

03072
13
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL
CCH

EFFECTO DE ELICITORES SOBRE LA PRODUCCION DE
METABOLITOS SECUNDARIOS EN
Piqueria trinervia Cav.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

MARIA ISABEL SAAD VILLEGAS

MEXICO, D. F.

JUNIO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA INVESTIGACION SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEGIDOS VEGETALES, DEL JARDIN BOTANICO DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA UNAM, EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA UNAM Y EN EL LABORATORIO DE HONGOS FITOPATOGENOS DEL INSTITUTO DE FITOSANIDAD DEL COLEGIO DE POSGRADUADOS. LA TESIS SE REALIZO BAJO LA DIRECCION DEL DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS Y CON UN COMITE TUTORIAL FORMADO POR EL DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA, EL DR. MIGUEL LARA FLORES Y EL DR. SEIJI OSADA KAWASOE.

AGRADECIMIENTOS

A Christian por su ayuda en la determinación de los hongos.

A Enrique por su ayuda en la edición de esta tesis.

A Mabel Hernández y a Liza Covantes, porque este proyecto es de las tres.

Al Dr. Manuel Jiménez por su apoyo y comprensión.

Al CONACYT y a la DGAPA de la UNAM por el apoyo dado para la realización de esta investigación.

Para Raúl Trejo Delarbre
Por lo mucho que le deberé siempre

CONTENIDO

	PAGINA
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION.....	2
III.- MARCO TEORICO.....	4
1.- Metabolitos secundarios de plantas.....	4
2.- Monoterpenos	6
3.- Elicitores	11
a.- Los sistemas inducidos con elicitores.....	11
b.- Optimización de los sistemas elicitados.....	12
c.- Aspectos bioquímicos del proceso de inducción.....	15
IV.- OBJETIVOS	19
1.- General	19
2.- Específicos.....	19
V.- MATERIALES Y METODOS	20
1.- Estrategia desarrollada	20
2.- Material biológico.....	22
3.- Medios de cultivo	22
4.- Germinación.....	22

CONTENIDO
(continuación)

	PAGINA
5.- Inducción de callo	24
6.- Cultivo de células en suspensión.....	25
a.- Establecimiento.....	25
b.- Cinética de crecimiento.....	25
7.- Extracción y medición de piquero.....	26
a.- Extracción de piquero de cultivos líquidos.....	26
b.- Extracción de piquero de plantas silvestres.....	26
8.- Cepas fúngicas	27
a.- Aislamiento.....	27
b.- Obtención de cepas monospóricas.....	27
c.- Preparaciones semipermanentes de micelio.....	28
d.- Curvas de crecimiento	28
e.- Cultivos líquidos.....	28
f.- Pruebas de patogenicidad	28
g.- Pruebas de metabolitos de la planta sobre los hongos	29
9.- Interacción planta-elicitores.....	29
a.- Preparados de hongos.....	29
b.- Experimentos de interacción.....	30
c.- Cromatografía de placa fina.....	30
d.- Purificación de sustancias sintetizadas <i>de novo</i>	30
VI.-RESULTADOS Y DISCUSION	32

CONTENIDO
(continuación)

	PAGINA
1.- Germinación.....	32
2.- Inducción de Callo	34
3.- Cultivo de células en suspensión.....	39
4.- Cepas fúngicas	43
5.- Interacción células en suspensión-elicitores	46
a.- La naturaleza del elicitor.....	51
b.- Las sustancias sintetizadas <i>de novo</i>	52
6.- Pruebas de los metabolitos secundarios sobre los hongos.....	60
VII.- CONCLUSIONES	63
VII.- CONSIDERACIONES FINALES.....	64
IX.- BIBLIOGRAFIA	65
X.- APENDICE.....	71
Embriogénesis Somática de <i>Piqueria trinervia</i> Cav.....	71
1.- Metodología.....	71
a.- Inducción.....	71
b.- Desarrollo.....	71
2.- Resultados y Discusión.....	72

I.- RESUMEN

El piquerol A, monoterpeno producido por *Piqueria trinervia* Cav. (Asteraceae) es un compuesto muy interesante por su amplio espectro de acción biológica sobre plantas, moluscos, ácaros y protozoarios. Por estas características es importante producir esta sustancia con altos rendimientos por métodos sintéticos o biotecnológicos. Dentro de una estrategia biotecnológica para producir piquerol A fueron probados elicitores fúngicos. Se estudió el efecto de diferentes auxinas sobre la inducción de callo en *Piqueria trinervia* Cav. Resultando que el ANA, da la mejor respuesta. La adición de BAP al medio de cultivo, mejora la velocidad de crecimiento e induce la formación de un callo verdoso y friable que presenta síntesis de piquerol. Con este callo se estableció el cultivo de células en suspensión. Se determinó la cinética de crecimiento del cultivo líquido y se midió la producción de piquerol en las células y en el medio de cultivo. El medio con el que se obtuvo la mejor respuesta para la inducción, desarrollo de callo y establecimiento de células en suspensión fue: MS suplementado con 1mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP. Se aislaron y caracterizaron ocho cepas de hongos fitopatógenos asociados con *P. trinervia*. Se estableció cultivo líquido de los hongos en medio nutritivo PDA. La interacción entre los cultivos en suspensión de la planta y los homogenizados del micelio de los hongos, provocó en todos los casos, la síntesis de cuatro compuestos con propiedades fungicidas. Las cepas fúngicas que resultaron las mejores inductoras pertenecen al género *Fusarium*. No fue detectada la presencia de piquerol en los sistemas elicitados.

II.- INTRODUCCION

Piqueria trinervia Cav. es una planta silvestre mexicana de naturaleza herbácea o subarborescente, que tiene pequeñas cabezuelas de tres flores con lígulas blancas y estigmas amarillos; las hojas se presentan en los entrenudos por pares y tienen tres venas longitudinales y márgenes aserrados.

Esta planta perteneciente a la familia Asteraceae, se encuentra ampliamente distribuida por el territorio nacional, desde Durango hasta Oaxaca. Crece preferentemente asociada a bosques de pino-encino, en lugares abiertos y soleados, aunque también se encuentra en sucesiones secundarias, en matorrales y en terrenos agrícolas. Se localiza en ecosistemas entre 920 y 4200 metros sobre el nivel del mar, tanto en zonas planas como en sitios con pendientes pronunciadas; se desarrolla bien en muchos tipos de suelos: regosoles, andosoles, cambisoles y tobas volcánicas.

Recibe varios nombres comunes: Tabardillo, Hierba de San Nicolás, Xoxonetzal, Yotoxiltic y Empuesthe. En las comunidades donde se encuentra se utiliza para combatir el tifo, la fiebre, como antimalárico y antiinflamatorio. Buscando los principios activos que expliquen las propiedades que se le adjudican, se han purificado de ella varios compuestos: acetato de carquejilo, el diterpeno trinervinol y dos terpenos diastereoisómeros, piquerol A y piquerol B, así como varios fenoles.

El piquerol A resulta entre ellos especialmente notable por tener un espectro de acción biológica muy amplio: presenta propiedades alelopáticas, es moluscicida, acaricida y actúa contra *Trypanosoma cruzi*. Estas características lo hacen un compuesto de uso potencial en las industrias farmacéutica y agroquímica.

A pesar de su uso en medicina tradicional y de que se le utiliza en ocasiones como follaje en arreglos florales, no se cultiva *Piqueria trinervia* en ningún sitio y como los rendimientos de piquerol en plantas silvestres son muy bajos, la eventual explotación de la planta a gran escala ejercería una presión muy grande sobre la especie y la pondría en peligro de extinción. Por otra parte, no se ha conseguido la síntesis química de piquerol A. Por fortuna, la biotecnología ofrece alternativas para aprovechar este recurso vegetal sin arriesgarlo.

Dentro de las estrategias empleadas para aumentar la producción de metabolitos secundarios en cultivos en suspensión de células vegetales, el empleo de elicitors fúngicos ha resultado una técnica conveniente porque genera altos rendimientos por litro de cultivo, en tiempos cortos, además de provocar la secreción de las sustancias al medio nutritivo.

Considerando su acción sobre grupos biológicos tan distantes, el piquerol parece ser un metabolito con significado ecológico, involucrado en la defensa y competencia del vegetal. Lo que nos hizo pensar que si se inducía la respuesta de defensa en la planta, la síntesis del monoterpeno podía aumentarse. Con este propósito se probó en este trabajo, el efecto de elicitors fúngicos sobre la producción de piquerol, en cultivos en suspensión de la planta.

II.- MARCO TEORICO

1.- Metabolitos secundarios de plantas

La denominación metabolito secundario tiene connotación histórica, deriva de la primera explicación dada a la presencia en microorganismos y particularmente en plantas, de compuestos sin función conocida en el mantenimiento de los procesos vitales fundamentales del organismo que los produce (8). En los últimos 20 años nuestra concepción del metabolismo secundario ascendió desde poza de desperdicios celulares hasta regulador de procesos ecológicos complejos (19), porque comprendimos que el papel de sus compuestos secundarios debe buscarse, no en la planta misma, sino en las respuestas bioquímicas que induce en los organismos con los que convive. Ahora sabemos que estos compuestos son tan esenciales como los intermediarios del metabolismo primario para la supervivencia de las plantas, por las ventajas selectivas que les confiere. Un nombre más conveniente para ellos podría ser metabolitos especiales (37).

En las plantas, los metabolitos especiales pueden cumplir alguna de las siguientes funciones: detener predadores potenciales, competir con otras plantas, defenderse de patógenos, protección contra los agentes estresantes del ambiente o atraer polinizadores y simbioses (8). Pero más que el interés en conocer estas funciones biológicas el conocimiento del metabolismo secundario ha sido empujado por la creciente demanda de nuevas sustancias en las áreas química, farmacéutica, agrícola y alimentaria. La tendencia mundial que favorece la utilización de aditivos naturales estimula las alternativas biotecnológicas para la producción de metabolitos de interés industrial.

La producción de metabolitos secundarios de plantas *in vitro* resulta hoy posible gracias al desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, que dieron a las plantas muchas ventajas antes restringidas a los microorganismos: la disponibilidad de material homogéneo de diversas poblaciones, con tiempos de generación cortos, en sistemas de cultivo reproducibles que ocupan espacios reducidos (57).

Sin embargo, convertir a estos cultivos en procesos redituables a nivel industrial ha sido una meta difícil de alcanzar. Todos los metabolitos secundarios que se acumulan en las plantas son derivados del metabolismo primario (18). En el punto en el cual las rutas secundarias derivan de las primeras, compiten por el mismo sustrato, el metabolismo secundario es mucho más lento que el primario y

su productividad es muy baja (del orden de mg/l). La sobreproducción de muchos productos naturales requeriría redirección significativa de la distribución del flujo en el metabolismo primario. Los compuestos del metabolismo especial son productos de muchos genes y su biosíntesis está regulada de una manera compleja que comprendemos de forma incipiente, por eso el aprovechamiento empírico ha sido limitado (57, 66).

Las dificultades técnicas son muchas. Los tejidos de plantas en cultivos *in vitro*, tienden a formar agregados y debido a su tamaño, las células son muy sensibles al daño físico, características que hacen muy difícil el escalamiento de cultivos de células vegetales. La recuperación de productos suele resultar costosa porque los vegetales a menudo retienen sus metabolitos secundarios en vacuolas (57). Sabemos que las fitohormonas influyen en los niveles de síntesis, sin embargo, nuestra comprensión limitada de su acción impide una elección de los tipos y niveles de reguladores de crecimiento empleados. Las células en suspensión, la forma de cultivo más adecuada para un proceso industrial, generalmente involucra desdiferenciación o diferenciación parcial y existen muchos productos cuya síntesis está asociada con algún grado de organización celular (66). Pero tal vez, el mayor obstáculo en el cultivo de células vegetales sea su crecimiento lento (57).

A pesar de la complejidad del problema, se está avanzando de forma acelerada. La variación inherente de los cultivos de plantas *in vitro*, ha sido aprovechada para seleccionar líneas sobreproductoras. Está saliendo al mercado una nueva generación de reactores diseñados *ex profeso* para cultivos vegetales (tanto para cultivo de células en suspensión como para cultivos de raíces). La optimización del medio por el manejo de nutrientes, reguladores de crecimiento y la adición de precursores es una estrategia ineludible para aumentar rendimientos. Cuando es necesario cierto nivel de organización para que la síntesis del metabolito se presente, pueden emplearse cultivos de órganos -el cultivo de raíces y en especial de raíces pilosas son opciones cada vez más empleadas- (12, 57, 66).

Es posible estimular la síntesis de un metabolito secundario, generando plantas poliploides, regulando las condiciones físicas del cultivo o aplicando condiciones de estrés como choque osmótico, iones pesados y cambios bruscos de temperatura, o bien, empleando técnicas especializadas. La regulación negativa de la síntesis puede ser burlada creando un sitio de acumulación

artificial. Esta forma de remoción del producto *in situ* genera muy buenos resultados. Las técnicas de inmovilización celular permiten reutilizar las células, invalidando así el inconveniente de las bajas tasas de crecimiento. Los elicitores posibilitan la regulación fina del sistema al funcionar como inductores y bajan los costos de purificación porque causan la secreción de los metabolitos al medio (56, 57). La presencia en los mercados de algunos metabolitos vegetales producidos con técnicas biotecnológicas se la debemos al empleo de estas tres últimas estrategias combinadas (57).

El empleo conjunto de química sintética y cultivo de células vegetales es una de las áreas más promisorias de la biotecnología, tanto en la biotransformación de sustancias exógenas como en el estudio de rutas biosintéticas del metabolismo secundario. El uso de análogos sintéticos de los sustratos naturales puede resultar en la producción de compuestos completamente nuevos con posible uso farmacéutico. La información generada en los estudios de rutas metabólicas se utiliza para desarrollar procesos de síntesis altamente eficiente de productos naturales (53).

Todo esto parece indicar que la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales, promete mucho y está empezando a cumplir sus promesas.

2.- Monoterpenos

Existen probablemente más terpenos y terpenoides individuales que ningún otro grupo de productos naturales de plantas, se conocen cerca de 22 mil diferentes (36). Las funciones que cumplen en los vegetales son muy diversas: son pigmentos fotosintéticos, hormonas vegetales, transportadores de electrones, mediadores en el ensamble de polisacáridos, componentes estructurales de membrana y sustancias de comunicación y defensa (22, 54). Las plantas pueden sintetizar (y catabolizar) muchos tipos diferentes de terpenos, desde sustancias de cinco carbonos hasta moléculas con cuarenta.

Los monoterpenos son compuestos de bajo peso molecular formados por diez átomos de carbono (dos unidades isopreno). Son sustancias lipofílicas, volátiles, responsables del olor característico de muchas plantas. Ellos se han encontrado en cerca de cincuenta familias de angiospermas y suelen ser los constituyentes principales de los aceites y resinas de las gimnospermas (34). Al igual que otros metabolitos secundarios, cumplen funciones ecológicas: atraen

polinizadores, son agentes alelopáticos o sustancias de defensa contra predadores y parásitos (23, 34).

La importancia de los monoterpenos es muy grande en las industrias de saborizantes y aromas. Sus usos comerciales también comprenden las áreas farmacéutica y agroquímica (54).

A pesar de su importancia biológica y comercial es poco lo que se conoce sobre el metabolismo de los monoterpenos. Han sido varias las causas de esta situación: procesos de regulación espaciales y temporales muy complejos, bajas concentraciones enzimáticas y falta de disponibilidad, hasta hace poco tiempo, de sustratos radiomarcados. Afortunadamente, esta situación ha empezado a revertir y se cuenta ya con varios sistemas adecuados para estudios bioquímicos (22, 23, 54), gracias a los avances en la extracción de glándulas epidérmicas, a las técnicas cromatográficas de afinidad y al desarrollo de métodos radioquímicos muy sensibles (19).

La gran mayoría de los monoterpenos naturales de plantas son compuestos cíclicos basados en un anillo ciclohexanoide, sintetizado a partir de geranyl pirofosfato (GPP) -el intermediario ubicuo C_{10} de la ruta del mevalonato-, por monoterpeno sintetas o ciclasas (19). Recientemente estas enzimas han recibido considerable atención porque las reacciones que catalizan determinan las características básicas del monoterpeno final; por su posible importancia regulatoria como punto de ramificación en el metabolismo de isoprenoides y por su catalisis inusual con múltiples pasos de reacciones secuenciadas que involucran isomerización, ciclización y desprotonación de intermediarios carbocatiónicos (34). La secuencia de reacción diverge en cada sintasa. La combinación particular de ciclizaciones electrofílicas internas y rearrreglos antes de la terminación hace a cada ciclasa única. Transformaciones subsecuentes de un esqueleto básico, que involucran oxidaciones, reducciones, hidrataciones, conjugaciones e isomerizaciones dan por resultado gran número de derivados. Se conocen cerca de doscientos monoterpenos y se estima que deben existir alrededor de 50 ciclasas (19). Una característica inusual de las monoterpeno ciclasas es que la mayoría de estas enzimas producen múltiples productos.

El control de la biosíntesis de monoterpenos es un proceso complejo. La acumulación de estos compuestos en las plantas depende de un balance entre procesos sintéticos y catabólicos e involucra regulación espacial, temporal y ambiental (34).

La ramificación múltiple en la ruta del mevalonato es el primer punto de control. En la sección que es compartida por los terpenos (figuras 1a y b), se ha identificado a la hidroxil-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) como enzima regulatoria (22). Las plantas poseen diversas formas de esta enzima (isoenzimas) en diferentes localizaciones subcelulares y cada forma está asociada con la síntesis de distintas clases de terpenos. En el punto donde la síntesis de cada tipo de terpenos diverge, se localizan otras enzimas regulatorias, las preniltransferasas. Algunas de estas enzimas pueden sintetizar los intermediarios de los diferentes grupos de terpenos, GPP, farnesil pirofosfato (FPP) y geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP), sin embargo, suelen tener mayor afinidad por alguno de los sustratos y dependiendo de ella se localizan en organelos distintos (34). Las ciclasas son también enzimas regulatorias con localización especial en la célula. La regulación de flujo de precursores, intermediarios y cofactores en los distintos compartimentos celulares resulta un importante sistema de control (10, 54).

A nivel enzimático la regulación incluye, tanto cambios en la cantidad absoluta de enzimas, resultado de variaciones en las tasa de síntesis y degradación controlados a nivel transcripcional; como cambios en la capacidad catalítica relacionados con modificaciones alostéricas o covalentes, regulados a nivel postranscripcional (34).

La regulación espacial comprende límites histológicos, celulares y subcelulares. La síntesis se localiza en la epidermis, en epitelios metabólicamente activos. Dada su característica hidrofóbica, los monoterpenos son generalmente acumulados en estructuras secretorias complejas, tales como ductos y cavidades de resina o tricomas glandulares. Las células involucradas en la síntesis tienen retículos endoplásmicos bien desarrollados y poseen abundancia de plastidios no pigmentados conocidos como leucoplastos, los cuales no tienen tilacoides (34, 73). Estudios efectuados en 45 especies de plantas demuestran que a nivel subcelular, los plastidios son el sitio exclusivo de síntesis de los monoterpenos (54). La conversión y el flujo de la conversión metabólica se regulan en el organelo por las enzimas presentes; por la permeabilidad de la membrana intracelular a precursores, intermediarios y productos; y por la disponibilidad de cofactores (5).

