos "a" produjeron más α -T que los tipos "b". Por otra parte, también se ha observado que el BBT-OH es tiofeno secretado (Ketel 1988; Adamase 1990), en contraste con nuestros cultivos, los cuales secretan α -T.

El efecto de los diferentes medios de cultivo en el crecimiento y producción se observa en la tabla IX, evidentemente las características cinéticas del tipo aC, aE y bE son diferentes, en este caso, debido a que el tipo aC y aE son morfológicamente idénticos y el máximo crecimiento que alcanzaron fué de 6 g/l, se esperaba que los parámetros cinéticos fueran iguales. Esta similitud no se presentó debido a que ambos fueron establecidos de forma diferente, donde los inducidos a partir de callo pudieran expresar ciertas características metabólicas, como respuesta específicas al medio semisólido en relación a los inducidos a partir del explante.

En la producción de tiofenos, aparentemente los medios de cultivo no influyeron fuertemente en la producción, como se ha observado con el incremento de la producción de tiofenos, al adicionar potenciadores al medio de cultivo en células transformadas de *Tagetes patula* (Mukunda y Hjorso 1990 a y b), y en otros sistemas, donde al cultivar las células de *Lithospermum erythrorhizon* en el medio White, se incrementó la producción, y esto fué debido a que este medio no contiene amonio en relación a los otros medios (Fujita y Tabata 1987).

En este contexto, la obtención de dos tipos celulares, por

medio de la inducción de células en suspensión directamente del explante, se presenta como una alternativa interesante en trabajos futuros con cultivos de células vegetales, ya que se tendrían células en un estado de diferenciación específica para la producción de metabolitos secundarios. En base a ello, el procedimiento propuesto por (Deus y Zenk 1982) para el establecimiento de células altamente productoras, se podría modificar de la siguiente manera: 1) selección de plantas altamente productoras, 2) establecimiento de células en suspensión directamente del explante, 3) selección de diferentes tipos celulares, 4) selección clonal repetida y establecimiento de células altamente productoras y 5) desarrollo de medio de producción.

Con base a lo anterior, el establecimiento de tipos celulares presentaría ventajas sobre el cultivo de órganos, donde se ha observado la producción de diferentes metabolitos secundarios, como la vinblastina en cultivos de callos con raíces de *Eatharantus roseus* (Miura y col 1987), alcaloides indólicos en cultivo de tallos de *E. roseus* (Hirata y col 1987), en este caso, los tipos celulares, presentarían la ventaja de poderlos llevar a un biorreactor.

8. CONCLUSIONES

1).-Para la obtención de plantulas asépticas para el inicio de los cultivos *in vitro*, el tiempo de exposición adecuado de las semillas al agente desinfectante hipoclorito de sodio, es 10 a 12.5 minutos.

2).-La concentración de los reguladores de crecimiento adecuado, para la obtención y crecimiento de callos, es 33.3 μM de BAP y 2.26 μM de 2,4-D en el medio MS suplementado con 20 g/l de sacarosa. Los callos así obtenidos tuvieron un índice de crecimiento (IC) de 4.41 y no presentan diferenciación morfológica.

3.-Respecto a la inducción de callos y células en suspensión directamente del explante, estas últimas presentaron un mayor crecimiento y producción de tiofenos. El órgano que presentó mayor (IC), fué el cotiledón con 54.7 en cultivos en suspensión, mientras que en el cultivo de callos fué la hoja con un IC de 25.08. La mayor producción en ambos casos fué observada en los cultivos derivados del cotiledon, con 4.81 μg de tiofenos/g de PS de suspensión y 4.3 μg de tiofenos/g de PS en callos.

4).-Los callos cultivados en luz, Produjeron un máximo de 1.58 μg de tiofeno/g de PS y presentaron un tiempo de duplicación de 7.0 días, mientras que en los cultivados en obscuridad, fué de 0.23 μg de tiofenos/g de PS y el tiempo de duplicación de 13.83 días. Por otro lado, la producción de tiofenos fué continua en los cultivos crecidos en luz, , pero no en los crecidos en obscuridad.

5).-Durante la inducción de células en suspensión, a partir de callo se obtuvo un tipo celular aC, mientras que al inducir suspensiones a partir de explante se obtuvieron dos tipos

celulares aE y bE.

6).-El tamaño de inóculo adecuado para el crecimiento de las células en suspensión fué de 0.75 g de PS/1.

7).-De las cinéticas de crecimiento de los tipos celulares, aparentemente los tipo aC y aE son el mismo. Además morfológicamente son muy similares y el máximo crecimiento que alcanzaron fué de 6g de PS/1, pero fueron diferentes del tipo bE, que alcanzó un crecimiento máximo de 9 g de PS/1

8).-El tipo celular bE, produjo mayor cantidad de tiofeno que los tipos aC y aE.

9. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS POSTERIORES.

1.-Aislar y caracterizar los diferentes tipos celulares, mediante la inducción de células en suspensión directamente de explantes de diferentes edades.

2.- Utilizar diferentes medios de cultivo para el aislamiento de diferentes tipos celulares, siguiendo el método modificado de Deus y Zenk (1982) propuesto en este trabajo.

3.-Debido a alta productividad que se ha observado con cultivo de órganos y la estabilidad genética en la transformación celular, comparar la producción de tiofenos en cultivo de raíces "normales" y raíces transformadas con respecto a la producción de los diferentes tipos celulares que se obtengan.

4.-Para la cuantificación de tiofenos, se sugiere la compra de los estandares certificados, con el propósito de tener la certeza, de además del α -tertiofeno, cuales tiofenos se estan produciendo en los cultivos.

5.-Continuar el estudio del presente trabajo a nivel de biorreactor, asi como el de las raíces "normales" y transformadas que se obtengan.

10. TABLAS

Tabla I.-Terpenos aislados de hojas y flores de *Tagetea erecta*.

COMPUESTOS	CONTENIDO (% PF)
α -cadineno	17.9
γ -cadineno	14.1
Limoneno	9.2
Cis-cariofileno	8.2
γ -elmeno	4.7
β -elmeno	4.6
α -munroleno	3.5
α -cubebeno	2.8
Isopolegol	2.3
β -cubebeno	2.2
2-dodecenal	2.1
Ac. tetradecanoico	1.7
α -Selineno	1.6
α -patchuleno	1.3
Pulegol	1.0
Linalool	0.9
Copaeno	0.9
α -pineno	0.8
α -gualeno	0.8
Aloaromadendreno	0.5
Elemol	0.4
Mentona	0.2

Adaptado de Wang-Yan y col 1988.

Tabla II.- Efecto biocida de los tiofenos en diferentes organismos.

EFEECTO EN:	REFERENCIA
VIRUS	
<i>Sindbis</i>	
<i>Citomegalvirus</i>	Hudson y col (1986)
BACTERIAS	
<i>E. coli</i>	
<i>Pseudomona aeroginosa</i>	Arnoson y col (1981)
HONGOS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Candida albicans</i>	Chan y col (1979)
<i>Fusarium oxyporum</i>	Kourany y co (1988)
NEMATODOS	
<i>Dytylechus dipsaci</i>	
<i>Pratylenchus penetrans</i>	
<i>Meloignyne hapla</i>	
<i>M. incognita</i>	
<i>M. arenaria</i>	Bakker y col (1979)
INSECTOS	
<i>Manduca sexta</i>	
<i>Euxoa messoria</i>	Downum y col (1984)
<i>Ostrinia nubilalis</i>	
<i>Aedes instrudens</i>	Champagne y col (1986)
<i>Chaoburus sp</i>	
<i>Lestes sp</i>	Philogéne y col (1986)
<i>Aedes aegypti</i>	
<i>A. atropalpus</i>	Arnoson y col (1986)
PLANTAS	
<i>Ascleptos syriaca</i>	
<i>Trifolium pratense</i>	
<i>Chenopodium album</i>	
<i>Phlelium pratense</i>	Campbell y col (1982)
TEJIDOS	
ERITROCITOS HUMANOS	
FIBROBLASTOS DE LA PIEL HUMANA	Wat y col (1980)

Tabla III.- Análisis de varianza (ANOVA), del efecto del BAP y 2,4-D sobre la inducción de tejido calloso, en presencia y ausencia de ANA.

Fuente de variación	G.L	S.C	C M	F _c	F _t 0.01
ANA	1	0.306	0.306	6.403	6.63
2,4-D	3	0.867	0.289	6.058	4.61
BAP	3	2.007	0.669	14.015	4.61
ANA*2,4-D	3	3.092	1.031	21.594	4.61
ANA*BAP	3	0.493	0.164	3.440	4.61
2,4-D*BAP	9	2.237	0.249	5.21	2.41
TRIPLE INTERACCION	9	2.042	0.227	3.451	2.41
ERROR	185	8.829	0.048		

Tabla IV.- ANOVA, del efecto de BAP y 2,4-D sobre reinducción del tejido calloso.

Fuente de variación	G.L	S.C	C M	F _c	F _t 0.05
Tratamiento	8	--	--	--	
Efecto de BAP	2	0.003	0.000170	0.503	3.55
Efecto de 2,4-D	2	0.000	0.002	5.89	3.55
Intera- cción	4	0.001	0.000242	0.714	2.90
Error	18	0.005	0.000339	--	

Tabla V.-Rf^a de los compuestos presentes en flor, callos y células en suspensión de *Taquetes erecta*, identificados como tiofenos.