Los niveles de acumulación de los monoterpenos sufren cambios drásticos durante el crecimiento. Aparecen estructuras secretoras sólo en ciertos órganos

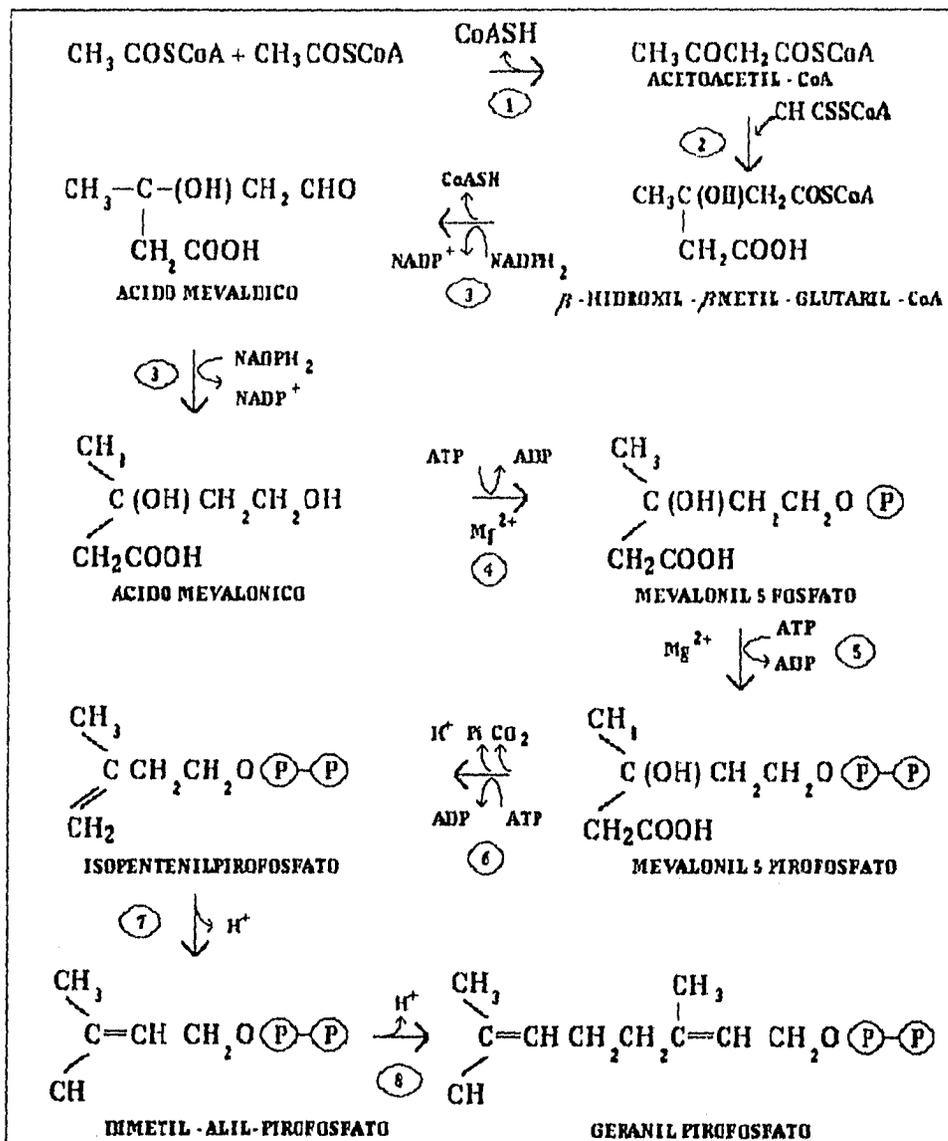


Fig 1a.- Ruta metabólica acetato-mevalonato. 1) β cetotilasa, 2) HMG - CoA enzima condensante, 3) HMG - CoA reductasa (enzima regulatoria), 4) kinasa, 5) kinasa, 6) enyhidrodescarboxilasa, 7) isomerasa y 8) preniltransferasa.

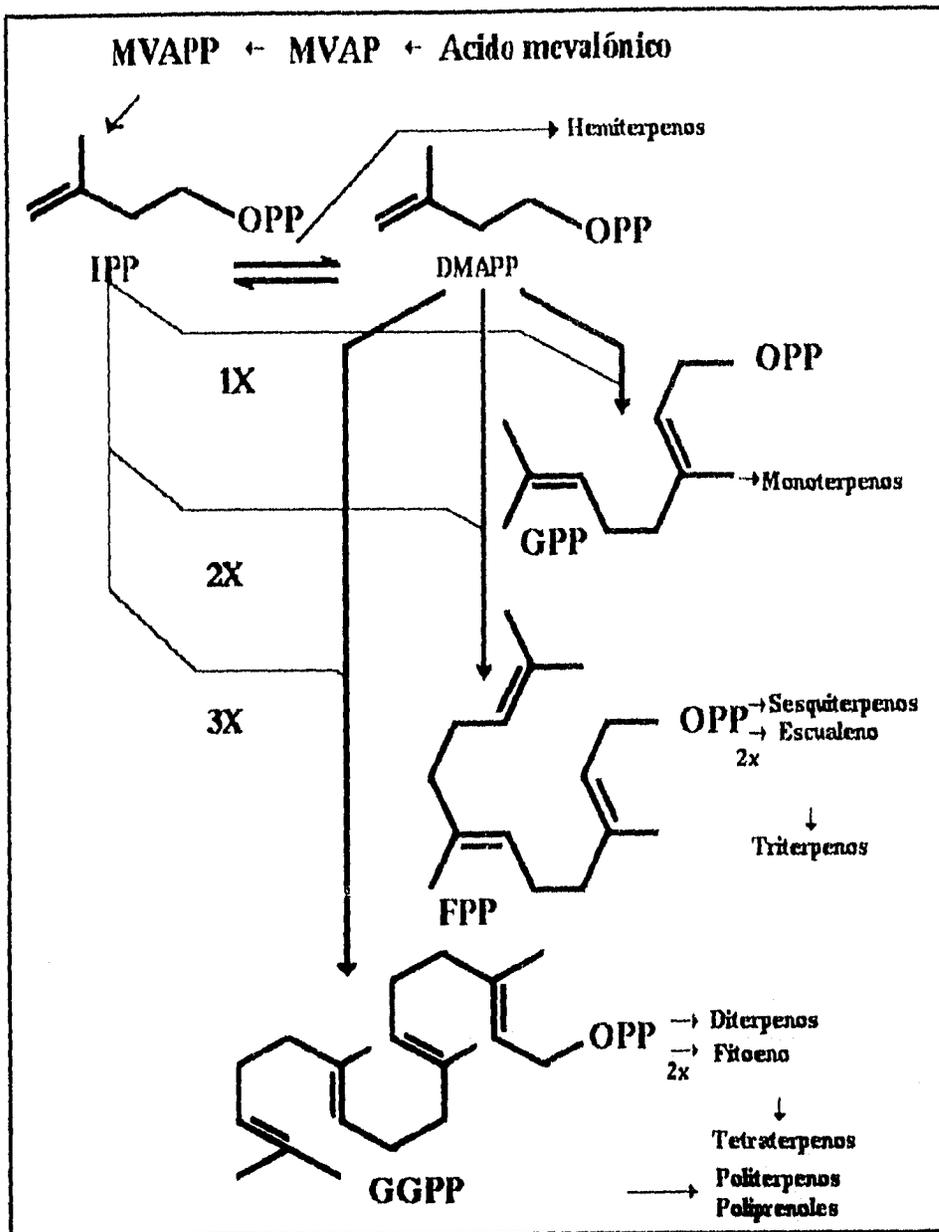


Fig. 1b.- Ramificación de la ruta del mevalonato
 1x, 2x, 3x, indican el número de unidades IPP adicionadas.

de las plantas, como hojas y flores, en momentos particulares del desarrollo del vegetal -casi siempre en la fase juvenil- y bajo estímulos ambientales especiales como, iluminación o estrés hídrico (23, 34, 54).

La gran mayoría de las rutas biosintéticas de los monoterpenos cíclicos permanecen desconocidas. Hasta el momento se han purificado y caracterizado cinco ciclasas de monoterpenos: bornyl sintasa, T- terpineno sintasa, 1,8-cineolo sintasa, (+)-píneono sintasa y 4 -S limoneno sintasa. Las dos últimas también han sido clonadas (23,34).

Para responder algunas preguntas esenciales sobre la localización, regulación, estructura y función de los monoterpenos es necesario el análisis a nivel molecular. Sólo así, podremos extender las aplicaciones y el valor científico de esta importante ruta metabólica en las plantas. La comprensión clara del proceso podrá hacerlo más predecible, llevarnos a aprovechar estas sustancias de forma más eficiente y reemplazar el enfoque empírico en los desarrollos biotecnológicos.

3.- Elictores

a.- Los sistemas Inducidos con elicitores

Se conoce como elicitores a las moléculas de origen biológico que pueden inducir la síntesis de compuestos secundarios en una planta, como respuesta a su presencia. Han sido aisladas sustancias elicitoras de distinta naturaleza química: polisacáridos, oligosacáridos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, enzimas, lípidos y ácidos grasos (11, 52 y 59). Los constituyentes de la pared celular de los hongos (quitina, quitosan, glucanos), son los elicitores con más amplio rango de acción entre las plantas.

Las sustancias elicitoras forman parte de un sistema complejo de defensa con que el vegetal responde al estrés a que le somete el ataque de un agente patógeno biótico o abiótico. Por convención llamamos elicitores solamente a los compuestos de origen biológico, los inductores de diferente naturaleza son llamados estresantes abióticos.

La observación de que los metabolitos secundarios pueden ser inducidos ha llevado a muchos grupos a emplear elicitores con la esperanza de que la producción pueda ser aumentada (57). Pero como la dificultad de montar ensayos de elicitores en órganos es muy grande (59), se ha optado por utilizar cultivos de células en suspensión.

Las ventajas que ofrecen los sistemas de cultivo de células elicidadas son muchas. Con elicitores se pueden alcanzar los niveles de síntesis de los reactores microbianos, con producciones de gramos por litro en menos de una semana de tiempo total de cultivo (12). El proceso de síntesis generalmente involucra un pequeño número de reacciones y como los metabolitos son excretados al medio, las células pueden reutilizarse, en procesos semicontinuos de cultivo (57); para esto se emplean sistemas de inmovilización que además, permiten mayores concentraciones de células en los reactores, lo que disminuye en forma importante los costos de operación. Cambios de medio pueden provocar sobreproducción. Es posible emplear células elicidadas para biotransformaciones porque la elicitación aumenta la actividad de varias enzimas, esto lleva a un proceso más rápido y eficiente de transformación que el observado en células sin tratar (30). Los cultivos elicidados resultan además adecuados para el análisis detallado, bioquímico y molecular de rutas metabólicas y sus productos finales: por los altos niveles de enzimas, por la disponibilidad de material y porque son inducibles (57, 31).

Estudios de reconocimiento planta-microorganismo han llevado a la identificación de cuatro diferentes tipos de interacciones que desencadenan la síntesis de sustancias relacionadas con la defensa: 1) el microorganismo excreta una sustancia elicitora (del metabolismo secundario) que es reconocida por las células de la planta; 2) enzimas microbianas liberan componentes de la pared celular de la planta, los cuales actúan como elicitores; 3) las células de la planta secretan una enzima que degrada al microorganismo y los componentes de éste, inducen la formación de fitoalexinas en las células de la planta y 4) compuestos endógenos y constitutivos son activados o liberados por las células de la planta como respuesta a distintos estímulos como daño mecánico, fotooxidación y déficit hídrico (2, 3, 17, 30).

b.- Optimización de los sistemas elicidados

Hay muchos microorganismos que son patógenos de plantas: virus, bacterias y hongos, sin embargo, los organismos más utilizados son hongos, debido a que son los principales parásitos de las plantas, éstas han desarrollado sistemas complejos para detectar su presencia (fig 2). En la mayoría de las plantas elicidadas, se emplean fitopatógenos que se sabe son sus parásitos, en especial cepas poco virulentas. No obstante, se ha descubierto que no se requiere mucha

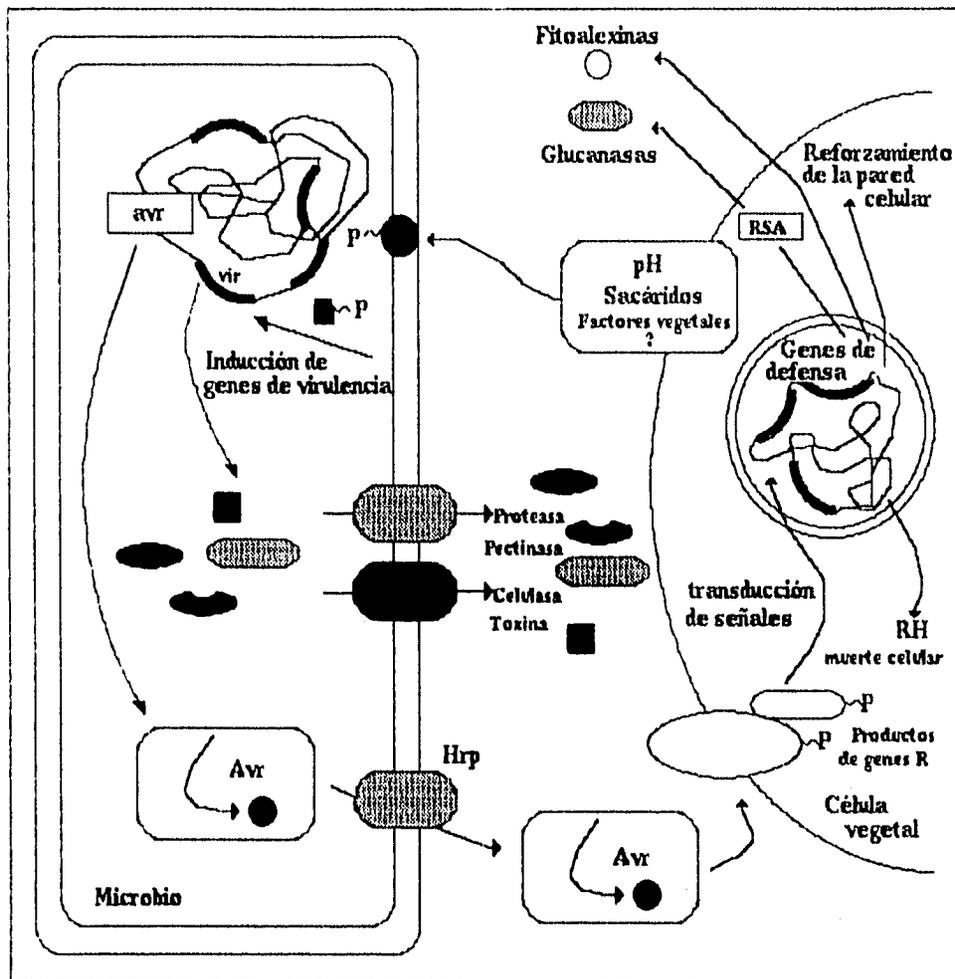


Fig. 2.- Modelo de las interacciones entre hongos patógenos y plantas. El hongo fitopatógeno siente el ambiente vegetal (indicado en la caja que contiene pH, sacáridos y factores vegetales) via un sistema de transducción de señales de dos componentes e induce genes de virulencia (*vir*) (representados por las barras gruesas). La producción y excreción de varios factores de virulencia dañan a la planta y permiten que las hifas del hongo penetren las células vegetales. Son excretados productos de avirulencia (*avr*) por el sistema Hrp (reacción hipersensible y de patogenicidad). Ellos desencadenan la respuesta de defensa de la planta. Los productos de los genes de resistencia vegetal (*R*), detectan las proteínas *Avr*, o los productos de su actividad (representados por la flecha y el círculo negro, respectivamente) e inducen varios mecanismos de defensa: refuerzo de pared celular, respuesta hipersensible (*HR*) y la respuesta sistémica adquirida (*RSA*).

especificidad, varios hongos pueden inducir respuesta en una planta y una sola cepa puede desencadenar el proceso en varios géneros o familias vegetales (30).

La especie fúngica a utilizar depende de la naturaleza del elicitor. Si es un componente de la pared celular de la planta, cualquier cepa con enzimas hidrolíticas que la degraden puede desencadenar la respuesta; si es un componente de la pared de los hongos, ampliamente distribuido en ese reino, como la quitina, cualquier organismo que la tenga desencadena el proceso. Sólo si se trata de un metabolito secundario fúngico o un constituyente restringido a un pequeño grupo de hongos, se necesitarán especies asociadas con la planta.

Los homogenizados de cultivos líquidos de las cepas son la forma más empleada para efectuar pruebas de inducción con sustancias fúngicas. Estos sistemas resultan adecuados cuando los elicitores son componentes insolubles de la pared celular, porque el autoclave destruye enzimas y otros componentes termolábiles del citoplasma. Si se sospecha que alguna de estas moléculas puede ser inductora, un cocultivo puede ser la forma de probarlo (30 y 28).

La concentración del elicitor es un factor que influye fuertemente en la intensidad de la respuesta (7, 30). Usualmente se requieren entre 50 y 100 mg de elicitor para matraces de 250 ml con 50 ml de células en suspensión (10, 11, 22, 26, 33). La cantidad ideal debe determinarse experimentalmente en cada caso.

La síntesis de sustancias relacionadas con la defensa ocurre sólo cuando se tiene el ambiente adecuado (disponibilidad de precursores y condiciones de cultivo favorables). Los reguladores de crecimiento, en particular las auxinas, tienen influencia en el proceso, también lo afectan las condiciones del cultivo, como la iluminación, el pH y la temperatura. No obstante su efecto obvio, no existen estudios sobre el impacto del medio de cultivo sobre el sistema (26, 30). Puede considerarse el empleo de precursores para aumentar rendimientos, en tal caso tendrá que determinarse, si es permeable, si se incorpora al producto deseado y cuál es la concentración correcta.

El conocimiento del tiempo ideal de tratamiento es un factor valioso para optimizar rendimientos. El periodo mínimo de contacto para que el reconocimiento ocurra entre la planta y el elicitor, es muy breve (50), bastan 2 minutos en el frijol y cerca de 20 minutos en el perejil (39). El efecto resulta además duradero. Horas después de que el sistema es inducido se presenta el incremento de la actividad biosintética, la acumulación máxima ocurre entre las 12 horas y los cinco días de tratamiento y generalmente declina rápidamente después de que alcanza su valor

más alto. Retroinhibición puede llevar a la acumulación de un producto final seguida de incremento en el nivel de los precursores.

Una vez que el proceso de síntesis de sustancias relacionadas con la defensa ha sido inducido, estímulos adicionales no aumentan rendimiento. El mayor incremento en la producción de metabolitos secundarios por cultivos elicitados, se ha obtenido en líneas celulares con baja productividad inicial (por eso resultan más adecuadas para probar el efecto elicitor de una sustancia), pero al final los niveles de síntesis se parecen mucho en todas las líneas celulares de una misma planta (30, 42). Al parecer, la cantidad máxima de un metabolito que pueden almacenar las células, está fuertemente regulada.

La etapa de crecimiento en la cual es elicitado el cultivo tiene influencia sobre la respuesta. A diferencia de los cultivos sin tratar, no se presenta mayor producción en la fase estacionaria, sino en la exponencial, cuando las células están en crecimiento activo (30).

c.- Aspectos bioquímicos del proceso de inducción

Las plantas utilizan un sistema de señales específicas para detectar la presencia de un patógeno. Se establece una complicada red de interacciones bioquímicas entre diferentes elicitores y otros factores regulatorios. Estas señales son muy flexibles, dependiendo del contexto biológico, desencadenan una respuesta de defensa (1, 6, 15). La expresión de genes inducida por elicitores es compleja. Ocurre inducción coordinada de enzimas a nivel transcripcional y traduccional, pero cada enzima es estimulada en forma diferencial (7, 10). Al final se ocasiona una respuesta secuenciada tanto local como general (7, 30). La elicitación causa también cambios considerables en el metabolismo celular.

La defensa vegetal descansa en dos estrategias coordinadas: la defensa constitutiva y la defensa activa. La primera se encuentra siempre encendida y la segunda se expresa solamente durante la infección de un organismo patógeno (51).

Las sustancias antifúngicas preinfeccionales son los elementos con que se monta la defensa constitutiva. Con las sustancias preinfeccionales se presentan dos situaciones, pueden encontrarse en altas concentraciones antes del ataque de un patógeno, o bien, presentarse en bajas concentraciones antes de la infección y en altas concentraciones después. A estas últimas se les conoce como inhibitinas. Las sustancias constitutivas de bajo peso molecular: toxinas

antimicrobianas, compuestos fenólicos, taninos, diterpenos, alcaloides y saponinas, suelen ser poco específicas y predominan en un tipo de tejido en particular. Los compuestos antifúngicos de alto peso molecular se encuentran en el exterior de las células, son componentes poliméricos de la cutícula y la pared celular, lectinas y enzimas con actividad endopoligalacturonasa (8, 51).

Cuando se percibe daño físico o presencia de microorganismos, en los tejidos vegetativos de las plantas se disparan una serie de mecanismos dinámicos en tres líneas de defensa (39, 67).

La primera línea de defensa es una respuesta instantánea, su finalidad es fortificar la pared celular. En y alrededor de la lesión local se forma una cápsula por depósito de nuevos materiales (calosa, lignina, y fenoles) y por entrecruzamiento de proteínas preexistentes (4, 30, 39, 55 y 67).

La segunda línea de defensa se da a nivel local, en la zona que rodea el sitio de infección, la velocidad de respuesta es intermedia. Su finalidad es la producción de proteínas relacionadas con la defensa (PR) y la síntesis de sustancias antimicrobianas que estorben el crecimiento de micelio e impidan que la invasión avance a otras células.

Reunidas, la primera y segunda líneas de defensa forman lo que se conoce como respuesta hipersensible (39, 67). Las células vegetales que la generan mueren por efecto de los invasores o por la toxicidad de las fitoalexinas que producen.

Las toxinas antimicrobianas postinfeccionales pueden dividirse en dos categorías: las que preexisten en la planta de forma inactiva y son activadas o liberadas después de la invasión microbiana, y un segundo grupo que comprende a las sustancias que son sintetizadas de *novo* por la planta, sólo bajo las condiciones de estrés causadas por el ataque microbiano. Estas moléculas reciben el nombre de fitoalexinas (26, 51).

Las distintas especies de plantas han desarrollado diferentes soluciones químicas para el mismo problema biológico y por eso pueden producirse varias sustancias cuando se hace interaccionar especies diferentes con el mismo patógeno. La estructura química de las fitoalexinas difiere grandemente de acuerdo con la familia de la planta y a veces con el género. Son sintetizadas por una de estas tres rutas metabólicas: acetato-malonato, acetato-mevalonato y shikimato (8, 9, 26, 73). Algunos de estos compuestos secundarios desempeñan más de un papel en la supervivencia de un vegetal, por eso pueden ser inducidos

por otros tipos de estrés como luz U.V.(32). En la defensa local de la planta, las fitoalexinas actúan como retardantes de crecimiento de las hifas o como inhibidores de enzimas hidrolíticas fúngicas (55). En general, son varias las fitoalexinas que produce un vegetal (11, 49), porque se acumulan metabolitos secundarios derivados de diferentes puntos de ramificación de la ruta metabólica.

La tercera línea de defensa es una respuesta lenta, adicional, conocida como resistencia sistémica adquirida. Es una respuesta amplia, se da en órganos e incluso en todo el vegetal. Su finalidad es la activación de genes para desencadenar la aparición de enzimas hidrolíticas específicas, que actúan sobre las paredes fúngicas, típicamente quitinasas y 1,3 B-glucanasas (30, 39, 55, 67).

La transducción de señales en los sistemas elicitados responde a un modelo con dos elementos, un componente unido a la membrana de la planta sirve como molécula sensitiva (receptor del elicitor), un segundo componente actúa como molécula reguladora y activa la transcripción (58).

La detección en un receptor de membrana de la presencia de un elicitor desencadena cambios en la naturaleza de la membrana plasmática, incrementa la permeabilidad a los iones, entran H^+ y Ca^{2+} y salen K^+ y Cl^- (68). Aumenta la demanda de oxígeno y se genera poder reductor.

El ácido linolénico es liberado en respuesta a la alteración en los canales iónicos de la membrana (el ácido linolénico es uno de los ácidos grasos más abundante de la membrana de la mayoría de las plantas). Una vez libre, el ácido linolénico es convertido en ácido jasmónico por un proceso dependiente de una lipooxigenasa, a través de la ruta octadecanoide y después el ácido jasmónico induce los genes específicos de proteínas relacionadas con la defensa (PR) (17).

La fosforilación regulada por señales fisiológicas intracelulares: ATP, AMPc, y adenilación (57), juega un papel muy importante en la transducción de señales del elicitor (39). La actividad quinasa aumenta el factor de unión con DNA y estimula a fosfolipasas que liberan ácido linolénico, quedando este disponible para ser convertido en ácido jasmónico (24).

El ácido salicílico (SA) desempeña un papel principal en la defensa de las plantas contra patógenos, porque también actúa como segundo mensajero. Se encuentra normalmente en las células una forma inactiva de almacenamiento, el SA B- glucosido. Cuando se detecta en la membrana la presencia de un elicitor, el SA toma su forma activa y se une a la enzima catalasa, a la que inhibe, como

consecuencia se acumula H_2O_2 , el cual induce la transcripción del gen PR-1, la proteína producida, induce a su vez la resistencia sistémica y la local (25, 39, 57).

IV.- OBJETIVOS

1.- General

- Determinar si es posible aumentar la producción de piquerol en cultivo de células en suspensión de *Piqueria trinervia* Cav., por interacción con diferentes elicitores fúngicos.

2.- Específicos

- Obtener cultivo de células en suspensión de *Piqueria trinervia* Cav.
- Aislar sustancias fúngicas con acción elicitora sobre la planta.
- Purificar las sustancias sintetizadas *de novo* en el cultivo en suspensión elicitado.
- Establecer la naturaleza química del elicitor.

V.- MATERIALES Y METODOS

1.- Estrategia desarrollada

Las actividades realizadas para alcanzar los objetivos planteados se cubrieron en cuatro etapas (ver fig 3): estudios de germinación, establecimiento de cultivo de células en suspensión, aislamiento de elicitors fúngicos y pruebas de interacción de los elicitors con los cultivos en suspensión de la planta.

El material vegetal con el que se trabajó se generó a partir de semillas germinadas en condiciones asépticas, lo que condicionó la necesidad de conocer, antes que nada, las condiciones óptimas de germinación de la especie.

En la segunda etapa se trabajó en la obtención de cultivos de callo friables y de rápido crecimiento, que presentaron un patrón de síntesis de metabolitos secundarios similar al de la planta silvestre. A partir de ellos, se estableció un cultivo de células en suspensión, del cual se obtuvo la cinética de crecimiento.

Posteriormente, se estandarizaron las técnicas para la medición y purificación de piquero a partir de extractos de la planta silvestre y de células en cultivo sólido y líquido.

En la tercera etapa, se aislaron del campo, especies de hongos asociados con la planta, se purificaron y obtuvieron cepas monospóricas. Se hicieron con ellas, pruebas de patogenidad sobre callos y plantas cultivadas. Se trabajó en la determinación de los hongos y en la estandarización de cultivos sólidos y líquidos y se obtuvo la cinética de crecimiento en medio sólido.

En la cuarta etapa se montaron experimentos de interacción de la planta con los elicitors para determinar el efecto de la presencia de estas sustancias sobre la producción de piquero y otros metabolitos secundarios. Se desarrollaron las técnicas para purificar las posibles fitoalexinas en el sistema inducido con elicitors y se hicieron pruebas químicas para intentar dilucidar su estructura química. Se montaron experimentos para deducir la naturaleza de la molécula inductora. Se determinó la cantidad de micelio seco necesario para desencadenar la respuesta hipersensible, por gramo de peso fresco de callo inoculado y se hizo una curva de producción de las sustancias sintetizadas *de novo*.

Por último, se probó el efecto de varios metabolitos secundarios de la planta (piquero, trinervinol, extracto crudo de la planta silvestre y posibles fitoalexinas) sobre el crecimiento de las cepas de hongos con los que se trabajó.

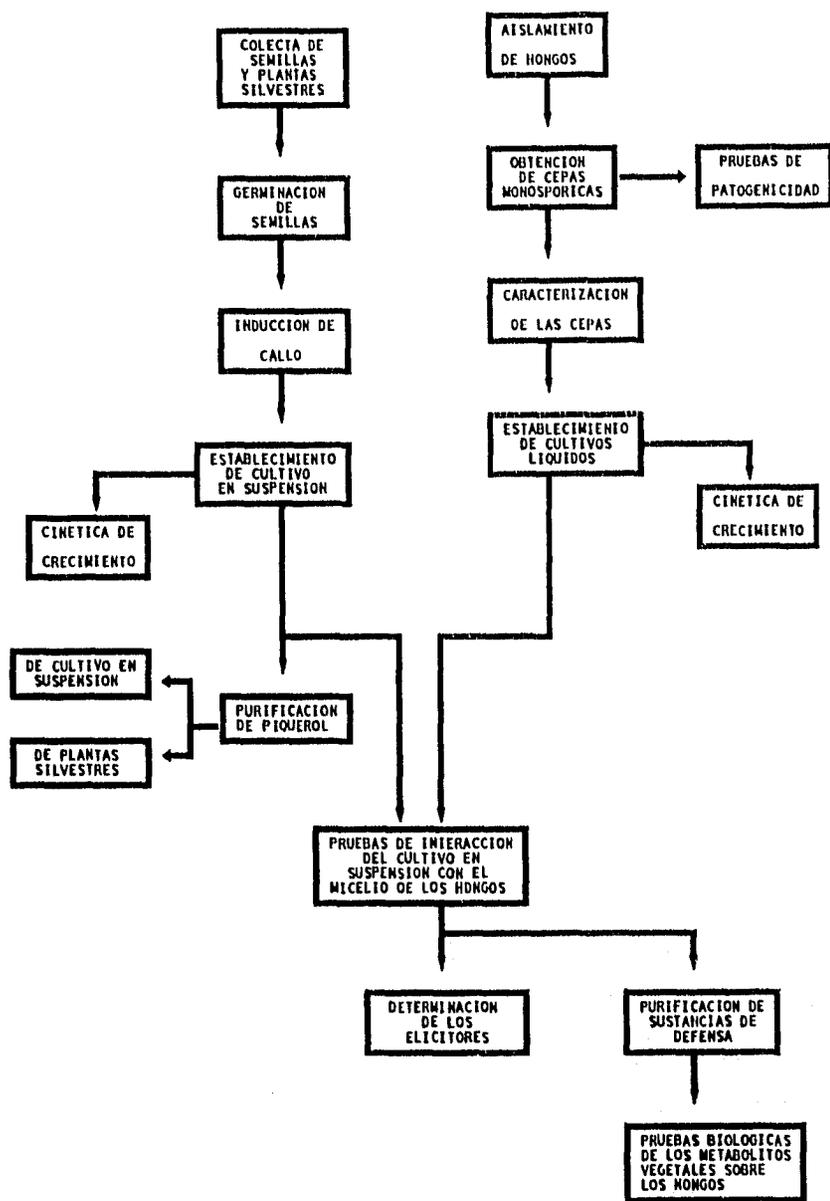


FIG. 3.- ESTRATEGIA DESARROLLADA

2.- Material biológico

Todo el material vegetal empleado de *Piqueria trinervia* Cav. en este trabajo: semillas, para todos los cultivos asépticos, plantas para la extracción de piquerol, hojas y raíces infectadas con hongos, provienen de las poblaciones localizadas en la Serranía del Ajusco. Específicamente en el bosque de pino-encino localizado sobre la carretera Picacho-Ajusco, a la altura del sitio conocido como "La Virgen". Las semillas fueron colectadas en noviembre de 1993 y en febrero de 1995.

3.- Medios de cultivo

En todos los cultivos vegetales realizados durante esta investigación se empleó el medio básico Murashige y Skoog (MB), al cual se le agregaron distintas concentraciones de hormonas, en los diferentes experimentos efectuados. La composición del medio se detalla en la tabla 1. En todos los casos, se ajustó el pH del medio a 5.7 con HCl y KOH 1N y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 1.5 kg/cm² de presión.

Los cultivos sólidos de hongos se hicieron con el medio Papa Dextrosa Agar (PDA), preparado de la siguiente manera: 200g de papa pelada se rebanan y lavan varias veces con agua corriente, se hierven en 500 ml de agua destilada, durante 15 minutos a 1.5 kg/cm² de presión, después el agua se filtra con una malla de acero inoxidable de 200 mesh y se le adicionan 14g de dextrosa y 16 g de agar, la mezcla se afora a un litro con agua destilada y se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 1.5 kg/cm² de presión. Cuando el medio alcanza alrededor de 45°C, se vierte en cajas petri (aproximadamente 25 ml por caja), bajo condiciones estériles.

Los cultivos líquidos de hongos se hicieron con el mismo medio, pero sin agar, preparado de la forma antes descrita, en este caso se vertieron 50 ml de medio en matraces Erlenmayer de 250 ml.

4.- Germinación

Para determinar los factores que limitan la germinación de las semillas de la planta, se estudió el efecto de la iluminación (luz y oscuridad), tiempo de desinfectación (20 y 25 minutos), estratificación (0, 4 y 6 meses a 4°C) y temperatura (25, 20 y 17°C), sobre el porcentaje de germinación.

TABLA 1.- COMPOSICION DEL MEDIO NUTRITIVO MURASHIGE-SKOOG (1962)¹

MACRONUTRIENTES		MICRONUTRIENTES	
SALES	mg/l	SALES	mg/l
H ₂ NO ₃	1650	H ₂ BO ₃	6.2
KNO ₃	1900	MnSO ₄ * 4H ₂ O..	22.3
CaCl ₂ * 2H ₂ O...	440	ZnSO ₄ * 4H ₂ O..	8.6
MgSO ₄ * 7H ₂ O...	370	KI.....	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA.....	37.3	CuSO ₄ * 5 H ₂ O..	0.025
FeSO ₄ * 7H ₂ O...	27.8	CoCl ₂ * 6 H ₂ O..	0.025
CONSTITUYENTES ORGANICOS			
SACAROSA	30 g/l	L-GLICINA	2 mg/l
AGAR	9 g/l	TIAMINA * HCl	0.1 mg/l
MIOINOSITOL	100 mg/l	PIRIDOXINA * HCl.....	0.5 mg/l
		ACIDO NICOTINICO	0.5 mg/l

¹ pH AJUSTADO A 5.7 CON KOH Y HCl 1N.

Las semillas se desinfectaron con el siguiente procedimiento: se lavaron en una solución jabonosa y se enjuagaron con abundante agua corriente, después de lo cual se introdujeron en alcohol al 96% por un minuto, para pasar a una solución de hipoclorito de sodio al 2.4 % y Tween al 0.1%, durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se removió la solución bajo condiciones estériles y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril. Las semillas quedaron así listas para pasar a los medios de cultivo.

Se aplicó un diseño completamente al azar, con submuestras. Se colocaron 30 semillas en cajas de petri que contenían 25 ml de medio básico sólido. Se trabajó con 8 repeticiones por cada uno de los tratamientos mencionados. Se evaluó la respuesta después de 4 semanas, por el porcentaje de semillas germinadas. El porcentaje se determinó para cada caja, se obtuvo promedio de las repeticiones y se calculó desviación estándar. Se aplicó análisis de varianza.

5.- Inducción de callo

Para la inducción de callo se empleó un diseño completamente al azar con submuestras, se utilizaron frascos gerber que contenían 25 ml de medio sólido, se colocaron 5 explantes por frasco y se hicieron 8 repeticiones por tratamiento. Los frascos se mantuvieron a fotoperiodo largo (16 horas luz/ 8 horas oscuridad) bajo una iluminación de (0.01 watt/m²), en cámaras de incubación a 25 °C. Los explantes se obtuvieron de plantas germinadas *in vitro*, de 2 meses de edad. La respuesta se evaluó después de cinco semanas de tratamiento por: la frecuencia de respuesta, biomasa, friabilidad, aspecto (color) y producción de piquero. El porcentaje de respuesta y la biomasa se calcularon para cada uno de los frascos, se obtuvo el promedio de las repeticiones y se determinó la desviación estándar.

En primera instancia se probó el efecto de dos concentraciones de cinetina, 1 mg/l y 3 mg/l, sobre la inducción de callo. Se emplearon como explantes hojas, entrenudos y tallos con nudo.

Posteriormente se trabajó con siete tratamientos, para probar el efecto de dos auxinas (2,4-D y AIA) en diferentes concentraciones y una concentración de citocinina sobre la inducción de callo. Los tratamientos fueron: MB más 1 mg/l de 2,4-D; MB con 1mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina; MB con 2mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina; MB con 3 mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina; MB con 1 mg/l de AIA y 0.2 mg/l de cinetina; MB suplementado con 2mg/l de AIA y 0.2 mg/l

de cinetina y MB con 3 mg/l de AIA y 0.2 mg/l de cinetina. Se emplearon como explantes entrenudos

Por último se probó el efecto de diferentes concentraciones de otra citocinina, BAP, en combinación con una concentración de ANA, sobre la inducción y producción de callo. Para lo cual se probaron seis tratamientos: MB suplementado con 1 mg/l de ANA y 0.1 mg/l de BAP; MB con 1 mg/l de ANA y 0.5 mg/l de BAP; MB suplementado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP; MB más 1 mg/l de ANA y 2 mg/l de BAP y MB con 1 mg/l de ANA y 5 mg/l de BAP. Se utilizaron como inóculo entrenudos. Una vez que se estableció cual era el tratamiento que daba la mejor respuesta, se probaron en otros explantes: hoja, raíz.