	Flor	Células en suspensión	callos
RF	0.97	0.97	0.97
	0.70	0.70	0.70
	0.51	0.51	0.51
	0.40	-	-

Se emplearon placas preparados con silica-gel80, y como fase móvil éter de petróleo:acetona:éter etílico (9:1:1 v/v).

Tabla VI.- Efecto del medio semisólido y líquido sobre el crecimiento celular, durante la inducción de callos y células en suspensión a partir de diferentes explantes.

EXPLANTE	CALLOS		CELULAS EN SUSPENSION	
	mg de PS/frasco	IC	mg de PS/matraz	IC
Cotiledón	58.35	13.6	234.7	54.7
Hoja	82.79	25.08	92.9	28.7
Tallo	48.16	8.14	91.9	15.5
Raíz	71.43	1.4	272.83	5.4

Para la inducción de tejido calloso, los explantes de los diferentes órganos se colocaron en frascos gerber con 25 ml de medio semisólido, y en matraces Erlenmeyer con 50 ml de medio líquido para la inducción de cultivos de células en suspensión. El inóculo utilizado fué peso seco: 4.29 mg de cotiledón; 3.3 mg de hoja; 5.91 mg de tallo y 51 mg de raíz. El medio utilizado fué el MS suplementado con 20 g/l de sacarosa, 2.26 μ M de 2,4-D y 33.3 μ M de BAP.

Tabla VII.- Producción de tiofenos por los cultivos *in vitro* de *Taqetes erecta*, obtenidos a partir de diferentes explantes.

Explante	CALLOS		CELULAS EN SUSPENSION.		TOTAL EN CS
	$\mu\text{g/g}$ de PS	$\mu\text{g/g}$ de PS	$\mu\text{g/g}$ de PS	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g/g}$ de PS
Cotiledón	4.3	0.83	18.7		4.813
Hoja	1.54	ND	ND		ND
Tallo	ND	1.65	4.5		4.098
Raíz	1.2	1.02	4.8		1.90

ND= no detectado, CS= células en suspensión

Tabla VIII.- Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y producción de tiofenos, por cultivos de células en suspensión de *T. erecta*, obtenidos a partir de callo (aC) y directamente de explante (aE y bE).

Medio de cultivo		MS			SH			B5		
Tipo celular	μ	td	TF	μ	td	TF	μ	td	TF	
aC	0.18	3.8	6.76	0.15	4.4	13.57	0.205	3.37	11.9	
	0.05	13.37	3.85							
aE	0.13	5.3	18.5	0.208	3.32	7.3	0.175	3.94	ND	
bE	0.178	3.8	33.63	0.15	4.4	22.09	0.243	2.85	2.28	

Donde MS= Murashige-Skoog (1962), SH= Shenk-Hidebrant(1972), B5= Gamborg y col (1968), μ = Velocidad específica de crecimiento (d^{-1}), td= Tiempo de duplicación (d) y TF= Producción de tiofenos $\mu\text{g/g}$ de PS.

11. FIGURAS

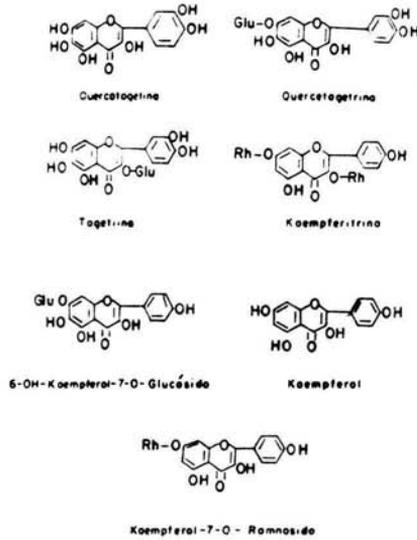


Figura 1. Flavonoides aislados de las hojas y flores de *Tagetes erecta*. (Adaptado de El-Emary y Ali 1983).

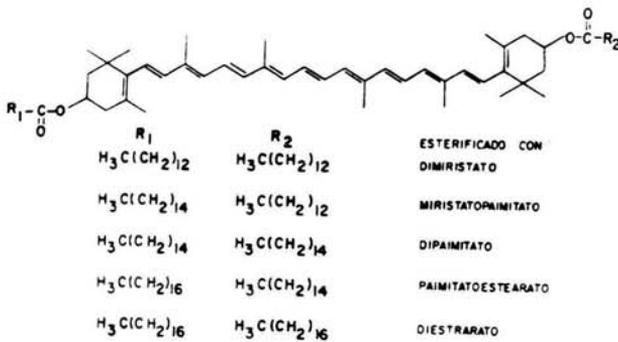


Figura 2. Estructura de las xantófilas aislados de la flor de *Tagetes erecta*. (Adaptado de Gau y col 1983).

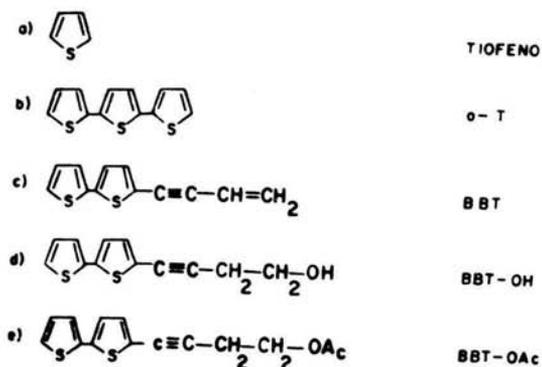


Figura 3. Estructura molecular del tiofeno, b,c,d,y,e) tiofenos aislados de plantas del genero *Fagetes*.

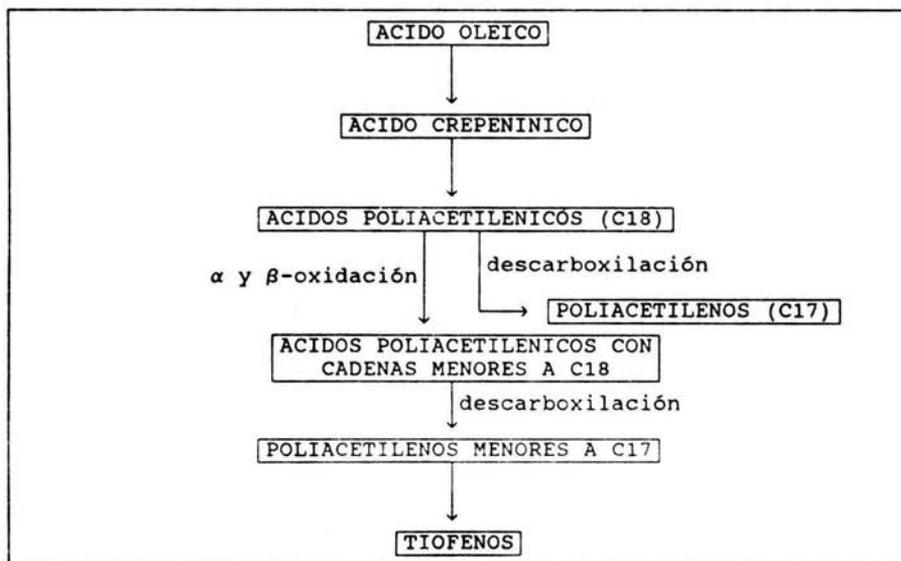


Figura 4. Vía metabólica de los poliacetilenos y tiofenos. (Adaptado de Vickery y Vikery 1981)

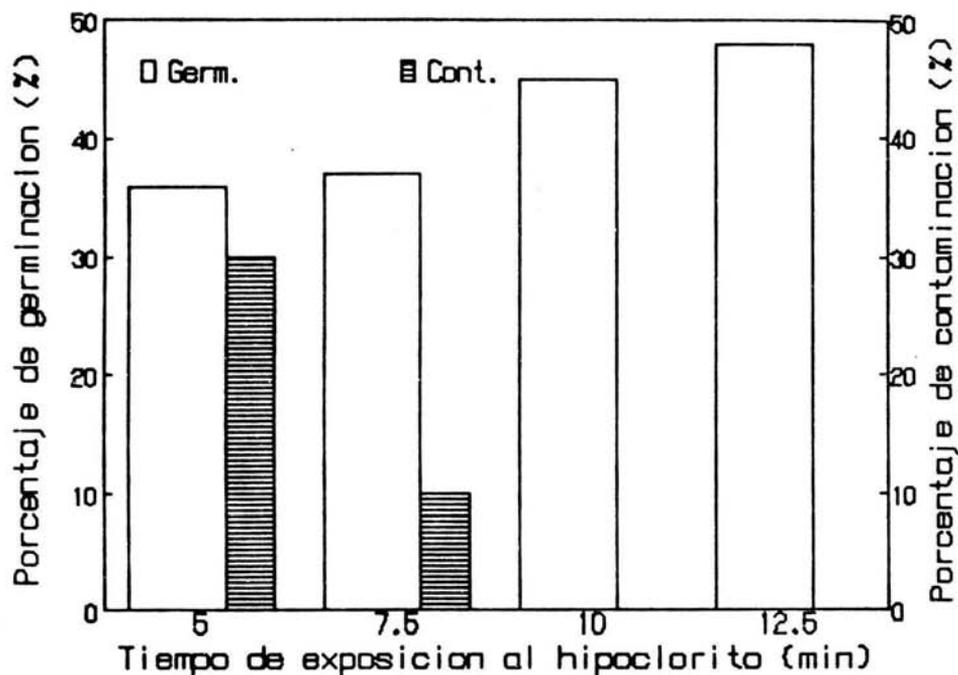


Figura 7. Efecto del tiempo de exposición a hipoclorito de sodio (5%) sobre la desinfestación de semillas de *Tagetes erecta*. Para cada tratamiento se usarón 10 semillas.