6.- Cultivo de células en suspensión

a.- Establecimiento

Se ocuparon callos de 6 semanas, crecidos en medio sólido. Se estableció cultivo de células en suspensión con los callos obtenidos con MB adicionado con 3 mg/l de AIA y 0.2 mg/l de cinetina y con MB suplementado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP. Los callos se fraccionaron finamente, con ayuda de un bisturí, en cajas de petri estériles y después se agregaron entre 2 y 3 g de callo a matraces Erlenmayer de 250 ml que contenían 50 ml de medio líquido. Para cada tipo de callo se emplearon tres medios diferentes: el mismo medio en el cual fue inducido el callo; un medio con la misma composición que el anterior, pero con la concentración de macronutrientes reducida a un 75%; y el medio de inducción de callo, pero con 2% de sacarosa. Los matraces se mantuvieron a 25 °C, en agitadores orbitales a 100 rpm, bajo condiciones de iluminación. La respuesta se evaluó después de cuatro semanas por la apariencia de las células, crecimiento y capacidad de establecimiento del cultivo en el medio líquido.

b.- Cinética de crecimiento

Se determinó la cinética de crecimiento del cultivo en medio líquido adicionado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP, por la medida de cuatro parámetros diferentes: peso fresco, peso seco, paquete celular y concentración de proteínas por gramo de peso fresco de callo. Para lo cual, se sembraron el mismo día, todos los matraces necesarios, con 2g de callo crecido en cultivo sólido. Las mediciones

se hicieron cada cinco días, hasta el día 30 de cultivo. Para peso fresco, peso seco, y paquete celular se ocupó el contenido celular total por matraz y se calculó el promedio de tres matraces. La medida del paquete celular se obtuvo centrifugando tubos de ensayo graduados, de 50 ml, a 5000 rpm durante 15 minutos. La concentración de proteínas se obtuvo con la técnica de Lowry, aplicada a 100 μ l de muestra, tomados de una solución de 100 mg de callo en 2.4 ml de agua destilada. Se tomó una muestra de tres matraces y se hicieron tres repeticiones de cada una. Se hizo una curva patrón con albúmina empleando concentraciones entre 12.5 y 100 μ g/ml.

7.- Extracción y medición de piquero

a.- Extracción de piquero de cultivos líquidos

Se hicieron mediciones periódicas de la concentración de piquero en el cultivo líquido, midiendo cada cinco días el contenido total de tres matraces por separado. Las mediciones se hicieron hasta el día 25 de tratamiento, tanto en las células como en el medio de cultivo. Se determinó la presencia de piquero en cromatografías de placa fina y en cromatógrafo de gases.

Para extraer el piquero de las células, se filtró el contenido de un matraz a través de una malla de acero inoxidable de 200 mesh. El medio se saturó con NaCl y se hizo una extracción con cloroformo en un embudo de separación, al cloroformo recuperado se le adicionó un poco de Na_2SO_4 para eliminar humedad y se concentró en un rotavapor a 60 °C. Las células filtradas se secaron con papel absorbente y se maceraron en un mortero, después se cubrieron con cloroformo y se agitaron durante 15 minutos con un agitador magnético, el cloroformo se filtró, la operación con cloroformo se repitió dos veces más, el cloroformo recuperado se secó con un poco de Na_2SO_4 y se concentró en un rotavapor.

Para las cromatografías de placa fina se agregó después a todos los extractos 0.5 ml de CH_2Cl_2 . Las cromatografías se corrieron en silica gel como fase estacionaria y con una mezcla de hexano-acetato de etilo 7:3, como fase móvil. Las placas se revelaron con CeSO_4 disuelto en ácido sulfúrico.

b.- Extracción de piquero de plantas silvestres

Las plantas se dejaron secar, se separaron hojas y flores. 400g de este material se empacó en una columna de vidrio, y se le agregó el agua destilada necesaria

para cubrirlo. Después de dos días el agua se recuperó. Se hicieron dos extracciones con agua y cada una se trabajó por separado. El agua recuperada se saturó con NaCl, se retiró el exceso de sal por filtración; el líquido se pasó a un embudo de separación, donde se le hicieron tres extracciones con CH₂Cl₂; al cloruro de metileno recuperado se le adicionó un poco de Na₂SO₄ para retirar vestigios de agua; después de filtrar se destiló la muestra; en el extracto recuperado cristalizó una sustancia. Transcurridos 8 días, se filtraron los cristales y se lavaron primero con hexano y después con cloruro de metileno fríos. Para comprobar que los cristales aislados eran piqueroles se hicieron cromatografías de placa fina y estudios de resonancia magnética nuclear.

8.- Cepas fúngicas

a.- Aislamiento

Se colectaron hojas, raíces y flores de *Piqueria trinervia* aparentemente infectados. Se observó el material colectado al microscopio estereoscópico para descartar las plantas dañadas por los insectos. Los órganos aparentemente enfermos, fueron fraccionados en porciones de 0.5 cm², se lavaron con una solución jabonosa y se enjuagaron con abundante agua corriente; posteriormente se desinfectaron, en condiciones asépticas, con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante 2 minutos; después se lavaron con agua destilada y se secaron con papel secante estéril; se sembraron cuatro fragmentos en cajas petri con medio nutritivo (PDA). Las cajas se incubaron en la oscuridad, a 25 °C, durante 4 días. Transcurrido este tiempo se aislaron colonias individuales en nuevas cajas con medio nutritivo. Luego de una semana o semana y media de incubación en la oscuridad, los hongos se expusieron a la luz para estimular el desarrollo de esporas.

b.- Obtención de cepas monospóricas

Se agregaron 2 ml de agua estéril a cajas de cultivo que habían sido expuestas a la luz y que contenían esporas. Se enjuagó la superficie del micelio y se retiró el agua. Se tomaron 0.5 ml de esa suspensión y se esparcieron homogéneamente (con ayuda de una barra de vidrio doblada), en la superficie del medio de otra caja petri. Las cajas se mantuvieron en las condiciones antes descritas hasta que las esporas germinaron (2 ó 3 días después), entonces se tomó una porción de

micelio de una de las colonias y se subcultivó en otra caja con medio nutritivo. Luego de 8 ó 12 días más, se obtuvieron colonias monospóricas.

c.- Preparaciones semipermanentes de micelio

Para observar los hongos al microscopio se tomaron porciones de hongo con ayuda de una cinta adhesiva transparente, primero se montaron con agua para notar estructuras naturalmente teñidas. Se hicieron preparaciones semipermanentes, también con ayuda de una cinta adhesiva, montadas con una solución de lactofenol. Esta solución se preparó con los siguientes ingredientes: 20 g de fenol, 20 g de ácido láctico, 40 g de glicerina y 20 g de agua destilada, floxina al 0.05 % y cristales de carmín al 0.01 %.

d.- Curvas de crecimiento

El crecimiento de los hongos en medio sólido se midió por la longitud del radio de la colonia. Para que el centro de la colonia fuera fácil de determinar, se inoculó una porción muy pequeña de micelio hecho ovillo, en el centro de la caja de petri. Se sembraron tres cajas de cada cepa y se hicieron mediciones diarias. Se manejaron 3 repeticiones para cada hongo. Se graficó el radio de la colonia contra tiempo y se hicieron los cálculos cinéticos.

e.- Cultivos líquidos

Se establecieron cultivos líquidos de hongos con dos medios: MB suplementado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP y PDA. En ambos casos, se adicionaron dos segmentos de micelio de 1 cm² a un matraz Erlenmayer de 250 ml que contenía 50 ml de medio. La respuesta se evaluó después de una semana de tratamiento.

Las curvas de crecimiento en medio líquido se determinaron por peso fresco y seco de la biomasa total de un matraz, con tres repeticiones por medición. Se hicieron mediciones diarias durante 7 días.

f.- Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se hicieron en tres sistemas diferentes: callo, brotes y plantas cultivadas. En el primer caso, se colocaron en el centro de los frascos con medio nutritivo, porciones de callo de entre 3 y 5 g. Se dejó que los cultivos crecieran y se aclimataran durante diez días. Transcurrido este lapso, se colocó una porción de 1 cm² de micelio sobre el callo y se dejó que el hongo

creciera e interaccionara con las células del callo durante 15 días. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento.

En el caso de los brotes, se trabajó con plantas obtenidas *in vitro*, ya enraizadas, pero todavía contenidas en frascos con medio nutritivo soportado por vermiculita. Se colocaron porciones de agar con micelio de 1 cm² sobre tres hojas de cada planta, se hicieron dos repeticiones por hongo. Se dejó interaccionar a la planta con el hongo durante quince días. Transcurrido este plazo se localizaron porciones de hoja que tuvieran evidencias de haber sido invadidas por el hongo.

En las plantas cultivadas se colocaron porciones de agar con micelio de 1 cm² en el envés de tres hojas de cada planta. Las plantas se cubrieron con bolsas de plástico para evitar la pérdida acelerada de humedad del micelio. En cada planta sólo se probó una cepa fúngica. Se dejó que el micelio interaccionara con la planta durante quince días. Después de este tiempo se localizaron hojas infectadas con hongo y se aisló al agente causal con el procedimiento antes detallado.

g.- Pruebas de metabolitos de la planta sobre los hongos

Se probó el efecto del piquero, del trinervinol, del extracto crudo de las plantas silvestres, el nuevo monoterpeno y la fracción polar extraída con cloroformo de los cultivos elicitados, sobre el crecimiento de los hongos. 100 mg de la sustancia a probar se disolvieron en 2 ml de alcohol absoluto y se filtraron (con filtros Millipore) en 1 l de medio PDA previamente esterilizado y tibio (alrededor de 55 °C). Se midió diariamente el crecimiento radial de las colonias (3 para cada hongo) y se comparó con dos testigos: tres colonias crecidas en PDA y tres colonias crecidas en PDA con alcohol absoluto (2ml/l).

9.- Interacción planta-elicitors

a.- Preparados de hongos

En los experimentos de interacción se utilizaron dos tipos de preparados con hongos: de micelio fresco y de micelio seco. Las preparaciones de micelio fresco se hicieron de la siguiente manera: el contenido de un matraz se filtró a través de mallas de acero inoxidable de 200 mesh y se lavó primero con agua destilada y después con acetona, se secó con papel absorbente y se maceró en un mortero; se pesaron porciones de 200 mg de micelio en tubos de ensayo donde se

agregaron 5 ml de agua destilada. Los tubos se esterizaron durante 20 minutos, en autoclave a 1.5 kg/cm² de presión.

Para obtener micelio seco se procedió de la siguiente forma: se filtró el micelio, se lavó con agua destilada y después con acetona y se secó con papel absorbente. Se colocaron sobre papel aluminio (en cajas petri sin tapar), porciones de entre 3 y 5 g de hongo. Las cajas permanecieron durante 4 ó 5 días, en una estufa de secado, a 55 °C. Una vez que el micelio se secó y se molió finamente en un mortero, se pesaron porciones de 20 mg del hongo seco y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 5 ml de agua destilada. Los tubos se esterizaron en autoclave durante 20 minutos, a 1.5 kg/cm² de presión.

b.- Experimentos de Interacción

Se fraccionaron 2 g de callo crecido en MB sólido adicionado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP y se agregó a matraces Erlenmayer que contenían 50 ml del mismo medio líquido; se dejó que las células se aclimataran y crecieran durante cuatro días; transcurrido este tiempo, se adicionó una preparación de hongo por matraz y se permitió que las células vegetales y las sustancias del micelio interactuaran durante tres días y entonces se hizo la extracción de las fitoalexinas. Las células y el medio de cultivo se trabajaron con cloroformo, de la misma forma que para la extracción de piquero. Para las cromatografías de placa fina se agregó después a todos los extractos 0.5 ml de CH₂ Cl₂.

c.- Cromatografía de placa fina

Las cromatografías se corrieron en sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil se usaron dos soluciones; una mezcla de hexano-acetato de etilo 7:3, para separar los terpenos y una mezcla de acetato de etilo-metanol 9:1, para las sustancias más polares. Las placas se observaron con luz ultravioleta y se revelaron con CeSO₄ disuelto en ácido sulfúrico.

d.- Purificación de sustancias sintetizadas *de novo*

Se usó una columna de sílica gel de 12 cm de largo y 2.5 cm de diámetro, se adicionó en la parte superior de la columna una muestra de 300 mg de del extracto crudo obtenido con cloroformo, mezclado con un poco de sílica gel. Se eluyeron primero con una mezcla de hexano-acetato de etilo 9:1 y 8:2, las sustancias más hidrofóbicas; los terpenos salieron con la mezcla de hexano-

acetato de etilo 7:3; otro compuesto eluye con acetato de etilo; y los dos más polares con una mezcla de acetato de etilo-metanol 8:2. Los dos terpenos formaron cristales cuando se evaporó la mezcla de solventes.

VI.-RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Germinación

En los diez tratamientos probados se presentó germinación de semillas, pero el porcentaje de germinación fue distinto (tabla 2). La eficiencia de germinación fue aumentando en la medida que se conocieron mejor los requerimientos de la planta para germinar. Lo primero que saltó a la vista fue que las semillas no necesitaban escarificación mecánica para germinar, pues sin este tratamiento, se obtuvieron desde el primer intento buenas respuestas. La ausencia de iluminación disminuyó sensiblemente la germinación y el tiempo de desinfección influyó negativamente sobre ella, la exposición más prolongada al hipoclorito de sodio dañó a las semillas. No se redujo aún más el tiempo de desinfección porque entonces la contaminación aumenta sensiblemente. La estratificación (tratamiento a bajas temperaturas) aumentó la respuesta de las semillas cuando fue más prolongada. La temperatura a la cual se mantuvieron las semillas durante la germinación también tuvo efecto sobre el porcentaje de germinación, pero donde su influencia fue más notoria, fue en la velocidad de germinación, puesto que con la temperatura más baja (17 °C), el tiempo de respuesta se redujo a la mitad (de 15 a 7 días). Reuniendo todas las condiciones antes señaladas obtuvimos un porcentaje de germinación del 96%, que es muy alto para tratarse de una planta silvestre.

Los resultados obtenidos no sorprenden, puesto que reflejan la adaptación de la planta al ambiente en que normalmente se encuentra -bosque mesófilo de montaña- (40). Las condiciones con que se obtuvo la máxima germinación, se parecen mucho a las que una semilla de la planta encuentra en el sitio donde se colectaron. La luz suele ser un factor limitante de germinación en los bosques; la exposición prolongada a bajas temperaturas evita que las semillas germinen a destiempo; y las enzimas responsables del proceso, deben ser más eficientes a las temperaturas que normalmente se encuentran en el lugar. El periodo de incubación necesario a bajas temperaturas (6 meses), coincide con el que las semillas reciben en forma natural en El Ajusco. Desde noviembre, cuando las semillas maduran, hasta principios de mayo, cuando llegan las primeras lluvias.

TABLA 2.- TRATAMIENTOS Y CONDICIONES DE GERMINACION DE LAS SEMILLAS DE Piqueria trinervia Cav.¹

LUZ	TIEMPO DE DESINFESTACION ² (MIN)	ESTRATIFICACION ³ (MESES)	TEMPERATURA DE GERMINACION (°C)	% DE GERMINACION ⁴
-	20	2	25	58 ± 9
+	20	2	25	80 ± 3
+	25	2	25	45 ± 10
+	20	2	25	33 ± 9
+	20	-	25	55 ± 11
+	20	4	25	44 ± 10
+	20	6	25	76 ± 6
+	20	6	25	81 ± 4
+	20	6	20	93 ± 3
+	20	6	17	36 ± 6

¹ LAS UNIDADES EXPERIMENTALES FUERON CAJAS PETRI CON 30 SEMILLAS, SE HICIERON OCHO REPETICIONES POR TRATAMIENTO.

² SE EMPLEO UNA SOLUCION DE HIPOCLORITO DE SODIO AL 2.4 % Y TWEEN AL 0.1%

³ LAS SEMILLAS PERMANECERON EN REFRIGERACION A 4 °C.

⁴ SE CALCULO EL PROMEDIO DE LAS OCHO REPETICIONES Y SE CALCULO DESVIACION ESTANDARO.

2.- Inducción de Callo

En primera instancia se intentó inducir callo usando los dos medios reportados como más eficientes, para este fin, en trabajos anteriores con esta planta (62): MB adicionado con 1 mg/l de cinetina y MB con 3 mg/l de cinetina. Se emplearon como explantes hojas jóvenes (de 2 meses) y entrenudos de la misma edad. En ambos casos, el tejido se oxidó excesivamente y no presentó ningún tipo de crecimiento. Se decidió probar con otro explante: porciones de tallo con nudos, lo que dio por resultado la aparición de brotes en los dos tratamientos. Las plantas que se originaron de esta forma resultan mucho más vigorosas que las que se obtuvieron germinando semillas *in vitro* y su tasa de crecimiento fue mucho mayor. En el tratamiento con 3 mg/l de cinetina, se obtuvieron más brotes que en el que empleó 1 mg/l de cinetina (ver tabla 3), pero fueron más delgados y con hojas menos desarrolladas. El tratamiento con 1 mg/l de cinetina resultó ser una forma muy conveniente de propagación de tejido organizado *in vitro*, cuando se emplea tallo con entrenudo y dos hojas como inóculo, pero no se obtuvo callo con ninguno de los explantes.

La inducción de callo con altas concentraciones de citocininas resulta más bien atípica y sólo se presenta en plantas que de forma natural tienden a formar callo, porque presentan una concentración muy alta de auxinas endógenas. Dado que en el trabajo anterior con esta especie (62), la eficiencia de respuesta reportada fue muy baja y a la luz de los resultados de esta investigación, esta planta no se comporta así.

Fue necesario, en este punto aprovechar las experiencias de inducción de callo en otras dicotiledóneas y en particular, en otras plantas de la familia Asteracea (28). Se decidió emplear sólo tallo como explante porque suele ser el que da mejores resultados, y utilizar medios con concentraciones altas de auxinas y concentraciones reducidas de citocininas (ver tabla 4).

Se probaron dos auxinas (2,4-D y IAA) y una citocinina (cinetina). En todos los tratamientos trabajados se generó callo. Se presentaron diferencias notables entre los callos generados con las diferentes auxinas. Con 2,4-D, el callo fue de lento crecimiento, opaco, de color café o pardo; la mejor respuesta se dio cuando se aplicó 1 mg/l de la auxina, a medida que se aumentó la concentración de esta hormona, los tejidos se oxidaron más y se produjo menos callo. Con el ácido indolacético se generó un callo amarillo, transparente, con buen crecimiento y al

TABLA 3.- EFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE CINETINA SOBRE DIFERENTES EXPLANTES DE Piqueria trinervia Cav.¹

TRATAMIENTO CINETINA (mg/l)	EXPLANTE	RESPUESTA
1	HOJAS	OXIDACION Y MUERTE
1	ENTRENUDO	OXIDACION Y MUERTE
1	TALLO CON NUDO	BROTOS VIGOROSOS CON HOJAS GRANDES
3	HOJAS	OXIDACION Y MUERTE
3	ENTRENUDO	OXIDACION Y MUERTE
3	TALLO CON NUDO	BROTOS NUMEROSOS CON HOJAS PEQUEÑAS

¹ SE EMPLEARON PLANTAS GERMINADAS IN VITRO DE DOS MESES DE EDAD.

TABLA 4.- EFECTO DE 2,4-D Y AIA EN COMBINACION CON CINETINA SOBRE LA INDUCCION DE CALLO EN *P. trinervia*.

TRATAMIENTO		FRECUENCIA DE INDUCCION DE CALLO (%)	ASPECTO DEL CALLO
AUXINA (mg/l)	CINETINA (mg/l)		
2,4-D 1	-	97+3	POCO ABUNDANTE, FRIABLE, ESTRUCTURAS OBLONGAS CON PUNTOS EN EL APICE.
2,4-D 1	0.2	100+1	CRECIMIENTO LENTO, PARDO, FORMA ESTRUCTURAS OBLONGAS CON PUNTOS ROJOS.
2,4-D 2	0.2	83+4	OXIDADO, ESCASO, MUY COMPACTO, DE COLOR CAFE.
2,4-D 3	0.2	69+10	CALLO OXIDADO, COMPACTO, MUY ESCASO DE COLOR CAFE OSCURO
IAA 1	0.2	89+7	CALLO VERDE PARDO, POCO OXIDADO, FRIABLE, ESCASO EN LAS HOJAS.
IAA 2	0.2	91+3	FRIABLE, BUEN CRECIMIENTO, COLOR AMARILLO PARDO, NO HAY OXIDACION.
IAA 3	0.2	100+4	ESPONJOSO, MUY FRIABLE, PARDO AMARILLO, ABUNDANTE.

1 SE UTILIZARON COMO EXPLANTE ENTRENUDOS DE PLANTAS GERMINADAS IN VITRO DE DOS MESES DE EDAD.

2 SE DETERMINO PORCENTAJE DE INDUCCION DE CALLO EN CADA FRASCO Y SE OBTUVO PROMEDIO DE LAS OCHO REPETICIONES Y SE CALCULO DESVIACION ESTANDAR.

contrario del caso anterior, la respuesta mejoró cuando su concentración aumentó.

Aunque con las dos auxinas se obtuvieron frecuencias de aparición de callo del 100 %, el 2,4-D resultó mejor inductor, porque fue más friable y continuó creciendo cuando se subcultivó, lo que no ocurrió con los callos inducidos con IAA, que conforme pasó el tiempo, se oxidaron y detuvieron su crecimiento. No hubo forma de evitar la oxidación, a pesar de que se adicionó ácido ascórbico al medio como antioxidante y se subcultivaron antes de que la respuesta apareciera, ésta se dio y el crecimiento se detuvo. Los problemas de oxidación son frecuentes en cultivos *in vitro* de vegetales que producen muchos fenoles y esta es una característica que la planta presenta, probablemente esa vía metabólica se vea favorecida de alguna forma por la presencia de AIA.

Los callos generados con 2,4-D (sobre todo los de los medios que contenían 1 mg/l) formaron estructuras globulares muy bien definidas, que sugirieron que se trataba de un callo embriogénico. Estos callos presentaban crecimiento sumamente lento y no sintetizaban piquero. Por lo cual, se siguió trabajando en la inducción de callo.

Los resultados obtenidos hasta esta etapa señalaban que el 2,4-D estaba generando callo embriogénico y el AIA no soportaba el desarrollo sostenido de callo. La respuesta del 100 % con las dos auxinas indicaba que era necesaria la presencia de este tipo de reguladores de crecimiento en altas concentraciones. La cinetina, resultó muy buena inductora de crecimiento de brotes y funcionaba más en este sentido que en el de estimuladora de callo. Por eso se decidió intentar con otra auxina y otra citocinina.

Se probó el efecto de ANA (ver tabla 5), en combinación con diferentes concentraciones de BAP. En los seis tratamientos montados se generó un callo de apariencia similar: transparente, blanquizco, verdoso y duro; con generación de pequeños brotes, hojas y algunas raíces. En ningún caso la frecuencia de respuesta llegó al 100%, pero el callo era abundante y con crecimiento rápido y además, sintetizaba piquero.

Las cromatografías de placa fina revelaron la presencia de piquero en todos los callos generados con ANA y BAP, excepto en el tratamiento en que se empleó la concentración más baja de la citocinina. Se seleccionó como la mejor respuesta al tratamiento con 1mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP porque presentó la mejor combinación de biomasa y frecuencia de inducción y porque produjo una

TABLA 5.- EFECTO DE ANA Y DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE BAP SOBRE LA INDUCCION Y CRECIMIENTO DE CALLO EN *Piqueria trinervia*.¹

TRATAMIENTO		FRECUENCIA DE INDUCCION ² DE CALLO (%)	RENDIMIENTO DE CALLO PESO FRESCO/MATRAZ ² (g)	PRODUCCION DE PIQUEROL
ANA (mg/l)	BAP (mg/l)			
1	0.1	75±9	0.4±0.2	-
1	0.5	50±12	2.2±0.8	++
1	1	75±15	3.4±0.9	+++
1	2	25±7	5.5±0.5	+
1	3	62±13	1.4±1.1	+
1	5	25±13	2.6±1.8	+

¹ SE EMPLEARON COMO EXPLANTES ENTRENADOS DE PLANTAS GERMINADAS IN VITRO DE DOS MESES DE EDAD.

² SE DETERMINARON PORCENTAJE DE INDUCCION Y BIOMASA PARA CADA FRASCO, SE OBTUVIERON PROMEDIOS DE LAS OCHO REPETICIONES Y SE CALCULARON LAS DESVIACIONES ESTANDAR.

cantidad de piquero fácilmente detectable en cromatografía de capa fina y en cromatógrafo de gases.

Cuando se utilizaron como explantes porciones de tallo con nudos, la formación de callo fue menos eficiente porque se generaron brotes y sólo creció callo en las regiones que permanecieron en contacto con el medio nutritivo. En cambio, cuando los implantes fueron porciones de tallo sin nudos, la única respuesta fue la formación de callo y éste mostró apariencia más saludable. Esta es una respuesta frecuente en plantas dicotiledóneas, los meristemas laterales al liberarse de la dominancia del meristemo apical generan brotes. Por esto en los experimentos posteriores para la obtención de callo, cuando se trabajó con tallo, se emplearon como inóculo sólo entrenudos.

Una vez elegida la mejor combinación de reguladores de crecimiento, hicimos pruebas con diferentes explantes: entrenudos, hojas jóvenes, raíces y entrenudos de brotes generados *in vitro*. Se presentó inducción de callo con todos los implantes, sin embargo, la respuesta fue distinta en cada caso. Con las hojas el crecimiento fue limitado a una pequeña capa en la superficie, que después de 2 semanas detuvo su crecimiento y se oxidó. Utilizando brotes, la frecuencia de aparición de callo disminuyó mucho (50%) y aumentaron las respuestas aberrantes (crecimiento sobre el callo de raíces y hojas deformes). Las raíces resultaron un buen inóculo, con frecuencias de respuesta de 90% y crecimiento rápido. A pesar de esto no fueron consideradas el mejor explante porque en las plantas germinadas *in vitro* las raíces son muy pequeñas y poco desarrolladas, por tanto, se requieren cerca de 30 plantas para tener raíz suficiente para 2 ó 3 frascos. En cambio, la eficiencia mejoró notablemente cuando se emplearon como explante sólo los entrenudos de plantas germinadas *in vitro* llegando a valores mayores a 90% de inducción de callo. En la mayoría de los casos (70%), estos callos resistieron el subcultivo en medio sólido y siguieron creciendo. Todo el callo que trabajamos en adelante, fue generado en MB con 1mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP a partir de entrenudos.

3.- Cultivo de células en suspensión

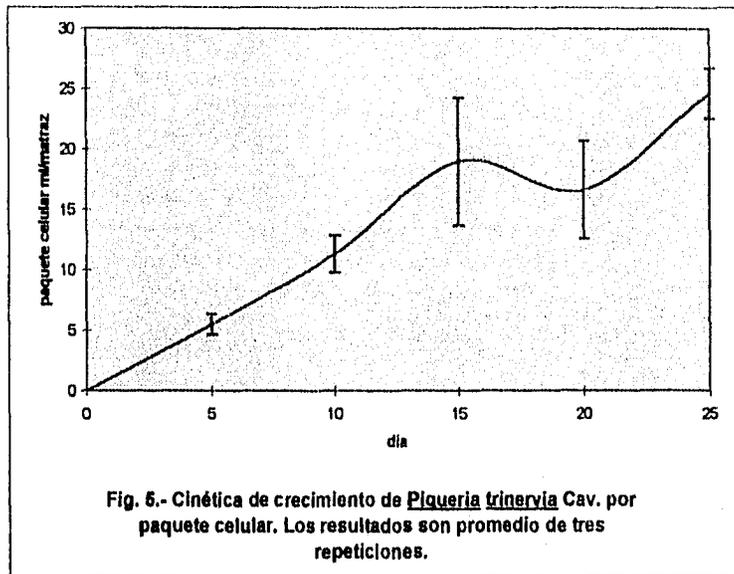
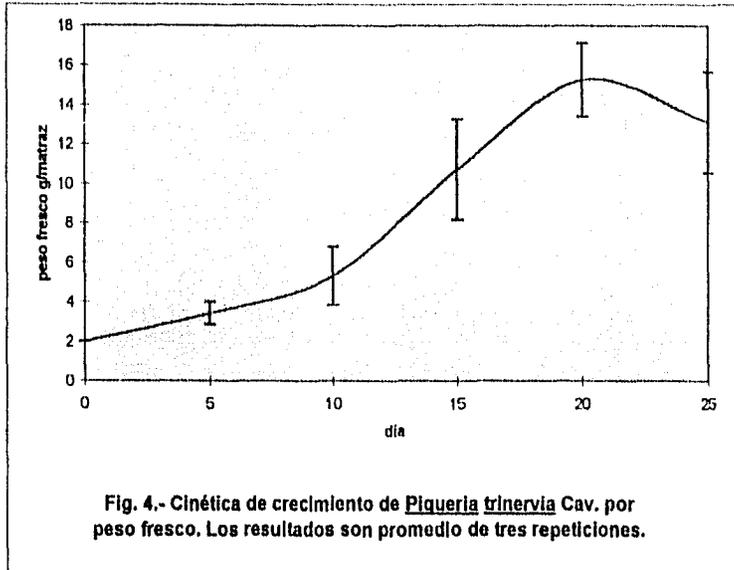
Se intentó establecer cultivo en suspensión con los callos generados en MB con 1mg/l de ANA y 1mg/l de BAP y en MB adicionado con 3mg/l de AIA y 0.2 mg/l de cinetina. Con los callos del medio con AIA no fue posible establecer cultivo líquido porque resultaron muy compactos, presentaron oxidación y las células se

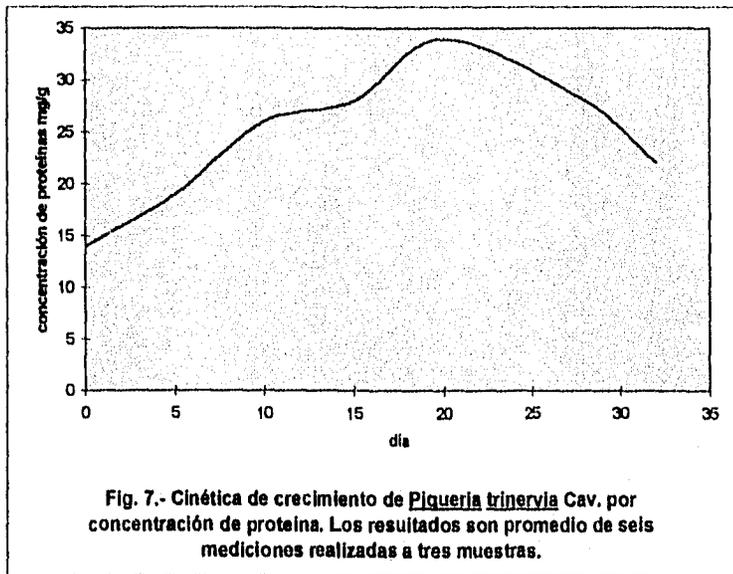
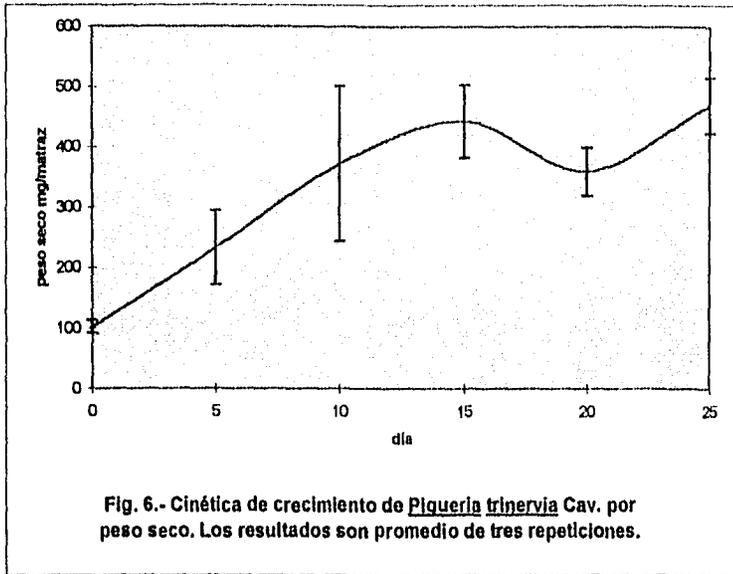
plasmolizaron, se probó con menores concentraciones de macronutrientes (75 y 50%) y la concentración de sacarosa se redujo al 2%, sin obtener con eso mejores resultados.

Se estableció cultivo líquido con las células generadas en el medio con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP. Aunque los callos no fueron muy friables, las células presentaron un estado hídrico muy bueno en el análisis bajo microscopio óptico (no estaban ni demasiado turgentes ni plasmolizadas) y presentaron crecimiento activo en los tres tratamientos en que se inocularon (con 2 % de sacarosa, 3% sacarosa y con 75% de los macronutrientes). Ya que no se presentó diferencia entre los medios y en atención al costo de los nutrientes, se decidió emplear el tratamiento con 2% de sacarosa.

En realidad no se generó cultivo de células en suspensión, el crecimiento se dio más bien en pequeños callos que en células libres. De cualquier forma, el sistema resultó muy eficiente: por su tasa de crecimiento, porque los callos conservaron su tono verdoso, bajo condiciones de iluminación y porque presentaba síntesis de piquero en niveles fácilmente detectables en cromatografía de capa fina. El color verdoso del callo es una característica deseable en un cultivo del que se pretenden extraer monoterpenos, ya que se ha comprobado que se requiere la presencia de plastidios para su síntesis (19, 23, 34). Por otro lado, la agregación celular presentó ventajas a la hora del manejo del material celular para establecer los patrones de crecimiento del cultivo.

Las células se adaptaron muy bien al medio líquido, ya que experimentaron crecimiento exponencial desde los primeros días del cultivo (ver las figuras 4, 5, 6 y 7), con una velocidad específica de crecimiento de 92 mg/día (de peso seco por matraz) y un tiempo de duplicación de 7 días. De hecho no se detectó fase lag en las curvas de crecimiento. Como la primera medición se hizo al quinto día del cultivo y no se percibió un periodo de adaptación, éste debe durar unas cuantas horas. Sólo en la gráfica calculada con peso fresco puede apreciarse una etapa de adaptación que comprende los primeros 6 días. Esta discrepancia puede adjudicarse a la dificultad de secar homogéneamente células provenientes de cultivo líquido. Como los cultivos no estaban muy disgregados, la curva obtenida con paquete celular no es muy confiable, en ella no se detecta el inicio de la fase estacionaria, que aparece alrededor del decimosexto día. Aunque se conocían estas dificultades, se hizo esta medición para tener una idea del volumen ocupado por las células a lo largo del cultivo. Este parámetro no debe exceder de





50% del volumen total (57), porque cuando esta proporción se rebasa se crean problemas de heterogeneidad. Como en la fase estacionaria las células ocupan 25 ml (incluidos los espacios), la cantidad de inóculo adicionado por matraz (2g), resulta adecuada para este sistema.

4.- Cepas fúngicas

Encontrar hojas, tallos o raíces de *Piqueria trinervia* con huellas de infección fúngica, resultó difícil. La población de la Serranía del Ajusco se encuentra muy bien adaptada al lugar y la gran mayoría de las plantas son vigorosas y saludables. La hojas experimentan una muerte programada de abajo hacia arriba que inicia cuando se acerca la floración y deja a la planta sin hojas cuando las semillas están maduras. En un inicio la marchitez localizada de las hojas producida por este fenómeno se confundió con una enfermedad fúngica, pero como no se encontraba ninguna cepa, se insistió dos veces más, al tercer intento se aislaron doce hongos de los tejidos internos de hojas de la planta y una colonia de una porción de raíz, que después de un cuidadoso trabajo de separación de colonias mezcladas y de observación al microscopio resultaron ser sólo ocho.

Para asegurar que se trabajaba con cepas puras, se estimuló la aparición de esporas por exposición prolongada de las cajas de cultivo a la luz. Este método resultó positivo en siete de los casos, pero una de las cepas no produjo esporas después de cuatro intentos; en realidad no las produce nunca porque pertenece a un género que no presenta esporas: *Rhizoctonia*. Con esta única excepción, se obtuvieron colonias monospóricas en todos los casos y se numeraron.

Las ocho cepas se caracterizaron macroscópicamente, por la apariencia de la colonia, y microscópicamente, por el aspecto del micelio bajo el microscopio. Después de lo cual se determinaron los géneros a los que pertenecían. Se aisló un ascomicete, el hongo 2, perteneciente al género *Phoma*, las siete cepas restantes son deuteromicetes. Estos resultados se muestran en la tabla 6.

En los cultivos duales de células vegetales y hongos, el micelio de siete cepas creció profusamente sobre el callo, sólo *Helminthosporium* sp no creció o presentó crecimiento muy limitado (en una de las repeticiones). Después de 15 días de tratamiento, parte del material vegetal había sido degradado por los hongos y resultó imposible saber si las manchas que aparecieron en las cromatografías de placa fina eran fitoalexinas, sustancias producidas por la

TABLA 6.- CARACTERIZACION DE LAS CEPAS FUNGICAS AISLADAS DE TEJIDOS INFECTADOS DE *P. trinervia*.