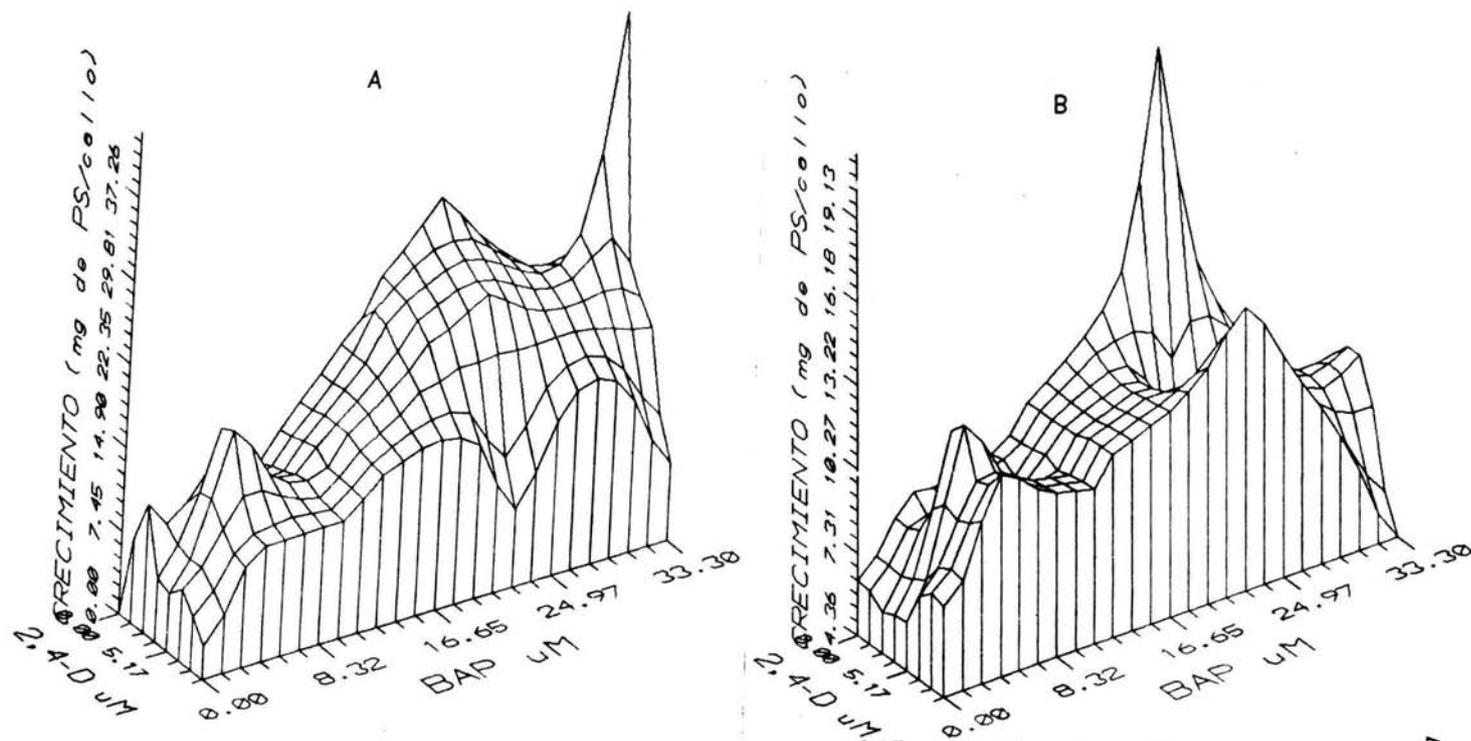


Figura 8. Efecto de la relación 2,4-D/BAP sobre la inducción de callos a partir de tallos en ausencia (A) y en presencia (B) de 2.68 μM de ANA. Se empleó el medio MS suplementado con 20 g/l de sacarosa y 1.5 g/l de gelrite. Cada tratamiento se realizó por triplicado en frascos gerber de 125 ml con 25 ml de medio de cultivo y 3 explantes, que se incubaron a 27 °C y 8400 lux. El crecimiento se evaluó después de 30 días de cultivo.

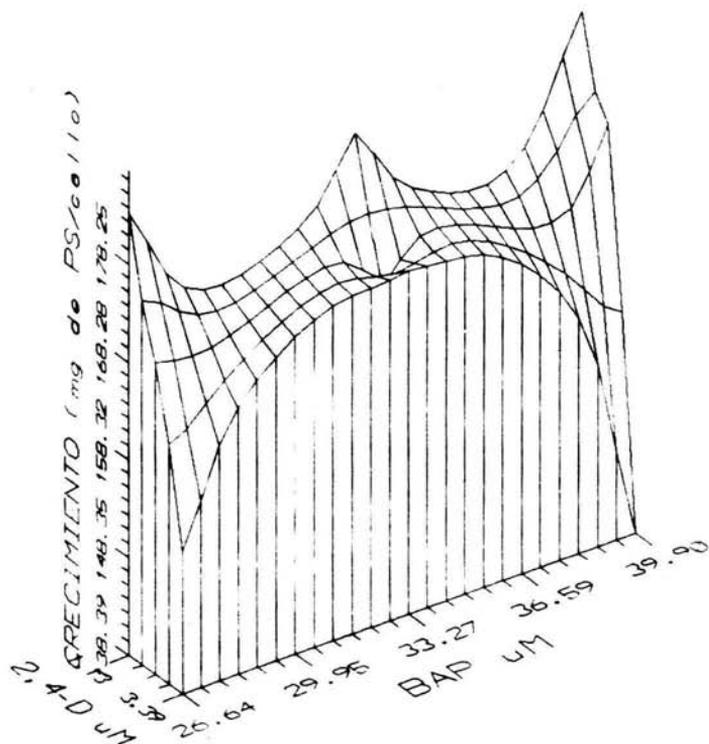
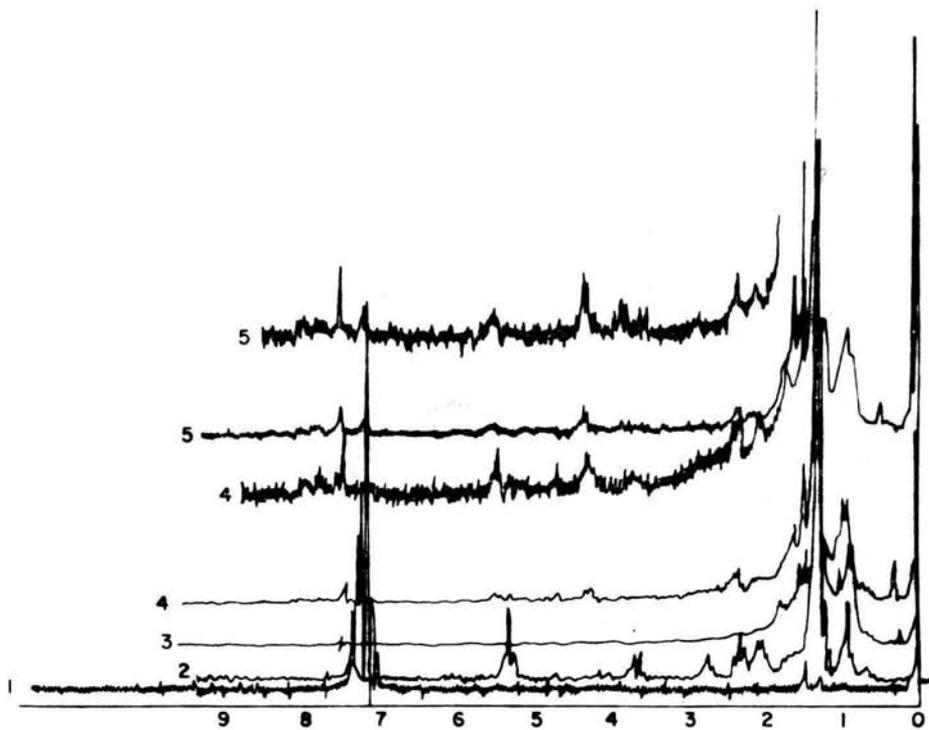


Figura 9. Efecto de 2,4-D y BAP sobre la reinducción del tejidos calloso a partir de células en suspensión de *Tagetes erecta*, se empleó el medio MS suplementado con 20 g/l de sacarosa.



ppm

Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de 1) α -tertiofeno, 2) extracto de flor con un rf de 0.7, 3) extracto de los cultivos *in vitro* con un rf de 0.97 (α -T), 4) rf de 0.7 y 5) rf de 0.51 purificados por cromatografía en columna.