HONGO	CARACTERIZACION MACROSCOPICA	CARACTERIZACION MICROSCOPICA ¹	GRUPO TAXONOMICO	PARAMETROS DE CRECIMIENTO (MEDIO SOLIDO)
#1	MICELIO CLARO REVERSO DE LA COLONIA MUY OSCURO	HIFAS DELGADAS ESPORAS UNICELULARES MUY ESCASAS	Cladosporium sp	$\mu = 0.54$ cm/día td = 31 horas
#2	MICELIO CAFE DELGADO DE RAPIDO CRECIMIENTO CON PICNIDIOS NEGROS	PICNIDIOS CON ESPORAS UNICELULARES HIALINAS	Phoma sp.	$\mu = 1.9$ cm/día td = 9 horas
#3	COLONIA CAFE MUY GRUESA QUE COLOREA EL MEDIO DE NEGRO	CONIDIOS OSCUROS CON SEPTOS LONGITUDINALES Y TRANSVERSALES EN CADENA	Alternaria sp.	$\mu = 0.54$ cm/día td = 31 horas
#5	MICELIO PARDO CLARO MUY ESPONJOSO	AUSENCIA DE ESPORAS RAMIFICACIONES DE LAS HIFAS EN ANGULO RECTO	Rhizoctonia sp.	$\mu = 1.01$ cm/día td = 17 horas
#6	MICELIO BLANCO ALGODONOSO QUE PRODUCE UN METABOLITO AMARILLO INTENSO	FIALIDES PRODUCIDAS DIRECTAMENTE SOBRE LAS HIFAS EN CADENAS	Fusarium sp.	$\mu = 0.375$ cm/día td = 44 horas
#7	MICELIO BLANCO ALGODONOSO QUE PINTA EL MEDIO DE ROSA INTENSO	FIALIDES EN CADENA PRODUCIDAS DIRECTAMENTE SOBRE LAS HIFAS	Fusarium moniliforme	$\mu = 0.73$ cm/día td = 23 horas
#8	MICELIO CLARO DE ASPECTO SEDOSO QUE CRECE EN FORMA RAMIFICADA	ESPORAS ALARGADAS CON DIVISIONES O SEPTOS TRANSVERSALES	Helminthosporium sp.	$\mu = 0.90$ cm/día td = 19 horas
#9	COLONIA OSCURA DE CRECIMIENTO LENTO QUE PRODUCE ABUNGANTES ESPORAS	HIFAS GRUESAS OSCURAS ESPORAS EN CONIDIOFORS NO COMPACTOS	Phaeclomyces sp.	$\mu = 0.98$ cm/día td = 17 horas

¹ EL MICELIO SE OBSERVO EN MICROSCOPIO OPTICO A 400 AUMENTOS, SE HICIERON PREPARACIONES EN CINTAS ADHESIVAS TRANSPARENTES TRATADAS CON LACTOFENOL.

degradación o compuestos excretados por los hongos. La virulencia de los hongos tampoco fue clara debido a que el crecimiento de las cepas pudo ser saprofitico, soportado más bien por el ambiente nutritivo tan rico, en que se encontraban que por su habilidad de invadir las células de la planta. Esta duda pudo haberse resuelto con cortes histológicos de los callos, pero éstos se encontraban demasiado dañados, sobre todo los tratados con los tres primeros hongos. Para poder efectuarlos hubiera sido necesario estimar para cada cepa un tiempo conveniente de tratamiento, lo que requeriría demasiado tiempo para los fines de esta investigación.

Las pruebas de patogenidad practicadas sobre brotes dieron como resultado crecimiento saprofitico muy abundante de todos los hongos, soportado por el medio de cultivo, pero en ningún caso se encontraron evidencias de invasión a los tejidos de la planta. Con el mismo tiempo de tratamiento, los brotes resultaron menos dañados que los callos, porque no presentaron huellas de digestión, aunque perdieron vigor y rigidez y cambiaron de color a un verde más claro, resultado de la presencia de los hongos, ya que los testigos siguieron creciendo vigorosamente. Demostrando con esto que la organización celular de la planta representa un obstáculo difícil de sortear para los hongos. Mucha de la resistencia de las plantas a las enfermedades radica en las barreras de defensa preformadas y constitutivas (13). El callo resulta entonces, un modelo intermedio entre las plantas completas y el cultivo de células en suspensión, para el estudio de la interacción planta-hongo.

Las técnicas de cultivo dual de células vegetales y fúngicas pueden resultar muy valiosas para trabajos que buscan resolver un problema fitosanitario grave, donde se requiere conocer de forma amplia todas las posibilidades de interacción del hospedero con el microbio (30, 43), pero para probar el efecto inductor de un patógeno sobre el metabolismo secundario de una planta no parece resultar muy conveniente por las dificultades mencionadas arriba.

Las pruebas de patogenidad sobre plantas cultivadas presentaron también algunos problemas, es difícil conseguir que el micelio con agar no resbale del envés de las hojas y no se seque antes de dar una mínima oportunidad a los hongos. Por eso fue necesario colocar bolsas de plástico alrededor de las hojas elegidas y detener con clips el agar. Una vez que se tomaron estas precauciones se localizaron huellas de infección en hojas tratadas con tres hongos: *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Phaeoillomyces* sp. y se aislaron a

partir de ellas a los mismos hongos de nueva cuenta, probando con ello su patogenicidad. Las hojas tratadas con los hongos *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Fusarium moniliforme* y *Helminthosporium* sp., mostraron zonas de reacción hipersensible, evidenciando que aunque existe reconocimiento entre los hongos y la planta, ésta resulta resistente a su ataque, porque consigue aislarlos y detener su crecimiento. Estas últimas características eran justo las que se buscaban, pues suelen ser las que inducen fitoalexinas. No obstante, se utilizaron en las pruebas posteriores a todos los hongos, incluso a *Rhizoctonia* sp. -en el que no se probó ninguna interacción-, para tratar de encontrar alguna correlación entre la asociación de la planta y el hongo y su posible efecto sobre el metabolismo secundario del vegetal.

Se establecieron cultivos líquidos con todos los hongos tanto en medio de inducción de callo como en el de papa con dextrosa. Los hongos *Phoma* sp y *Helminthosporium* sp., no presentaron crecimiento en un principio, pero después de varios intentos con grandes cantidades de inóculo (8 ó 9 porciones de agar), surgieron variantes que se adaptaron a las nuevas condiciones de cultivo. Todos los hongos crecieron mejor en el medio de papa con dextrosa. Como organismos heterótrofos que, prefieren un ambiente rico en sustancias orgánicas complejas a uno donde abundan las sales minerales.

La cinética de crecimiento en medio líquido (PDA) sólo se estableció para los hongos *Fusarium* sp. y *Fusarium moniliforme* (ver figuras 8 y 9), que fueron elegidos como los mejores inductores.

Los dos hongos presentan una fase lag corta que comprende las primeras 24 horas del cultivo y una fase de crecimiento exponencial localizada entre el primero y el tercer día. *Fusarium* sp. alcanzó una velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial de 1.7 g/día/matraz y un tiempo de duplicación de 9:48 horas, siendo este menor que el de *Fusarium moniliforme*, que fue de 13 horas, el cual durante la fase exponencial presenta velocidad específica de crecimiento de 1.3 g/día/matraz.

5.- Interacción células en suspensión-elictores

Las pruebas de interacción del cultivo de células en suspensión con el micelio de los hongos fueron positivas en todos los casos, los medios de cultivo y las células de los matraces tratados, estaban teñidos con un tono café rojizo intenso, no

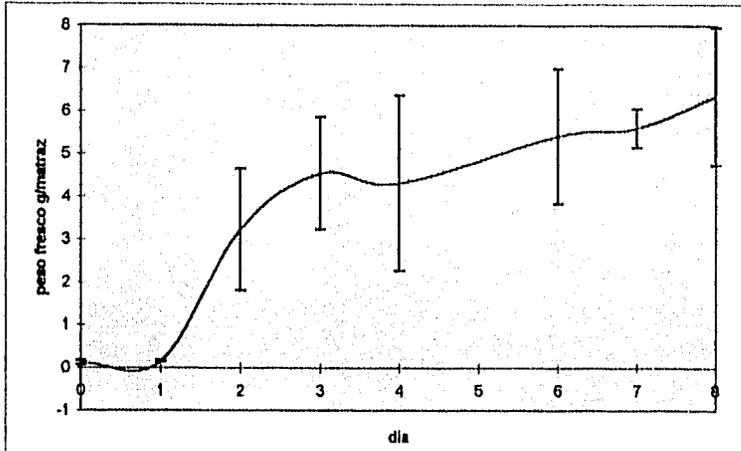


Fig. 8.- Cinética de crecimiento de *Fusarium* sp por peso fresco. Los resultados son promedio de tres repeticiones.

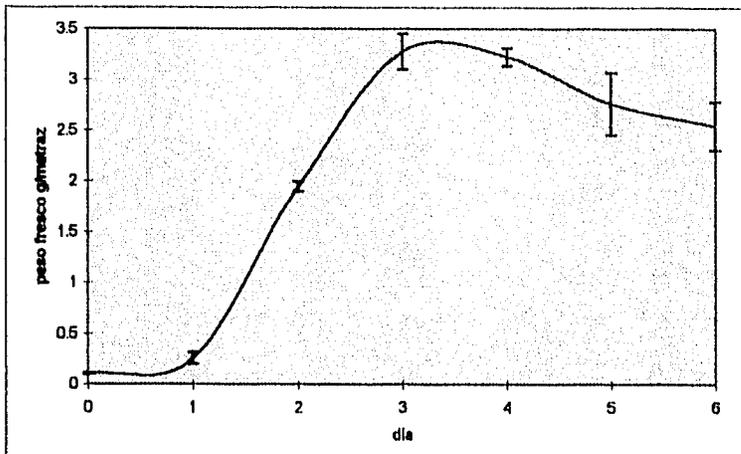


Fig. 9.- Cinética de crecimiento de *Fusarium moniliforme* por peso fresco. Los resultados son promedio de tres repeticiones.

observado antes en los cultivos, que estaba poniendo en evidencia la presencia de fitoalexinas coloridas, probablemente de naturaleza desconocida, porque los terpenos aislados de la planta son incoloros o blanquecinos (44, 60, 61).

Se hicieron pruebas de extracción con hexano, benceno, acetato de etilo y cloroformo. Las sustancias coloridas pudieron extraerse del medio y las células con acetato de etilo y cloroformo. Este último resultó ser más eficiente para este fin.

El efecto fue similar con todos los hongos -cambio de coloración en el medio y presencia de las mismas sustancias - y se presentó también, aunque mucho más ligera, en los matraces tratados con células maceradas de la planta.

Aunque la respuesta puede monitorearse a simple vista se decidió buscar un parámetro cuantitativo para poder comparar matraces inducidos en distintos tiempos. El extracto crudo presentó absorbencia a 435 nm en la zona del visible y en el ultravioleta a 210 nm. Utilizando siempre la misma cantidad de solvente para extraer al mismo volumen de medio, pudimos emplear la absorbencia en el visible para evaluar los tratamientos probados.

El hecho de que todos los hongos desencadenaron una respuesta de complejidad similar, cuatro nuevas sustancias inducidas y variación individual amplia entre las repeticiones de un mismo tratamiento, hicieron muy complicada la elección del mejor hongo inductor. Cuatro cepas fúngicas generaron los valores de absorbencia más altos, comprendidos entre 0.181 y 0.189 unidades: los hongos *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. y *Fusarium moniliforme*. Elegimos entre ellos a los dos que se adaptaron mejor al cultivo líquido, a los dos *Fusarium*.

Se probó con diferentes concentraciones de micelio para tratar de determinar cual es la cantidad necesaria de hongo para inducir la respuesta de defensa por gramo de callo inoculado. Para minimizar los errores de medición se emplearon para estas pruebas preparados de micelio seco. Todas las concentraciones probadas: 10, 20 y 30 mg de peso seco de micelio por matraz, dieron el mismo resultado. Como la respuesta se vuelve independiente desde los 10 mg y a cada matraz se adicionaron 2 g de callo como inóculo, se puede considerar que se requieren sólo 5 mg de peso seco de micelio por gramo de peso fresco de células vegetales inoculadas.

Si se llevara este proceso a la industria, podría utilizarse dichos hongos como inductores, porque su velocidad de crecimiento es muy buena y podría

mejorarse aún más si se optimizaran para el caso los nutrientes y el suministro de eire y porque la sensibilidad de la planta ante su presencia es muy alta, bastan unos cuantos miligramos de cualquiera de estas cepas para desencadenar el proceso.

Al igual que en otros sistemas inducidos con elicitores (22, 59), la respuesta de defensa en las células en suspensión, no muestra ninguna diferencia cuando se induce en los días 0, 1, 3, 5, 9, 12 y 15 después de iniciado el cultivo, comprendidos todos en la fase de crecimiento exponencial; después del día quince la respuesta se vuelve menos eficiente, tal vez como consecuencia de la carencia de nutrientes experimentada en el cultivo en esta fase de crecimiento (57), que puede incidir en la tasa de síntesis de las fitoalexinas.

La curva de producción de las fitoalexinas (ver figura 10) reveló que la máxima acumulación de sustancias de defensa en el medio de cultivo ocurre al tercer día, disminuye a partir de entonces hasta desaparecer hacia el séptimo día de tratamiento. Se sabe que después de la inducción, la actividad de las enzimas decae con el tiempo (57), el balance entre degradación y síntesis debe empezar a cambiar en este sistema poco antes de las 60 horas de tratamiento. Los metabolitos son lábiles en el medio de cultivo probablemente por la acción de alguna enzima vegetal presente o porque son inestables en medio acuoso. En cambio, cuando son extraídos con cloroformo permanecen en el solvente sin alterarse durante días y el extracto crudo es estable e temperatura ambiente.

Hacia el tercer día de tratamiento se puede obtener tres veces más extracto crudo del medio de cultivo que de las células elicitadas - 2mg/g de células y 0.6 mg/g de células respectivamente -, luego entonces, la mayor parte de las fitoalexinas son excretadas. Los elicitores están provocando una respuesta típica en la planta (22, 59), ya que inducen síntesis y secreción de los productos.

Si se cambia el medio de cultivo las sustancias no vuelven a excretarse aunque se adicionen más preparados de hongos. Sin embargo la concentración intracelular de las fitoalexinas aumenta a 1.5 mg/g de células, revelando tal vez un cambio de permeabilidad, resultado quizá del depósito de lignina o calosa, que suele estar asociado a la respuesta de vegetales ante el ataque de los hongos (4). No puede pensarse en muerte celular debida a la toxicidad de las fitoalexinas mismas, ya que hay síntesis y es esencial el tejido vivo para que esta ocurra (49, 51). No es posible reutilizar las células porque aunque la producción no está

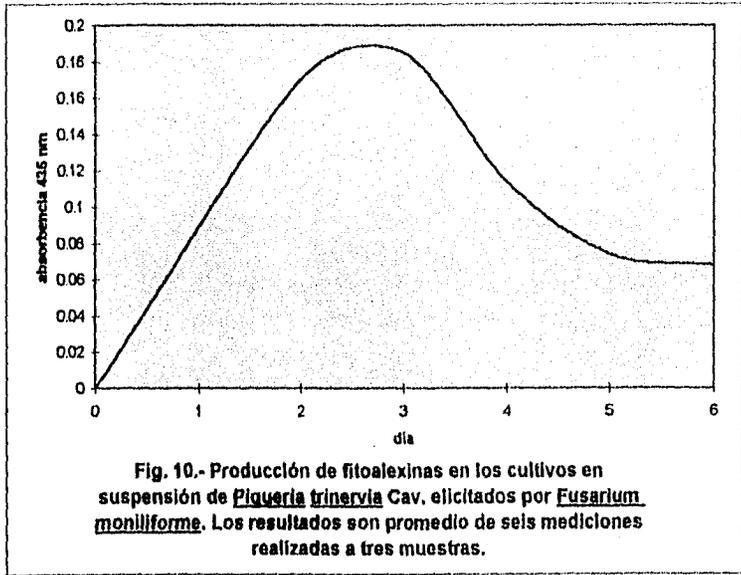


Fig. 10.- Producción de fitoalexinas en los cultivos en suspensión de Piqueria trinervia Cav. elicitados por Fusarium moniliforme. Los resultados son promedio de seis mediciones realizadas a tres muestras.

asociada a crecimiento y la capacidad biosintética permanece, el producto deja de excretarse (57).

La prioridad de las células inducidas es sin lugar a duda interrumpir el avance del patógeno, puesto que detienen su crecimiento y se dedican a sintetizar sustancias de defensa: fitoalexinas y posiblemente enzimas hidrolíticas porque la concentración celular de proteínas se eleva más del doble en relación con la que presentan los testigos en el mismo tiempo de cultivo, 49 mg/g de peso fresco de callo elicitado contra 21.3 mg/g de peso fresco en células sin tratar.

Se induce también respuesta en cultivos en suspensión de callos embriogénicos, pero no se detecta ningún cambio en cultivos de brotes en suspensión. Esto coincide con lo reportado por Bohlmann y Eilert quienes encontraron que los cultivos hidropónicos de *Ruta graveolens* no son inducibles y los cultivos de células más diferenciados son los que menos responden a la elicitación.

a.- La naturaleza del elicitor

La respuesta de defensa de la planta es la misma cuando se induce con preparados de micelio con su medio de cultivo, de micelio solo y de esporas (probamos nada más con las esporas de *Phoma* sp) y no se induce en ninguna medida con el medio libre de células. Por lo tanto, el elicitor es una sustancia presente en las células de los hongos y no alguna sustancia excretada por ellos al medio de cultivo. Esto disminuye la posibilidad de que el inductor sea una enzima hidrolítica, las cuales son típicamente extracelulares.

Los preparados de hongos secos son tan eficientes como los del micelio fresco. Considerando que las condiciones a que se somete al micelio para obtener células deshidratadas y esterilizadas son muy severas, la molécula inductora debe ser muy estable y como todos los hongos resultaron buenos inductores, debe ser una sustancia presente en todos ellos.

Esta descripción concuerda más con los polímeros estructurales de la pared celular, muy conservados dentro del reino de los hongos, que con metabolitos secundarios característicos en ciertos géneros o especies.

Las pruebas con quitina resultaron negativas aun en altas concentraciones (20 mg por matraz), en cambio el quitosán desencadenó respuesta positiva, aunque 31% menos eficiente (a la concentración probada) que la provocada por

los preparados de hongos. Las cepas empleadas en esta investigación, siete deuteromicetes y un ascomicete, presentan paredes celulares constituidas por quitina y glucanos, no tienen quitosán (43, 63), por eso es muy probable que los glucanos sean también elicitors.

Si la molécula elicitora presente en los hongos es un glucano, es posible que la planta pueda reconocer al quitosán y no a la quitina porque los monosacáridos del primero (unidades de glucosamina) son más parecidos a la glucosa (constituyente de los glucanos), pues no presentan unidades acetiladas como la segunda. Pero tal vez, lo que ocurre es que puede inducirse la respuesta de defensa en la planta con diferentes moléculas, circunstancia que haría más eficiente al sistema de protección del vegetal. El hecho de que estas reacciones puedan desencadenarse también, aunque con menor intensidad, con fragmentos de las células de la planta, parece apuntar en este sentido.

b.- Las sustancias sintetizadas *de novo*

De los extractos crudos tratados en cromatografía de columna se separaron cuatro sustancias diferentes que no habíamos observado nunca antes en la planta, una con la misma polaridad que el piquero y tres sustancias más polares. La primera forma cristales de color amarillo y representa alrededor del 2.3% del peso del extracto, las tres restantes son sólidos de color café muy oscuro y representan juntos el 65% del peso del extracto crudo, lo cual nos hace pensar que se trata de las moléculas más importantes en el proceso.

No se detectó la presencia de piquero en el extracto. Una de las fitoalexinas presentó el mismo R_f que el piquero (0.23), en un principio pensamos que se trataba de este terpeno, sin embargo pudimos comprobar que es otra sustancia porque absorbe en el visible y en el ultravioleta mientras el piquero lo hace sólo en el último, sus señales en las pruebas de resonancia magnética nuclear son diferentes (ver fig 11a y 11b) y porque su presencia no se detectó en el cromatógrafo de gases. Probablemente el piquero y alguna de las fitoalexinas se encuentran en un punto de bifurcación de la ruta metabólica y ante la situación detectada como emergente, la planta dirige todo el precursor hacia la síntesis de esa sustancia; o bien, la producción de las fitoalexinas en esta planta no debería explicarse sólo por síntesis unidireccional a partir del metabolismo primario, sino más bien por una red metabólica, que como en el garbanzo (7), cuando ocurre la

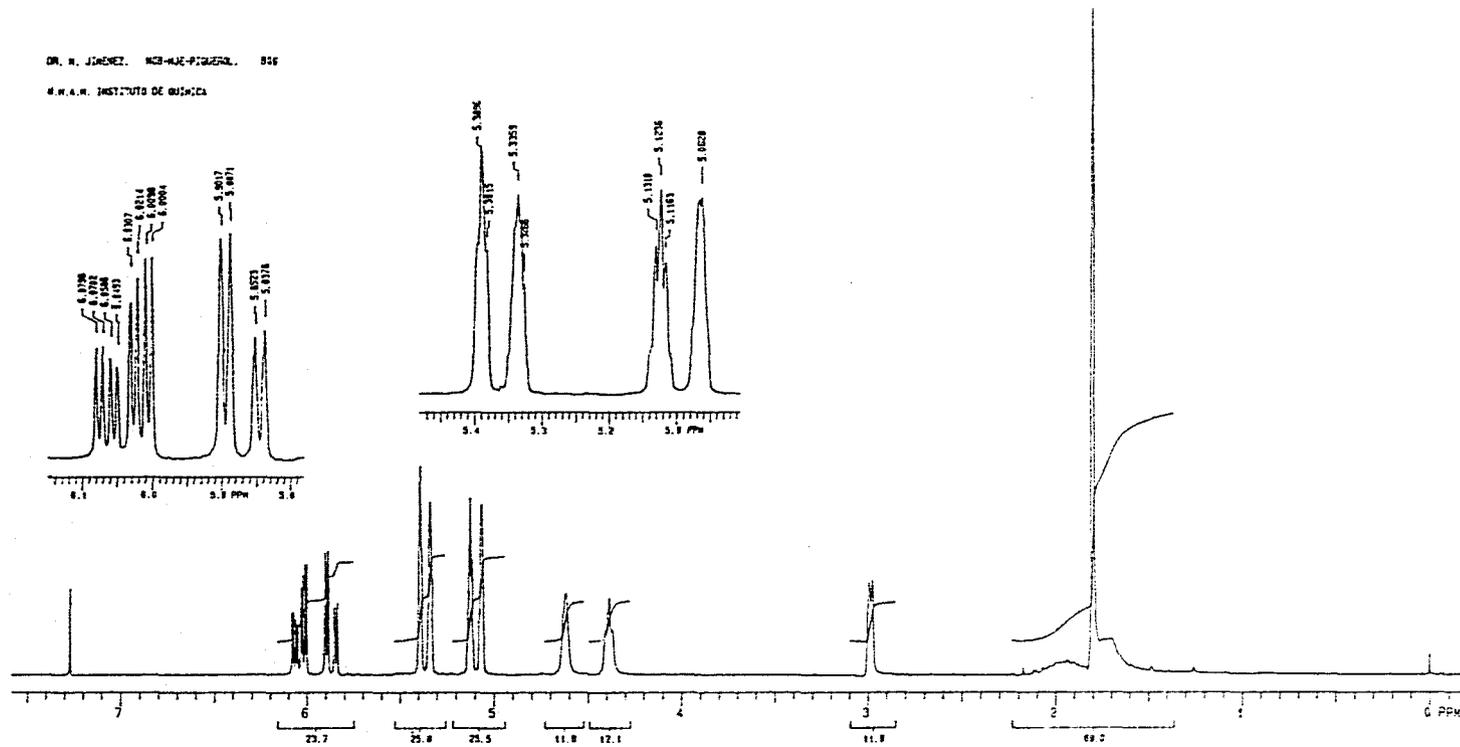


Fig 11a.- Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del piqueroi A.

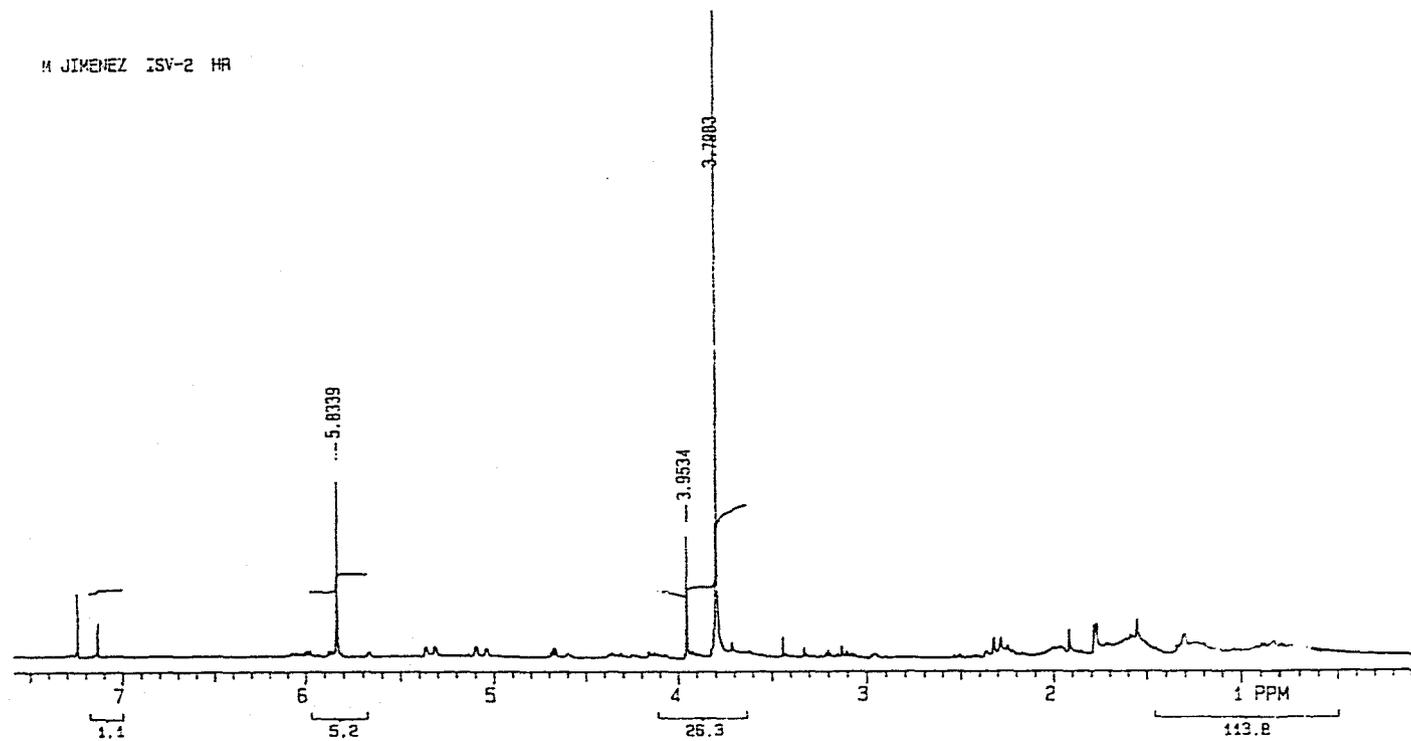


Fig 11b.- Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H de la fitoalexina.

inducción sintética fitoalexinas a partir de moléculas similares constitutivas como el piquerol. De cualquier forma, todo parece indicar que una o varias de las nuevas sustancias son monoterpenos.

En los extractos de la planta silvestre aparece siempre un compuesto tan cercano al piquerol que no a sido posible purificarlo por completo. Nos interesa aislarlo porque se ha comprobado su acción antimicrobiana. La desaparición del piquerol de los extractos de células inducidas y la menor complejidad de la mezcla de compuestos hicieron posible aislar cristales de esta sustancia (representa aproximadamente el 2.3% del extracto crudo), lo cual permitió avanzar en los estudios para determinar su estructura química. Los estudios de infrarrojo aplicados a este monoterpeno aislado tanto de plantas silvestres como de células elicidadas, resultaron idénticos, con evidencia de la presencia de grupos OH y una doble ligadura carbono-carbono (fig 12b): IR (cm⁻¹) max: 3357 (OH) y 1644 (C=C). Las señales resultantes de los estudios de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (fig 12a), fueron: un triplete, un doble triplete, un singulete, un doble doble triplete, un doblete, dos dobles cuarterones y dos dobletes: ¹HMRN, (CDCl₃) ppm: 4.68 (t) (2H, J=2.1 Hz, H7 H7); 4.34 (dt) (1H, J=3.3 Hz, J=9.6 Hz, H1); 3.71 (s) (1H, H5); 2.98, 2.88 (ddt) (1H, J=2.3 Hz, J=20.0 Hz, H_{2a}); 2.52 (d) (1H, J=6.1 Hz, H7 3a); 2.41, 2.32 (2dq) (1H, J=2.0 Hz, J=20.2 Hz, H_{2b}); 2.25, 2.22 (2d) (1H, J=3.5 Hz, J=6.1 Hz, H_{3b}). Las pruebas de resonancia nuclear con carbono 13 (fig 12c), detectaron la presencia de diez tomos de carbono, ¹³CRMN ppm (CDCl₃): 147.64 (C-6); 109.79 (C-7); 76.58 (C-1); 74.70 (C-5); 58.75 (C-4); 54.31 (C-8); 35.77 (C-2); 29.70 (C-3); 28.71 (C-10); 25.44 (C-9). Con base en el análisis de estos datos se propone la estructura de la figura 13, en el entendido de que todavía se está trabajando en su confirmación.

Aunque existen terpenoides -sobre todo sesquiterpenos y diterpenos- (22, 54, 71), específicamente inducidos con elicitores, este es el primer sistema de cultivo de tejidos en que se reporta la inducción de monoterpenos en respuesta a elicitores. Estos resultados demuestran que no es necesario la presencia de estructuras secretorias especializadas para que se presente la síntesis de monoterpenos (19, 34), es suficiente con que exista en el cultivo cierto grado de diferenciación y los dos sistemas de callo en suspensión que probamos lo tienen.

En el medio de cultivo de las células tratadas aparecen solamente los compuestos antes descritos, pero los extractos de las células presentan una mezcla mucho más compleja de sustancias, en ella se encuentran también varios

M JIMENEZ ISV-3 5H

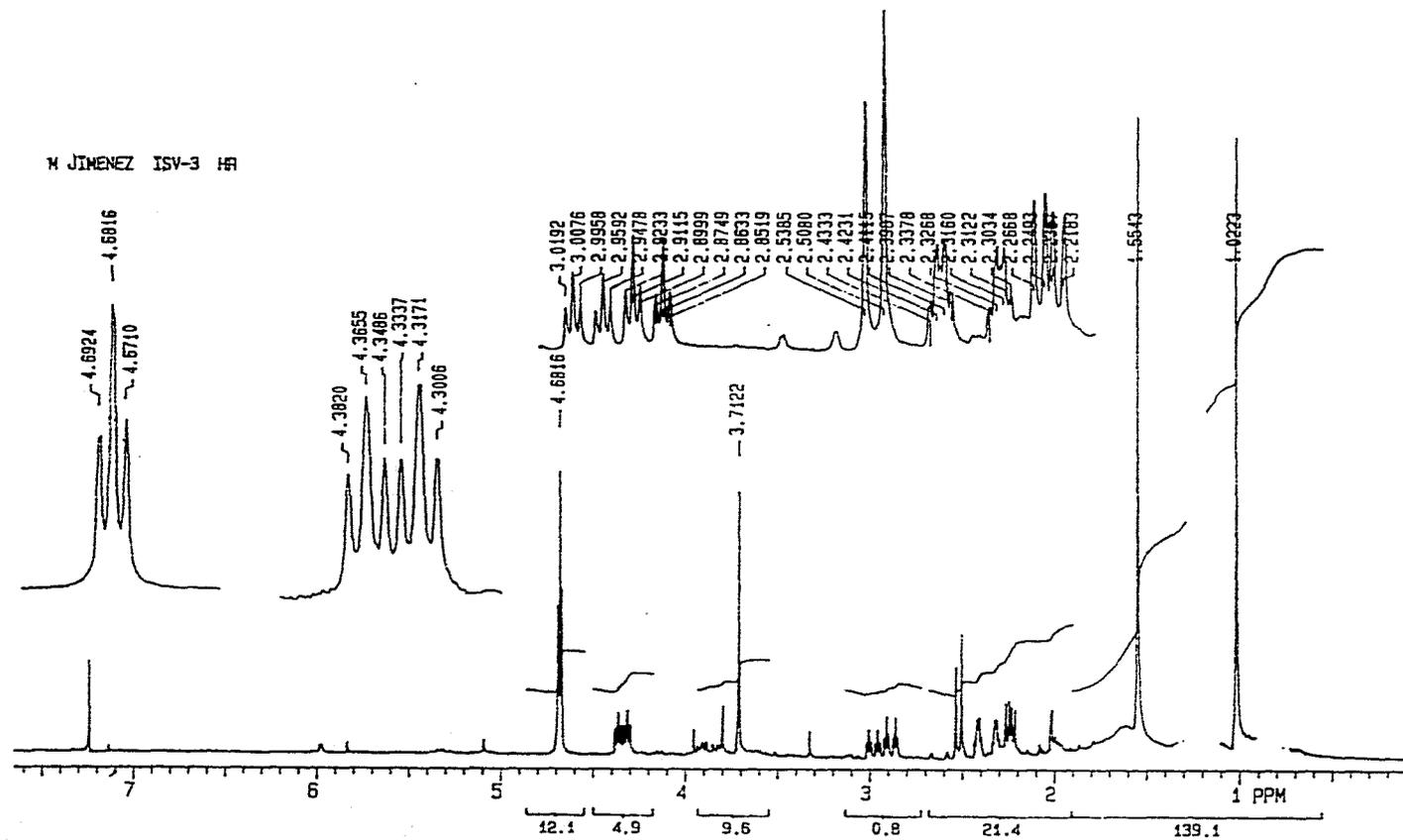


Fig 12a.- Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del nuevo monoterpeneo.

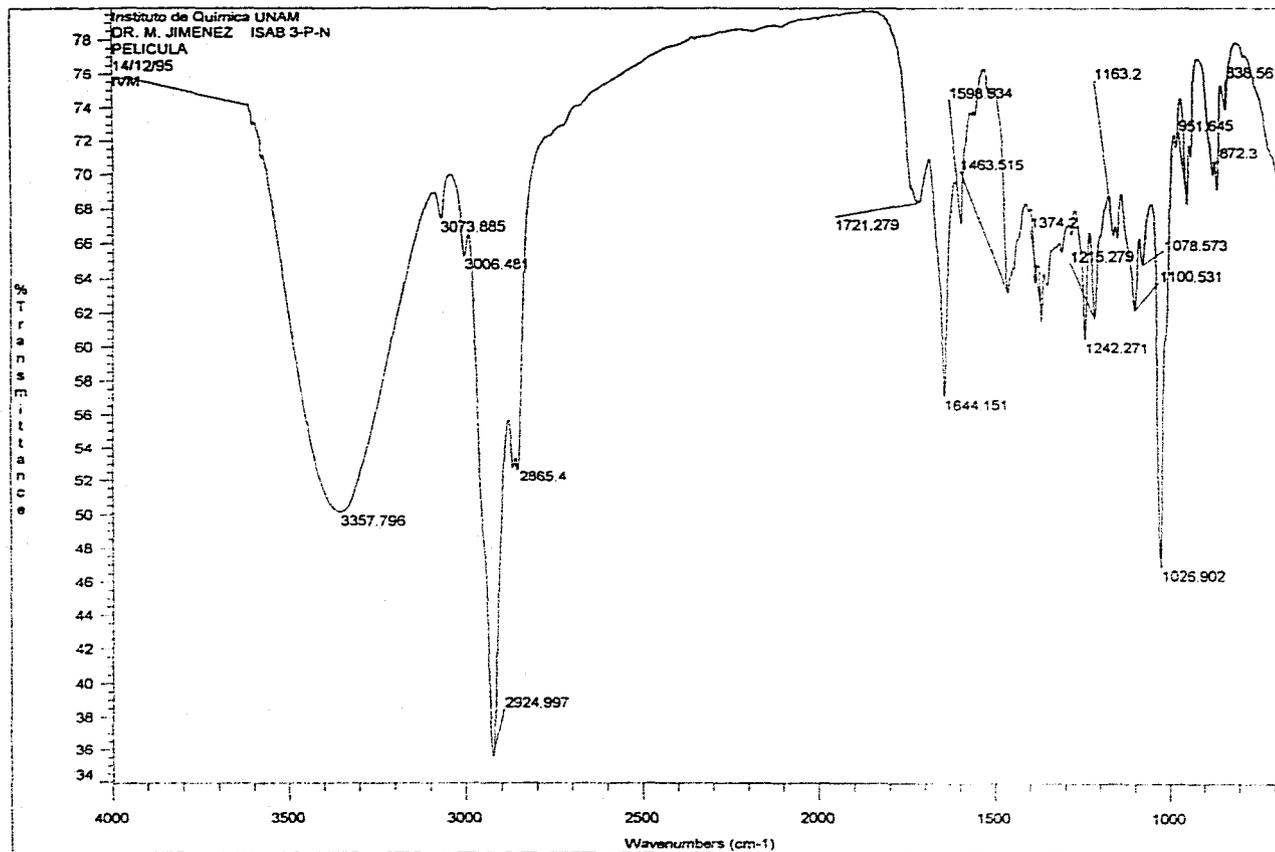


Fig 12b.- Espectro de infrarrojo del nuevo monoterpene.