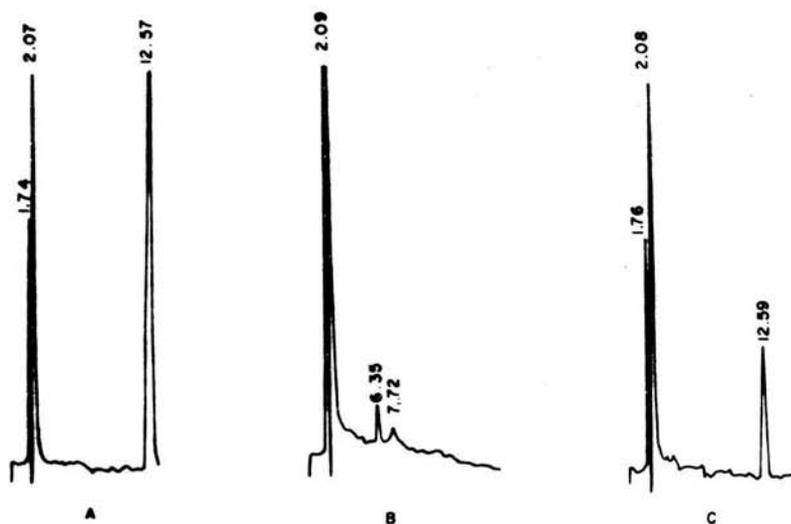


Figura 11. Cromatogramas de CLAR del estándar de α -tertiofeno (A) y compuestos producidos por los cultivos de callo de *Fagelia erecta*. B) 12 días y C) 27 días de cultivo. Los números representan el tiempo de retención de los compuestos detectados.

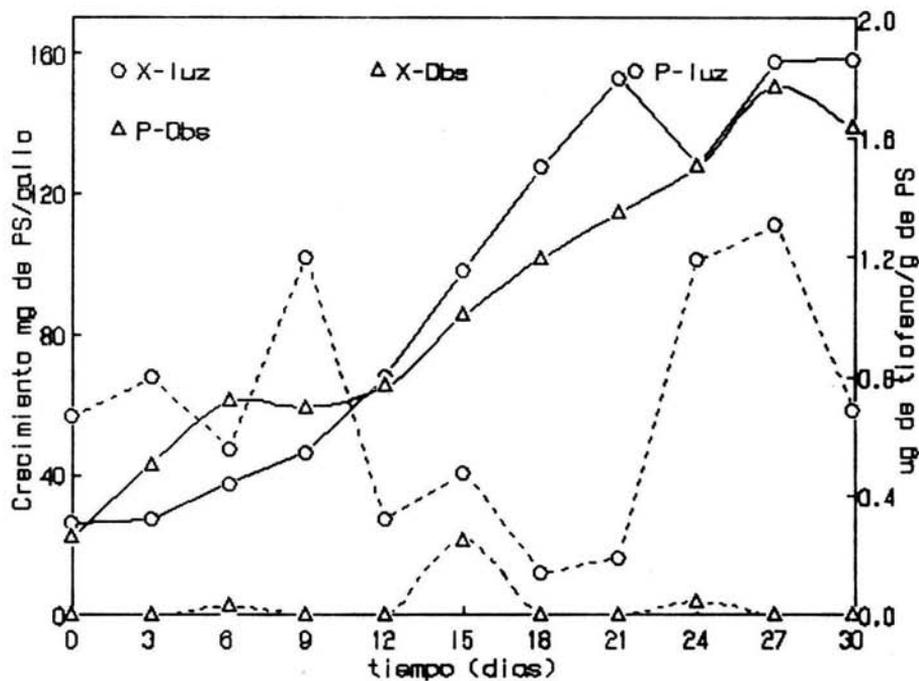


Figura 12. Efecto de luz (8400 lux) y obscuridad sobre el crecimiento del tejido calloso de *Tagetes erecta* y su producción de tiofenos. Se empleó el medio MS suplementado con 33.3 μM de BAP, 2.26 μM de 2,4-D y 20 g/l de sacarosa. X= crecimiento, P= producción.

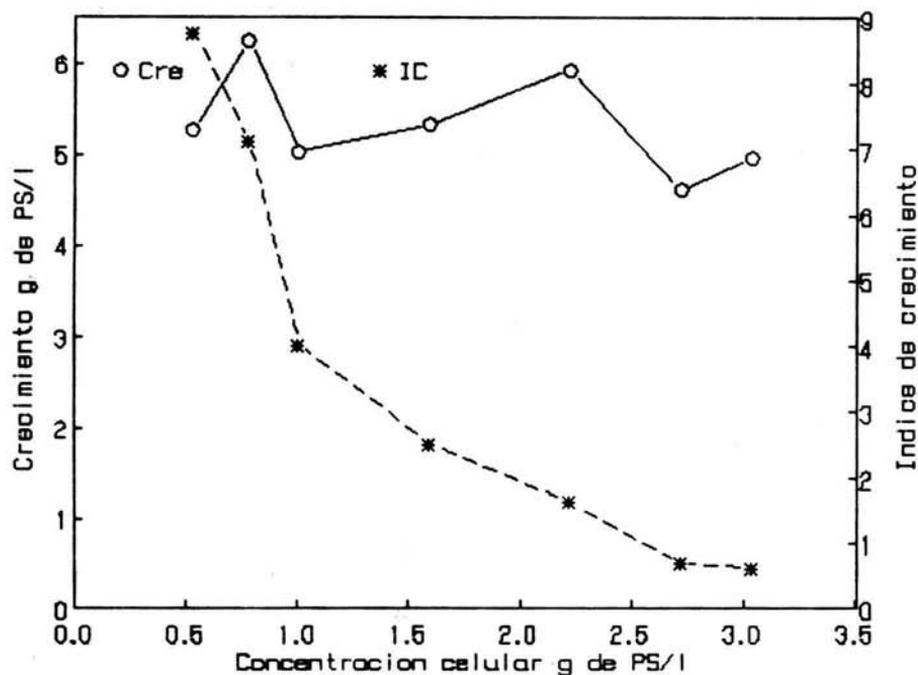


Figura 13. Efecto del tamaño del inoculo sobre el crecimiento de los cultivos de células en suspensión de *Tagetes erecta*. El experimento se realizó en matraces ErlenMeyer de 125 ml con 25 ml de medio MS, suplementado con 33.3 μ M de BAP, 2.26 μ M de 2,4-D y 20 g/l de sacarosa. El crecimiento se evaluó después de 14 días de cultivo.

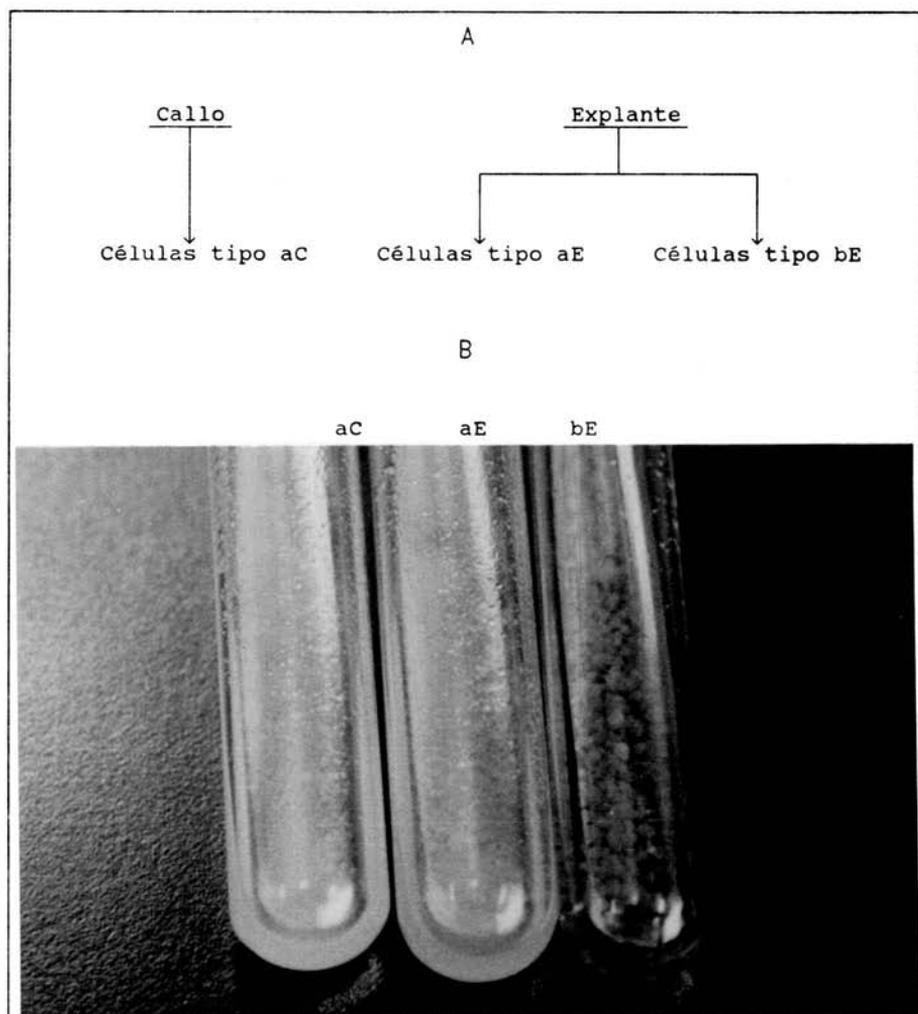


Figura 14. Esquema (A) y fotografía (B) de los tipos celulares obtenidos en cultivos de células en suspensión establecidos a partir de callo y directamente de explantes de *Taqetes erecta*. Se empleó el medio MS, suplementado con 2% de sacarosa, 33.3 μM de BAP y 2.26 μM de 2,4-D.

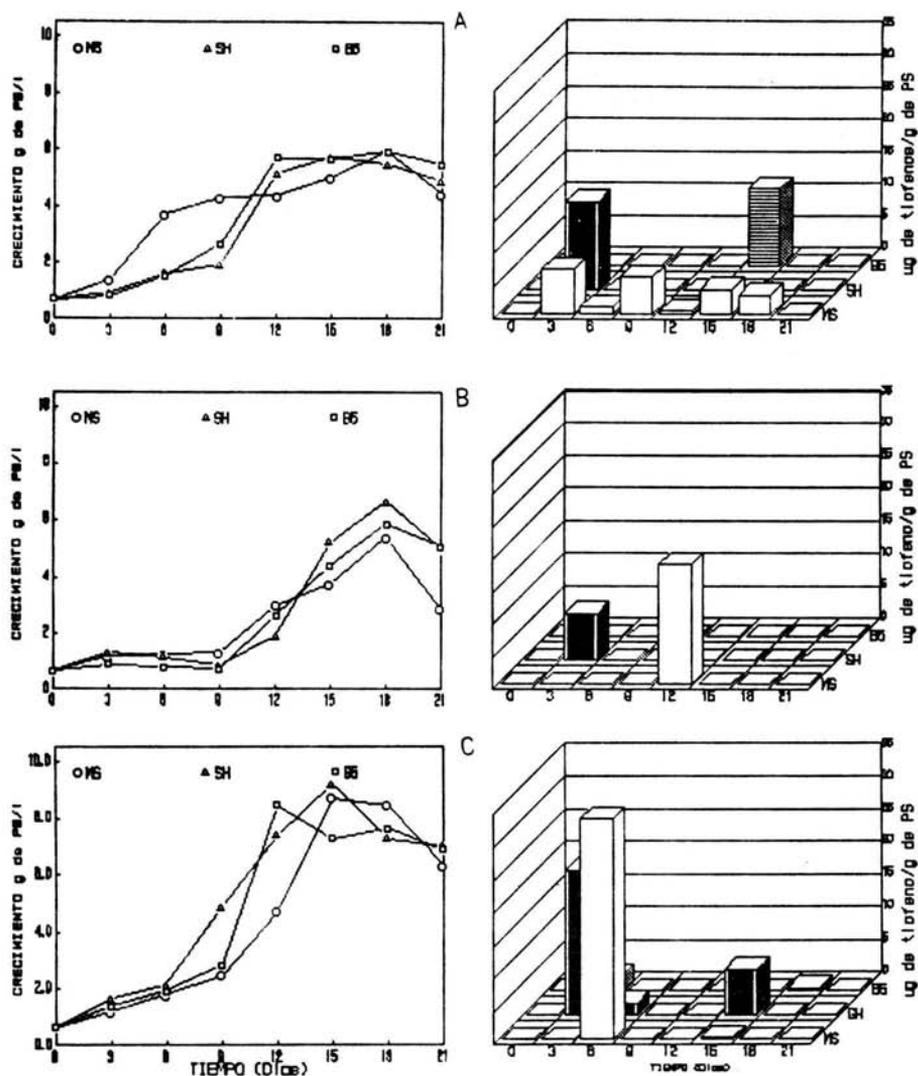


Figura 15. Efecto del origen del cultivo sobre el crecimiento y la producción intracelular de tiofenos en células en suspensión de *Taqetes erecta*, A) originados a partir de explante tipo aC, y originados a partir de explante B) tipo aE y C) tipo bE. Se emplearon los medios MS, SH y B5, suplementados con 33.3 μM de BAP, 2.26 μM de 2,4-D y 20 g/l de sacarosa.

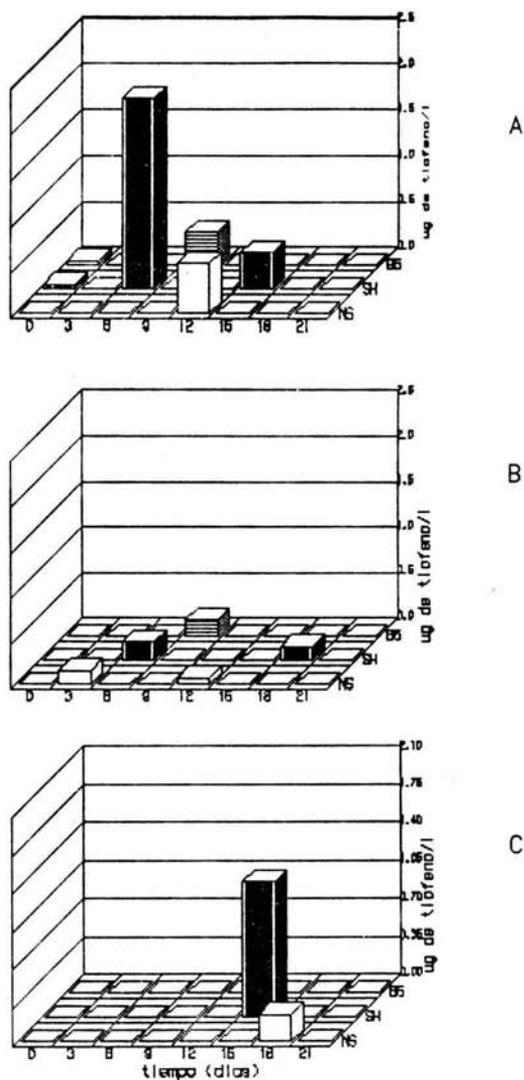


Figura 16. Efecto del tipo celular sobre el contenido de tiofenos en el medio de cultivo de células en suspensión de *Fragaria erecta*. A) tipo aC, B) tipo aE y C) tipo bE. Se emplearon los medios MS, SH y B₅, suplementados con 33.3 μ M de BAP, 2.26 μ M de 2,4-D y 20 g/l de sacarosa.

BIBLIOGRAFIA

Adamase P. (1990). Selection of high-yielding cell lines of *Tagetes* using flow cytometry. En: progress in plant cellular and molecular biology. Nijkamp HJJ, Van de Plas and Van Aartrijk (eds). Kluwer Academic Publishers. London England, Amsterdam. pp. 725-731.

Agrawal S; Chandra N. y Kothari SL. (1989). Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *mathania*). Plant Cell and Organ culture. 16: 47-55.

Aitchison PA; Macleod A. y Yeoman MM. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. En: Plant tissue culture and cell culture (Street HE ed). Botanical monographs, vol 11, Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburg, Melbourne. pp 267-306.

Arnoson T; Chan GFQ; Wat CK; Downum K. and Towers GHN. (1981). Oxygen requirement for near-UV mediated cytotoxicity of α -terthienyl to *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Photochem. Photobiol. 33: 821-824.

Arnoson JT; Philogéne BJR; Berry C; MacEarchern A; Kamiski J; Leith LC; Morand P. y Lam J. (1986). Phototoxicity of natural occurring and synthetic thiophenes and acetylene analogues to mosquito larvae. phytochemistry. 25: 1609-1611.

Arnoson JT; Philogéne BJR; Duval F; Berg CW; Iyengar S. y Morand P. (1988). Efficacy of formulation of the phototoxic insecticides α -terthienyl towards *Aedes* spp, En Chemistry and Biology of Naturally-Occurring Acetylenes and Related Compounds (NOARC). (Lam J; Breteler H; Arnoson JT. and Hansen L. eds). Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. pp. 305-314.

Balandrin FM; Klocke AJ; Wortele SE. y Bollinger HM. (1985). Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal material. Science 228: 1154-1160.

Bakker J; Gommers JF; Niewenhuis J. y Wynberg H. (1979). Photoactivation of the nematocidal compounds α -terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes erecta*). J. Biol. Chem. 254(6): 1841-1844.

Becker H. (1987). Regulation of secondary metabolism in plant cell cultures. En Plant tissue and cell cultures. (Green CE; Somers DA; Hackett WP. and Biesboer DD. eds). Alan R. Lis Inc. New York. pp. 199-212.

Berlin J; Forche E; Wray V; Harmer J. y Hosel W. (1983). Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholzia californica*. Z. Naturforsch. 38c: 346-348.

Biondi S. y Thorpe AT. (1981). Requirements for a tissue culture facility. En Plant tissue culture. Methods and application in agriculture. (Thorpe AT. ed). Academic Press. New York; London; Toronto; Sydney; San Francisco. pp. 1-20.

- ✓ Bohlmann F; Burkhard T. y Zdero C. (1973). Naturally occurring acetylenes. Academic Press. London; New York.
- Calva CG. (1989). Establecimiento de cultivo de células en suspensión de *Capsicum annuum* var. *annuum*. Para la producción de capsaicinoides en biorreactor. Tesis de Maestría. CINVESTAV IPN.
- ✓ Campbell G; Lambert JDH; Arnoson T. y Towers GHN. (1982). Allelopathic properties of α -terthienyl and phenylheptatriyne, naturally occurring compounds from species of Asteraceae. J. Chem. Ecol. 8(6): 54-62.
- ✓ Champagne DE; Arnoson JT; Philogéne BJD; Campbell G. y MacLachlan D. (1984). Photosensitization and feeding deterrence of *Euxoa messoria* by α -terthienyl a naturally occurring thiophene from Asteraceae. Experientia. 40: 577-578.
- ✓ Champagne DE; Arnoson JT; Philogéne BJR; Morand P. y Lam J. (1986). Light-mediated allelochemical effects of naturally occurring polyethylenes from Asteraceae on herbivorous insects. J. Chem. Ecol. 12(4): 835-858.
- Chan QFQ; Lee MM; Glushks J. y Towers GHN. (1979). Photosensitizing thiophene in *Porophyllum*, *Tessaria* and *Tagetes*. phytochemistry. 18: 1566.
- ✓ Chan QFQ; Towers GHN. y Mitchell J. (1975). Ultraviolet-mediated antibiotic activity of thiophene compounds of *Tagetes*. Phytochemistry 14: 2295.
- Chawla HS. (1989). Regeneration responses of callus from different and in isozymes during morphogenesis in wheat. Biol. Plant. 31(2): 121-125.
- Collin HA; Musker D. y Britton G. (1986). Flavor production in onion tissue culture. En: Secondary metabolism in plant cell culture (Morris P; Scragg A; Stafford A. y Fowler MW. eds). Cambridge University Press. pp. 54-62.
- Collinge MA. y Yeoman MM. (1986). The relation between tropane alkaloids production and structural differentiation in plant cell cultures of *Atropa belladonna* and *Hyoscyamus muscivus*. En Secondary metabolism in plant cell cultures. (Morris P; Scragg HA; Stafford A. and Fowler WM. eds). Cambridge University Press. Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney. pp. 82-88.
- ✓ Constabel F; Gamburg OL; Kurz WGW. y Stak W. (1974). Production of secondary metabolites in plant cell cultures. Plant Med. 25: 158-165.
- ✓ Croes AF; Aarts AM; Bosveld M; Breteler H. y Wullems. (1989a). Control of thiophene accumulation in calli of two *Tagetes* species. Physiol. Plant. 76:204-210.
- ✓ Croes AF; Bosveld M. y Wullems GJ. (1988). Control of thiophene accumulation in *Tagetes*. En: Chemistry and Biology of Naturally Occurring Acetylenes (NOARC) (Lam J; Breteler H; Arnoson T. y

Reinhard E. eds). Springer. Berlin. pp 174-185.

✓ Croes AF; van der Berg AJR; Bosveld M; Breteler H. y Wullems GJ. (1989b). Thiophene accumulation in relation to morphology in roots of *Tagetes patula*. *Planta*. 179:432-50.

✓ Crocomo OJ; Aquarone E. y Gottlieb OR. (1981). Biosynthesis of secondary products *in vitro*. En: Plant tissue cultures. methods and applications in agriculture. (Torphe AF. ed). Academic Press. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco. pp. 359-372.

Deus B. y Zenk MH. (1982). Exploitation of plan cell for the production of natural compounds. *Biothech. Bioing.* 24: 1965-1974.

Dixon RA. (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. En: Plant cell culture. A practical approach. (Dixon RA. ed). IRL Press. Oxford, Washington DC. pp 1-20.

Dougall RK. (1980). Nutrition and metabolism. En: Plant tissue as a source of biochemicals. (Staba EJ. eds). CRC Pres Inc. Boca Ratón Florida. pp. 21-58.

Dougall RK. (1985). Chemicals from plant cell cultures: Yields and variations. En: Biotechnology of plant science, relevance to agriculture in the eighteen. (Zaitli M; Day P; Hollanends A. and Wilaon CW eds). Academic Press. San Diego, New York, Berkely, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 179-190.

✓ Downum RK. y Rodrigues E. (1986). Toxilogical action and ecological importance of plant photosensitiers. *J. Chem. Ecol.* 12(4): 823-834.

Downum RK; Rosenthal GA. y Towers GHN. (1984). Phototoxicity of the metabolite, α -terthienyl to larvae of *Manduca sexta* (*Shingidae*). *Pest. Biochem. Physiol.* 22: 104-109.

✓ Downum RK. y Towers GHN. (1983). Analysis of thiophene in *Tagetes* (*Asteraceae*) by HPLC. *J. Nat. Prod.* 46: 98-103.

Drapeau D; Blanch HW. y Wilke CR. (1987). Ajmalicine, serpentine, and catharantine accumulation in *Catharanthus roseus* bioreactor cultures. *Plant. med.* 53 (4). 373-376.

✓ El-Emary NA. y Ali AA. (1983). Revised phytochemicals study of *Tagetes erecta*. *Fitoterapia.* LX(1): 9-12.

✓ Ellis EE. (1986). Production of plant metabolites without plants. En: *Biotech. Adv. Research. Reviews and Patent Abstracts.* (Moo-Oxoung M. and Bullock JO. eds). Vol. 4: 279-288.

Endo T; Goodbody A. y Misawa M. (1987). Alkaloids production in root and shoot cultures of *Catharantus rosseus*. *Plant Med.* 53(5): 479-482.

Everett NP; Wang TL; Gould AR. y Street HE. (1981). Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells. II. effects of 2,4-Dichlorophoxyacetic acid (2,4-D). *Protoplasma* 106: 15-22.

Everett NP; Wang TL. y Street HE.(1978). Hormone regulation of cell growth and development *in vitro*. En: *Frontiers plant tissue culture 1978*. (Thorpe AT. ed). Calgary, Canada. pp. 666-678.

Frisch CH. y Camper ND.(1987). Effect of synthetic auxins on callus induction from tea stem tissue. *Plan Cell Tissue and Organ Culture*. 8(3): 207-213.

✓ Flores EH; Hoy WM. y Pickard.(1987). Secondary metabolites from roots cultures. *TIBTECH*. 5(12): 335-339.

Fowler MW.(1984). Plant-cell culture: Natural products industrial applications. En *Biotechnology and genetics engineering reviews*. (Russel GE ed). Intercept, London. vol 2. pp. 44-67.

Fowler MW.(1987). Process possibilities for plant cell cultures. En: *plant and animal cells: Possibilities*. (Weeb C; Mavituna F. and Ellis F. eds). Harwood. pp. 21-31.

Fujii JAA; Slade DT; Redenbaugh K. y Walker KA.(1987). Artificial seeds for plant propagations. *TIBTECH*. 5(12): 335-339.

Fujita Y. y Tabata M.(1987). Secondary metabolites from cells--Pharmaceutical applications and progress in commercial production. En: *Plant tissue and cell cultures*. (Green CE; Sommers DA; Hackett WP. and Biosboer). Alan R.Liss, Inc. pp. 169-185.

Fujita Y; Tabata M. y Nishi A.(1982). New medium and production of secondary compounds with the two-staged culture. En: *plant tissue culture 1982* (Fujiwara ed.). Abe Photo printin: tokyo. pp. 399-400.

Gamborg OL; Constabel F; LaRue TAG; Miller RA. y Steck W. (1970). The influence of hormones in plant cell cultures. En: *Les cultures de tissue de plantes*. Editions de Centre National de la Recherche Scientifique. Paris. pp. 335-343.

Gamborg OL; Miller RA. y Ojima K.(1968). Nutrient requirements of soybean root cells. *Exp. Cell. Res*. 50: 151-158.

Gamborg OL. y Shiluck JP.(1981). Nutrition media and characteristic of plant cell and tissue cultures. En *Plant tissue cultures Methods and application in agriculture*. (Thorpe AF ed). Academic Press. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco. pp. 21-44.

✓ Gayle KG; Chen TS. y Philip T.(1986). Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*), by high performance liquid chromatography. *J., Food. Sci*. 51(4):1093-1094.

✓ Gau W; Dloschke HJ. y Wunsche C.(1983). Mass spectrometric identification of xantophyll fatty acid esters from marigold flowers (*Tagetes erecta*) obtained by high performance liquid chromatography and craic-counter-current distribution. *J. Cromathogr*. 262: 227-284.

Giles KL. y Morgan WM.(1987). Industrial-scale plant

micropropagation. TIBTECH. 5(1): 35-39.

Groneman AF; Podthumus MA; Tuinstra LGMT. y Traag WA.(1984). Identification and determination of metabolites in plant cell biotechnology by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. Application to non polar products of *Chrysanthemum cinerariaefolium* and *Tagetes* species. Anal. Chem. Acta. 163:43-51.

Gressel TB. y Golberg I.(1982). The effect of constituents medium on growth and diogenin production by *Dioscorea deltoidea* cell grown in batch cultures. Plant. Med. 44: 111-115.

Harland J; Jackson JF. y Yeoman MM.(1973). Changes in some enzymes involved in DNA biosynthesis following induction and division in cultured plant cells. J. Cell Sci. 13: 121-138.

Heinstein P. y Emery A.(1988). Processes with plant cell cultures. En: Biotechnology vol. 6b. Special microbial processes. (Rehm HJ. y Reed G. eds). VCH. Germany. pp. 213-248.

Helsper H; Prins T; Willink DL. y Breteler H.(1988). 5-(4-acetoxy-1-butynyl)-2'-bithiopheno (BBToAc): acetato esterasa in intac plants, call, and cell cultures of *Tagetes patula*, cv nana furia. Plant. Physiol. suppl. 86(9): 143:885.

Heywood HV.(1978). Flowering plants of the world. Oxford London, Melbourne. pp. 262-268.

Hirata K; Yamanaka A; Kurano N; Miyamoto. y Miura Y.(1987). Production of indole alkaloids in multiple shoot culture of *Catharantus roseus* (L) G. Don. Agric. biol. Chem. 51(5): 611-614.

Hudson JB; Graham EA; Chan G; Finlayson AJ. y Towers GHN. (1986). Comparason of the antiviral effect of naturally occurring thiophene and poliacetylenes. Plant. Med. 53:453-457.

Hudson JB. y Towers GHN.(1988). Antiviral properties of acetylenes and thiophenes. En: Chemistry and Biology of Natural- Occurring Acetylenes and Related Compounds (NOARC). (Lam J; Breteler H; Arnoson T. and Hansen L eds). Elsevier, Amnsterdam, Oxford, New York, Tokyo. pp. 315-338.

Hulst AC; Meyer MMT; Breteler H. y Tramper J.(1989). Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on production thiophene and cell growth. Appl. Microbiol. Biotech. 30: 18-25.

Ickes GR; Fongg HSS; Schiff PL; Perdue RE. y Fransworth NR. (1973). Antitumoral activity on preliminar phytochemical examination of *Tagetes minuta* (Compositae). J. Pharmaceu. Sci. 62(6): 1009-1010.

Jain SC.(1977). Chemical of *Tagetes* tissue cultures. Plant Med. 31: 68-70.

Jente R; olantuji A. y Bosol F.(1981). Formation of natural thiophene derivatives from acetylenes by *Tagetes patula*. phytochemistry. 20(9): 2169-2175.

- Jente R; Richter E; Bosol F. y Olanutji A. (1988). Experimental on biosynthesis and metabolism of acetylenes and thiophenes. En: Chemistry and Biology of Natural-Occurring Acetylenes and Related Compounds (NOARC)z. (Lam J; Breteler H; Arnoson T. and Hansen). Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. pp. 187-200.
- Kagan J. y Chan G. (1983). The photooxidation of plant component toward *Drosophila melanogaster*. *Experientia*. 39: 402-403.
- Kamo KK; Kimoto W; Hou AF; Mahlberg P. y Bills DD. (1986). Morphine alkaloids in cultured tissue and redifferentiation organs of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*. 21: 2219-2222.
- Kaplan L. (1960). Historical and ethnobotanical aspects of domestication in *Tagetes*. *Econ. Bot.* 14:200-202.
- Kemp JD. y Sutton DW. (1972). Protein metabolism in cultured plant tissues. III changes in the rate of protein synthesis, accumulation and degradation in cultured pith tissue. *Plant. Physiol.* 49: 596-601.
- Ketel DH; Breteler H. y deGroot B. (1986). Thiophenes-biocides from cell cultures of *Tagetes patula* (Marigolds). En Process possibilities for plant, animal cell cultures. Manchester Polytechnic. Oxford, Road, Manchester. Poster 7.
- Ketel DH. (1986a). Inorganic nutrition of callus tissue of *Tagetes* species. The accumulation of thiophenes and others non-polar secondary metabolites. *J. Plant. Physiol.* 125: 69-77.
- Ketel DH. (1986b). Morphological differentiation and occurrence of thiophene in leaf callus from *Tagetes* species: Relation to growth medium of the plants. *Physiol. Plant.* 66: 392-396.
- Ketel DH. (1987). Distribution and accumulation of thiophenes in plants and calli of different *Tagetes* species. *J. Exp. Bot.* 38: 332-330.
- Ketel DH. (1988). Accumulation of thiophene by cell cultures of *Tagetes patula* and release of 5-(4-hydroxy-1-butynyl)2'-bithiophene into the medium. *Plant. Med.* 58: 400-405.
- King SM. y Morehart AI. (1987). Effect of BA, NAA, and 2,4-D on red maple callus growth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 10: 57-63.
- King PJ. y Street HE. (1977). Growth patterns in cell cultures. En: Plant tissue culture and cell culture. (Street HE ed). Botanical monographs. vol 11. Blackwell Scientific publications. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne. pp. 267-306.
- Knobloch KH; Bast G. y Berlin J. (1982). Medium and Light induce formation of serpentina and anthocyanins in cell suspension of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*. 21: 591-593.

Knobloch KH; Beutnogl G. y Berlin J.(1981). Influence of Phosphate accumulated on culture growth and formation of cinnamoyl putrescines in medium-induced cell suspension cultures. *Planta*. 153: 583-585.

Knoop B. y Beiderbeck R.(1983). Adsorbenskultur ein weg zur steigerung der secondarystoffproduction in pflanzlichen suspensionkulturen. *Z. Naturforsch.* 38: 484-486.

✓ Kotari SL. y Chandra N.(1984). Plant regeneration from cultures disc florest of *Tagetes erecta* L. *J. Plant. Phisiol* 117: 105-108.

✓ Kotari SL. y Chandra N.(1986). Plant regeneration in callus and suspension cultures of *Tagetes erecta* L. (*African Marigol*). *J. Plant Phisiol.* 122: 235-241.

Komamine A. y Shimizu T.(1975). Changes in respiratory metabolism in the early stage of callus formation in a carrot-root tissue culture. *Phisiol. Plant.* 33: 47-52.

✓ Kourany E; Arnoson JT. y Schneider E.(1988). Accumulation of phototoxic thiophenes in *Tagetes erecta* (*Asteracea*) elicited by *Fussarium oxiporum*. *Phisiol. Mol. Plant. Phathol.* 33(2) 287-290.

Krogstrup P.(1990). Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embriogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*. *Plant Science*

Kuri-harcuch W. y Castro MJF.(1986). Diferenciación celular. En: *Temas selectos de biologia celular*. Lopez RR; Tsutsumi. y Frixione E. (Eds). CINVESTAV-COSNET. México. pp: 391-406.

Kurz WGW. y Constabel F.(1979). Plant cell suspension cultures and their biosyntetis potential. En: *Microbial Technology*. (Peppler HJ. and Perlman D. eds). Academic Press. pp. 389-416.

Lindsey K. y Yeoman MM.(1983). The relation between growth rate differentiation and alkaloids accumulation in cell cultures. *J. Exp.Bot.* 31(143): 1055-1065.

Linsmaier EM. y Skoog F.(1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.

Luckner M. y Nover L.(1977). Expression of secondary metabolism. En: *Secondary metabolism and cell differentiation*. (Luckner M; Nover L. and Bohm H eds) Springer-Verlang. Berlin, Heidelberg, New York. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* vol. 23. pp. 1-82.

Macleod AJ; Mills ED. y Yeoman MM.(1979). Seasonal variation in the pattern of RNA metabolism of tuber tissue in response to excision and culture. *Protoplasma.* 98: 343-354.

✓ MacRae WD; Chan GFQ; Wat CK; Towers GHN. y Lam J.(1980). Examination of naturally occurring polyacetylenes and α -terthienyl for their ability to induce cytogetic damage. *Experientia.* 36: 1096-1097.

- ✓ MacRae DG; Yamamoto E. y Towers GHN.(1985). The mode of action of poliacetylenes and thiophenes photosensitizers on liposome permeability to glucose. *Biochem. Biophys. Acta.* 821 488-496.
- ✓ Man J.(1987). *Secondary Metabolism.* Clarends Press. Oxford. pp 1-24.
- ✓ Mantell SH; y Smith H.(1983). Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. En: *Plant Biotechnology.* (Mantel SH and Smith H eds). Cambridge University Press. UK. pp 75-105.
- ✓ Mennie A.(1971). Biocides in cooling systems. *Proc. Biochem.* 6(11): 21-22, 38.
- ✓ Metschulant G. y Sutfeld R.(1987). Acetyl-CoA: 4-hidroxiibutinylyl bithiopheno O-acetyl transferasa isoenzymes from *Tagetes patula* seedlings. *Z. Naturforsch.* 42c: 885-890.
- Misawa M.(1977). Production of natural substances by cell culture described by in Japanese patents. En: *Plant tissue culture and its bio-technological applications.* (Barz W; Reinhard E. and Zenk MH eds). Springer-Verlang. Berlin, Heidelberg, New York. pp. 17-26.
- Miura Y; Hirata K. y Kurano N.(1987). Isolation of vinblastine in callus culture with differentiated roots of *Catharantus roseus*. *Agric. Biol. Chem.* 51(2): 611-614.
- ✓ Moham-Ram HY. y Metha G.(1982). Regeneration of plantlets from cultured morphactin-induced barren capitula of African marigold (*Tagetes erecta*). *Plant. Sci. Lett.* 26: 227-232.
- ✓ Mukundan U. y Hjortso MA.(1990a). Effect of fungal elicitor on thiophene production in hair root cultures of *Tagetes patula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:145-147.
- ✓ Mukundan U. y Hjortso MA.(1990b). Thiophene accumulation in hair roots of *Tagetes patula* in response to fungal elicitors. *Biotechnol. Lett.* 12(8):609-614.
- Murashige T. y Skoog F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* 15:473-497.
- ✓ Neher RT.(1968). The ethnobotany of *Tagetes*. *Econom. Bot.* 22: 317-325.
- Nickell GL.(1980). Products. En: *Plant tissue as a source of biochemicals.* (Staba EJ. ed). CRC Press Inc. Boca Raton Florida. pp. 235-274.
- ✓ Norton RA; Finlayson AJ. y Towers GHN.(1985). Thiophene production by crow galls and callus tissues of *Tagetes patula*. *phytochemistry.* 24: 719-722.
- ✓ Oropeza C; López M; Trejo I; Santamaria J. y Cuello .(1990). Thiophenes formation in *Tagetes* in vitro culture. En: *Obtención de*

- metabolitos secundarios a partir de cultivo de tejidos vegetales y sus perspectivas biotecnológicas (Loyola-Vargas VM ed.) CICY Yucatán. pp. 198-221.
- ✓ Pensel R. y Sutfield R. (1985). Occurrence of 3,4-diacetoxybutinil bithiophene in *Tagetes patula* and its enzymatic conversion. Z. Naturforsch. 40c: 3-7.
- ✓ Philip T. y Berry WJ. (1975). Nature of lutein acylation in marigold (*Tagetes erecta*) flowers. J. Food Sci. 40: 1089-1090.
- Philip T. y Berry WJ. (1976). process for the purification of lutein-fatty acid esters from marigold petals. J. Food Sci. 41: 163-164.
- ✓ Philogéne BJR; Arnoson JT; Berg CW; Duval F. y Morand F. (1986). Efficacy of the plant phototoxic α -terthienyl against *Aedes intrudens* and effects on nontarget organism. J. Chem. Ecol. 12(4): 893-898.
- Polanco MC; Pelaez MI y Ruiz ML. (1988). Factors affecting callus and Shoot formation from in vitro cultures of *lens culinaris* Medik. Plant cell tissue and organ culture. 15: 175-182.
- ✓ Rodhes MSC; Robbins RJ. y Hamill J. (1987). Secondary products formations in plant cell cultures. J. App. Bacteriol. Symp. Suppl. 1058-1148.
- Rokem JS. y Golberg I. (1985). Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: Method for yied improvement. En Advances in Biotechnology Process. vol. 4. pp. 241-274.
- Rubião IA. (1985). Estrategias para la preservación del germoplasma vegetal in vitro. En: El cultivo de tejidos vegetales en México. (Robert LM. y Loyola VM eds). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia. C. U. México. pp. 35-43.
- Rzendowski y Rzendowski. (1975). Flora fanerogamica del valle de México. Vol II. Instituto de Ecologia. ENCB. PP. 586-590.
- Sakano K. y Komamine A. (1975). Change in the proportion of the aspartocinas in carrot root tissue in response to in vitro culture. Plant. Physiol. 61: 115-118.
- Sasse F; Henkenberg V. y Berlin J. (1982). Accumulation of B-carboline alkaloids and serotonin by cell culrures of *Pegamun harmala* L. Plant. Physiol. 61: 400-404.
- Schenk RU. y Hildebrant AC. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotiledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.
- Seabrook JEA. (1980). Laboratory culture. En: Plant tissue as a source of biochemicals. CRC Prees Inc. Boca Ratón Florida pp. 1-20.
- ✓ Solborg H; Gislelohne J. y Thorleif A. (1984). Possible confusion

of pyrethrins with thiophene in *Tagetes* species. Acta Chim. Scand. B. 38(10): 902-904.

✓ Staba EJ. (1985). Miletones in plant tissue culture systems for the production of secondary products. J. Nat. Prod. 48(2): 293-309.

Stafford A; Smith L. y Fowler MW. (1985). Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus* (L)G. Don. Plant cell tissue organ culture. 4:83-94.

Stafford A; Morris P. y Fowler MW. (1986). Plant cell biotechnology: perspective. Enzym. Microb. Technol. 8 578-586.

Street HE. (1976). Experimental embriogenesis- The totipotency of the cultured plant cells. En: The development of plants and animals. (Graham CF. and Wareing PF eds). Blackwell Scietific Publications. Osney; Oxford. pp. 73-89.

Street HE. (1977). Cell (suspension) cultures- Techniques. En: Plant tissue culture and cell culture. (Street HE ed). Botanic monographs vol 11. Blackwel Scientific Publications. Oxford, London, Edinburg, Melbourne. pp. 61-102.

✓ Sutfeld R. (1982). Distribution of thiophene derivatives in different organs of *Tagetes patula* seedlings grow under varius conditions. Planta. 156: 536-540.

✓ Sutfeld R. (1988). Enzimological investigations into metabolism of bithiophenes derivatives. En. Chemical and Biology of Natural-Occurring Acetylenes and Related compounds (NOARC). (Lam J; Breteler H; Arnoson T. and Hansen L eds). Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. pp. 201-208.

✓ Sutfeld R. y Towers GHN. (1981). 5-(4-acetoxy-1-butinil)-2-2'-bithiophene: Acetate esterasa from *Tagetes patula*. phytochemistry. 21(2): 277-279.

Tabata M. (1977). Recent advaces in the production of medicinal substances by plant cell cultures. En: Plant tissue culture and its bio-technological application. (Barz W; Reinhard E. and Zenk MH eds). Springer-Verlang. Berlin, Heidelberg, New York. pp. 3-16.

Tabata M; Yamamoto H. y Hiraota N. (1970). Alkaloids production in the tissue cultures of some *Solanaceas* Plants. En: Les cultures tissue de plantes. Editions du centre National de la Recherche Scientifique. Paris. pp. 389-401.

✓ Towers GHN. y Wat CK. (1978). Biological activity of poliacetylenes. Rev. Latinoamer. Quim. 9: 162-170.

Veliky IV. (1972). Synthesis of carboline alkaloids by plant cell culture. phytochemistry. 11: 1405-1408.

Veliky IA. y Martin SM. (1970). A fermenter for plant cell suspension cultures. Can. J. Microb. 16(4):223-226.

Vickery LM. y Vickery B. (1981). The acetate-malonate pathway. En:

secondary plant metabolism. The Macmillan Pres LTD. London Basingetoke. pp. 54-87.

Vinig .(1986). Secondary metabolisms. En: Biotechnology. Microbial products II. (Rehm. and Reed G eds). VCH. Germany. Vol 4. pp 19-38.

Wang TL; Everett NP; Gould AR. y Street HE.(1981). Studies on the control of the cell cycle in cultures plants cells. III. the effects of cytokinin. *Protoplasma* 106: 23-35.

Wang-Yan S; Wei H; Guang-yu; Jian-gin C; Xu L. y Ming J.(1988). Study chemical constituents from the essential oil of *Tagetes erecta* L. *Acta Bot. Sinica*. 30(6): 629-634.

Whitaker RJ. y Evans DA.(1987). Plant biotechnology and the productions of flavor compounds. *Food Technol.* 41(9): 86-101.

Wat CK; MacRae DW; Yamamoto E; Towers GHN. y Lam J.(1980). Phototoxic effects of natural occuring poliacetylenes and α -terthienyl on humam erythrocites. *Photochem. Photobiol.* 32. 167-172.

Wierman R.(1981). Secondary plant products and cell and tissue differentiations. En: *Biochemistry of plants, a comprehensive treatiss.* (Stumpf PK and Conn eds). Academic Press. New York, London. vol. 7 pp. 86-116.

Wildgoose JG.(1972). Biocides in the food industry. *Proc. biochem.* 7(11): 13-16.

Yan YS; Kiyomi W. y Futsuhara Y.(1990). Comparative studies of organogenesis and plant regeneration in various soybean explants. *Plant. Sci.* 72:101-108.

Yasuda T. y Yamada Y.(1970). Complex formation by 2,4-diclorophenoxyacetic acid with histones during callus induction. *Biochem Biophysic Res. Com.* 40(3):649-653.

Yeoman MM.(1986). Industrial applications of plant cell culture. En: *Plant cell culture technology.* (Yeoman MM ed). Botanical monographs. vol. 23. Blackwell Scientific Publications. pp 202-227.

Yeoman MM.(1987). Bypassing the plant. *Ann. Bot. suppl.*60(4): 157-174.

Yeoman MM. y Forche E.(1980). Cell proliferation and growth in callus cultures. En: *Perspectives in plant cell and tissue cultures.* International review of cytology supp. 11A. (Vasil IK. ed). Academic Press. pp. 1-25.

Yeoman MM. y Macleod AJ.(1977). Tissue (callus) cultures-techniques. En: *Plant tissue and cell culture.* (Street HE ed).

Botanical monographs. Blackwell Scientific Publications. Vol. 11. Oxford, London, Edinburg, Melbourne. pp. 31-59.

Yeoman MM; Miedzybrozca MB; Lindsey K. y Mclauchlan.(1980). The synthetic potential of cultures plant cells. En: Plant cells cultures and perspectives. (Sala F; Parasi B; Cella R. and Cifern. eds). Elsevier. North Holland, Amsterdam. vol.5. pp. 527-548.