RJE/Megilla Isab Dr. R. Jimenez RC
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.620 MHz
SPECTRAL WIDTH 16909.6 Hz
ACQUISITION TIME 0.300 sec
RELAXATION DELAY 0.400 sec
PULSE WIDTH 4.0 sec
TEMPERATURE 30.0 deg. C.
No. REPEATITIONS 64000
DECOUPLE H1
HIGH POWER 30
DECOUPLER CONTINUOUSLY ON
WALTZ16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 1.2 Hz
GAUSSIAN APOERTIZATION 0.333 sec
FT SIZE 65536
TOTAL ACQUISITION TIME 17.8 hours

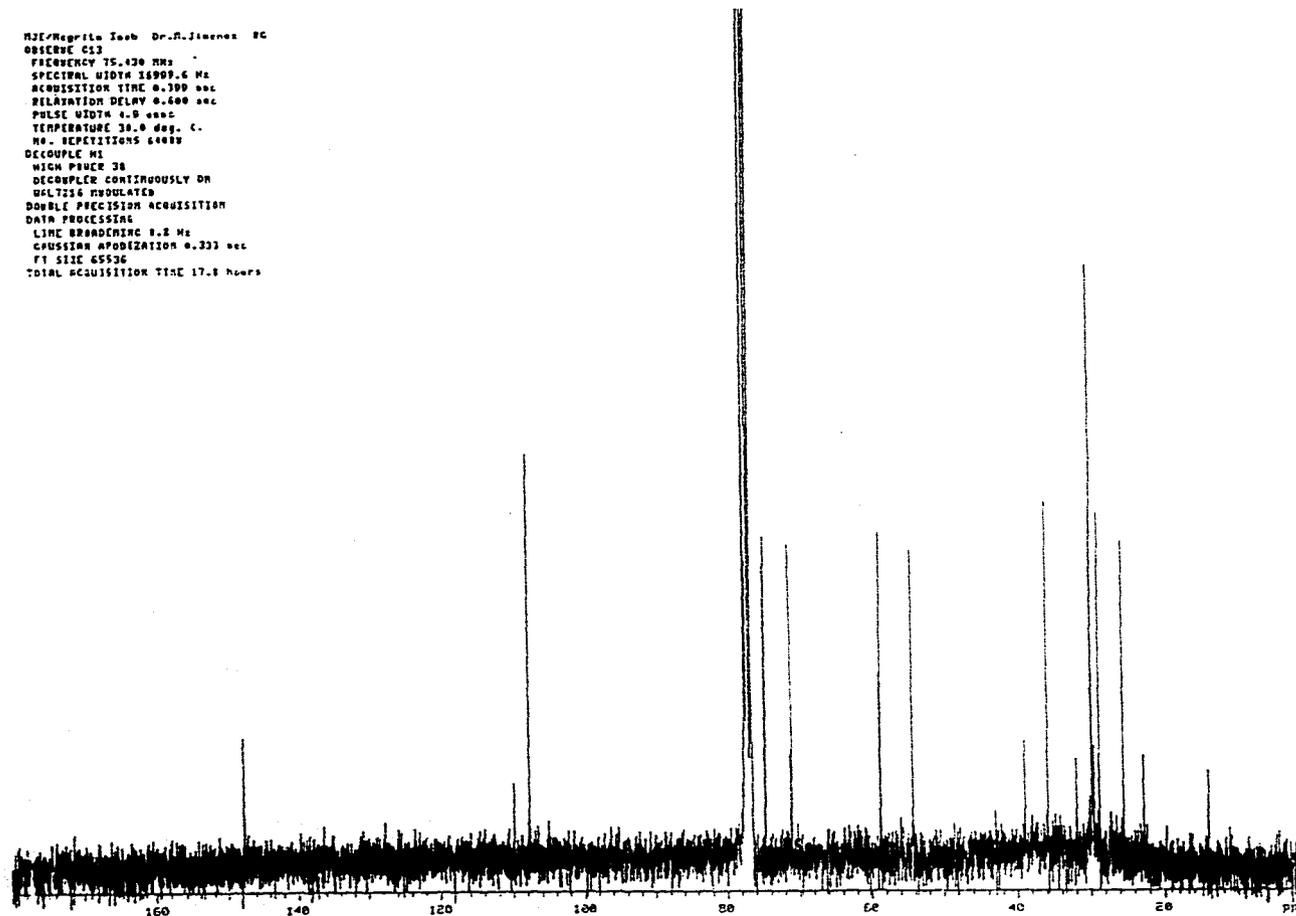


Fig 12c .- Espectro de resonancia magnética nuclear ¹³C del nuevo monoterpene.

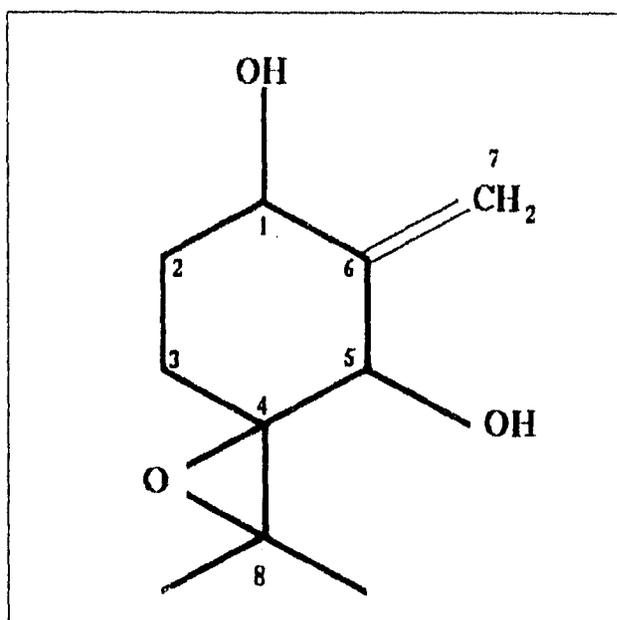


Fig. 13.- Estructura propuesta para el nuevo monoterpeno, 1,5-diol-8,8-dimetil-6,7-metileno exocíclico 4,8 epoxi-ciclohexano.

fenoles, que deben jugar algún papel en la defensa de la planta. Sin embargo, la síntesis de estas sustancias no es *de novo*, están presentes normalmente en los extractos de plantas silvestres. Su forma de acción debe requerir concentraciones basales permanentes. Los fenoles suelen formar parte de la primera defensa de las plantas y actúan inhibiendo enzimas hidrolíticas fúngicas (4, 58). Probablemente el retardo en el crecimiento experimentado por los hongos cuando se les aplicó el extracto crudo de la planta silvestre, se deba a su presencia.

6.- Pruebas de los metabolitos secundarios sobre los hongos

Se realizaron pruebas biológicas con varias sustancias: extracto crudo de la planta silvestre (aceite), piquerol, trinervinol, la mezcla de los monoterpenos extraídos de las células elicidadas (mezcla) y la mezcla de los tres compuestos más polares extraídos de las células elicidadas (FP). Las pruebas se hicieron con 100 ppm de las sustancias, con dos excepciones: el extracto crudo de la planta silvestre, donde se probaron 200 ppm, y la mezcla de los monoterpenos, de la que se emplearon 60 ppm. En el primer caso se usó esta concentración para poder detectar el efecto de alguna sustancia presente en esta mezcla tan compleja y en el segundo por la escasez de los compuestos.

El etanol -solvente empleado-, no presentó diferencia significativa en la tasa de crecimiento de ninguna de las cepas utilizadas (los niveles de significancia son menores a 0.05 en todos los casos), por lo que cualquier retardo en el crecimiento de los hongos puede adjudicarse a las sustancias probadas y no al solvente.

El trinervinol retarda el crecimiento de *Phoma* sp. y de *Phaeoilmomyces* sp.; el piquerol presentó una leve influencia -18% de inhibición- en *Phoma* sp., pero en el resto de los casos resultó completamente inocuo. El extracto crudo de la planta afecta el crecimiento de seis cepas: *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium* sp. y *Phaeoilmomyces* sp., entre 18 y 31%, como el efecto no se puede adjudicar ni al trinervinol ni al piquerol, es probable que se deba a los fenoles presentes en el extracto. La mezcla inhibe en un 48, 23 y 15% el crecimiento de *Phoma* sp., *Fusarium moniliforme* y *Helminthosporium* sp. respectivamente. La fracción polar resultó positiva en los hongos *Phoma* sp. y *Alternaria* sp., con retardos de 28, y 18%, en *Helminthosporium* sp. también se notó efecto, pero sobre el grosor del micelio.

Las fitoalexinas que fueron probadas tienen un efecto fungicida muy claro, aunque afectan de forma diferencial a los hongos (ver tabla 7). Las cepas más sensibles son las que desencadenan la reacción hipersensible en la planta: *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Fusarium moniliforme* y *Helminthosporium* sp., en especial *Phoma* sp., que presenta inhibición con piquero, extracto crudo, fracción polar y la mezcla. Resulta notable que el único ascomicete aislado sea el menos preparado para invadir a la planta. Con los tres parásitos *Alternaria* sp., *Fusarium moniliforme* y *Phaeoomyces* sp., la planta es menos afortunada, solamente *Alternaria* sp. presenta una ligera sensibilidad a la fracción polar. La virulencia de estos organismos puede adjudicarse, al menos en parte, a su resistencia a estas fitoalexinas; *Alternaria* sp y *Phaeoomyces* sp. se muestran más sensibles a los metabolitos constitutivos de la planta, particularmente el último. De cualquier forma es la planta quien gana la batalla, puesto que sólo se pudo encontrar alguna que otra hoja infectada en plantas por lo demás muy saludables, lo que sugiere que la respuesta de resistencia sistémica adquirida de la planta (67), debe ser bastante eficiente. El hongo *Rhizoctonia* sp., en el que no comprobamos ninguna forma de interacción con la planta, no se ve afectado por ninguna de las sustancias probadas.

TABLA 7.- PRUEBAS BIOLÓGICAS DE LOS METABOLITOS DE LA PLANTA SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS FUNGICAS¹.

HONGO	GRUPO TAXONÓMICO	COMPOSICIÓN DE LA PARED	PATOGENICIDAD	INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL ³
#1	Cladosporium sp.	Quitina y glucano	HR ²	ACEITE 22X
#2	Phoma sp.	Quitina y glucano	HR	ACEITE 24X MEZCLA 48X FP 28X FLOJEROL 18X TRINERVINOL 12X
#3	Alternaria sp.	Quitina y glucano	PARASITO	ACEITE 20X FP 16X
#5	Rhizoctonia sp.	Quitina y glucano	*	**
#6	Fusarium sp.	Quitina y glucano	PARASITO	**
#7	Fusarium moniliforme	Quitina y glucano	HR	MEZCLA 23X ACEITE 22X
#8	Helminthosporium sp.	Quitina y glucano	HR	ACEITE 18X MEZCLA 15X FP
#9	Phaeoclomyces sp.	Quitina y glucano	PARASITO	TRINERVINOL 37X ACEITE 31X

1 SE PROBARON CINCO SUSTANCIAS EN CADA CASO, PERO SOLO APARECEN LOS DATOS QUE RESULTARON CON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS, CON NIVELES DE SIGNIFICANCIA DE 0.05.

2 HAY RECONOCIMIENTO, DESENCADENAN RESPUESTA HIPERSENSIBLE EN LA PLANTA.

3 LOS RESULTADOS SON PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.

* NO SE DETECTO NINGUN TIPO DE INTERACCIÓN DEL HONGO CON LA PLANTA.

** NO SE PRESENTO RETARDO DE CRECIMIENTO CON NINGUNA DE LAS SUSTANCIAS PROBADAS.

VII.- CONCLUSIONES

- 1.- Las condiciones óptimas de germinación para las semillas de *Piqueria trinervia* Cav fueron: tratamiento previo de estratificación a 4 °C, durante 6 meses; exposición a la luz; y 17 °C de temperatura.
- 2.- Se indujo callo productor de piquerol en MS adicionado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP, empleando entrenudos como explante.
- 3.- Se estableció cultivo de células en suspensión fraccionando 2 g de callo productor de piquerol por matraz, en medio MS líquido suplementado con 1 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP.
- 4.- Se aislaron 7 cepas fúngicas asociadas con *P. trinervia*. *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Fusarium moniliforme* y *Helminthosporium* sp. desencadenan la respuesta hipersensible en la planta y *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. y *Paecilomyces* sp. son parásitos.
- 5.- Todas las cepas fúngicas utilizadas desencadenan la producción de fitoalexinas en *P. trinervia*.
- 6.- Las condiciones óptimas para el cultivo de células en suspensión elicitado fueron: 5 mg (peso seco), de micelio de *Fusarium* sp., por gramo de callo inoculado, tres días de tratamiento, durante la fase de crecimiento exponencial.
- 7.- El quitosano y un componente de la pared celular de la planta actúan como inductores de la respuesta de defensa en *Piqueria trinervia* Cav.
- 8.- Del extracto clorofórmico del sistema elicitado se aisló y caracterizó un nuevo monoterpeno: el 1,5-diol- 8,8-dimetil- 6,7-metileno exocíclico 4,8-epoxi-ciclohexano.
- 9.- Las sustancias sintetizadas *de novo* en los sistemas elicitados tienen efecto sobre hongos fitopatógenos.
- 10.- No puede sobreproducirse piquerol en cultivo de células en suspensión de *Piqueria trinervia* Cav., por interacción con los elicitores fúngicos probados.

VII.- CONSIDERACIONES FINALES

Piqueria trinervia Cav. es una de las plantas silvestres mexicanas más estudiada desde el punto de vista fitoquímico. Se han purificado y caracterizado varios de sus metabolitos secundarios, en especial los componentes terpénicos y fenólicos y se conoce también la actividad biológica de varios de ellos. Los estudios biológicos y tecnológicos para aprovechar este recurso vegetal inician con el proyecto al que pertenece este trabajo.

La domesticación de la planta dentro de una estrategia que conserve la diversidad de la especie necesariamente comprende reproducción sexual. Por eso en esta investigación se determinaron en primera instancia, los factores limitantes para la germinación de las semillas de *P. trinervia*

En un intento por garantizar la supervivencia de la planta se desarrolló una técnica de micropropagación para la especie, la embriogénesis somática, que se muestra en un apéndice al final de este trabajo. Esta forma de reproducción vegetativa representa, además de una garantía de conservación, una puerta abierta para múltiples posibilidades de mejora genética de la especie, por métodos tradicionales o de ingeniería genética. Las líneas embriogénicas obtenidas tienen un potencial morfogenético muy amplio y podrían resultar un excelente material para estudios bioquímicos y moleculares de embriogénesis en plantas compuestas, familia vegetal ampliamente representada en la herbolaria mexicana.

El sistema de cultivo de células en suspensión generado en este trabajo resulta interesante por varias razones: es reproducible cien por ciento de las veces; es el primer reporte de síntesis de monoterpenos en cultivos desdiferenciados; sintetiza un monoterpeno de forma constitutiva y otros durante la respuesta de defensa inducida con elicitores; cuando es elicitado, produce varias fitoalexinas con propiedades fungicidas que se excretan al medio de cultivo; responde a varios hongos fitopatógenos y a diferentes sustancias elicitoras; y resulta por último el primer sistema de cultivo *in vitro* donde puede inducirse la síntesis de monoterpenos con elicitores. Por estas características podría convertirse en un excelente modelo para el estudio del metabolismo de monoterpenos y de los mecanismos de interacción planta-patógeno. Problemas que resultan sin lugar a duda, estratégicos en la biotecnología vegetal.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Afek, U., Carmeli, S. y Aharoni, N. (1995). Columbianetin, a Phytoalexin Associated with Celery Resistance to Pathogens During Storage. *Phytochemistry*, 39(6): 1347-1350.
- 2.- Albersheim, P. y Valent, B. (1974). Host-Pathogen Interactions. *Plant Physiol*, 53: 684-687.
- 3.- Albersheim, P. y Anderson-Prouty, A. (1975). Carbohydrates, Proteins, Cell Surfaces, and the Biochemistry of Pathogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 26: 31-52.
- 4.- Allen, F. y Friend, J. (1983). Resistance of Potato Tubers to infection by *Phytophthora infestans*: a Structural Study of Haustorial Encasement. *Physiological Plant Pathology*, 22: 285-292.
- 5.- Adrews, D. y Rachubinski, R. (1990). Secretion and Organelle Biogenesis: Problems in Tageting Proteins to Specific Subcellular Compartments. En: *Tip Growth in Plant and Fungal Cells* (Heath, I., ed.). Universidad de York, Toronto, Canada. pp 317-335.
- 6.- Ayres P. (1990). Growth Responses Induced by Pathogens and Other Stresses. En: *Tip Growth In Plant and Fungal Cells* (Heath, I., ed.). Universidad de York, Toronto, Canada. pp 227-247.
- 7.- Barz, W. y Mackenbrock, U. (1994). Constitutive and Elicitation Induced Metabolism of Isoflavones and Pterocarpan in Chickpea (*Cicer arietinum*) Cell Suspension Cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 199-211.
- 8.- Bell, E. (1981). The Physiological Role(s) of Secondary (Natural) Products. En: *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*, Vol 7. (Stumpf, P y Conn, E. eds.). Academic Press, Inc. USA. pp 1-19.
- 9.- Bestwick, L., Bennett, M., Mansfield, J. y Rossiter, J. (1995). Accumulation of the Phytoalexin Lettucenin A and Changes in 3-hydroxy- 3-methylglutaryl Coenzyme a Reductase Activity in Lettuce Seedlings With The Red Spot Disorder. *Phytochemistry*, 39(4): 775-779.
- 10.- Bohlmann, J. y Eilert, U. (1994). Elicitor Induced Secondary Metabolism in *Ruta graveolens* L. Role of Chorismate Utilizing Enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 189-198.

- 11.- Bruce, R. y West, Ch. (1982). Elicitation of Casbene Synthetase Activity in Castor Bean. *Plant Physiol*, 69: 1181-1188.
- 12.- Buitelaar, R. M. and Tramper, J. (1992). Strategies to Improve the Production of Secondary Metabolites with Plant Cell Cultures: a Literature Review. *J. Biotechnology*, 23: 11-141.
- 13.- Callow, J., Estrada-García, T. y Green, J. (1987). Recognition on Non-self: the Causation and Avoidance of Disease. *Annals of Botany*, 60: 3-14.
- 14.- Castro, C., Jiménez, M. y González, M. (1992) Inhibitory Effect of Piquerol A on the Growth of Epimastigotes of *trypanosoma cruzi*. *Planta Med.*, 58: 281-282.
- 15.- Cooper, R. (1983). The Mechanisms and Significance of Enzymic Degradation of Host Cell Walls by Parasites. En: *Biochemical Plant Pathology* (Callow, J., ed.) John Wileyand Son Ltd. Londres. pp 101-157.
- 16.- Crawford, N. (1995). Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. *The Plant Cell*, 7: 859-868.
- 17.- Creelman, R. y Mullet, J. (1995). Jasmonic Acid Distribution and Action in Plants: Regulation During Development and Response to Biotic and Abiotic Stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4114-4119.
- 18.- Croes , A., Jacobs, J., Arroo, R. y Willems, G. (1994). Thiophene biosynthesis in *Tagetes roots*: Molecular Versus Metabolic Regulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 159-165.
- 19.- Croteau, R. (1987). Biosynthesis and Catabolism of Monoterpenoids. *Chem. Rev.*, 87:929-954.
- 20.- Cruz, R., Anaya, A., Gavilanes-Ruiz, M., Sánchez, S. y Jiménez, M. (1990). Effect of Diacetyl Piquerol on H⁺-ATPase Activity of Microsomes from *Ipomea purpurea*. *J. Chemical Ecology*, 16: 2253-2261.
- 21.- Cruz-Reyes, A., Chavarin, C., Campos, M., Taboada, J. y Jiménez, M. (1989). Actividad Molusquicida del Piquerol A, Aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) Sobre Ocho Especies de Caracoles Pulmonados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*, 84(1): 35-40.
- 22.- Chappell, J. y Nable, R. (1987). Induction of Sesquiterpenoid Biosynthesis in Tobacco Cell Suspension Cultures by Fungal Elicitor. *Plant Physiol*, 85: 469-473.
- 23.- Chappell, J. (1995). Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Pathway in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 521-547.

- 24.- Chasan, R. (1995). Eliciting Phosphorylation. *The Plant Cell*, 7: 495-497.
- 25.- Chen, Z., Malmay, J., Henning, J., Conrath, U., Sánchez-Casas, P., Silva, H., Ricigliano, J. y Klessig, D. (1995). Induction Modification and Traduction of the Salicylic Acid Signal in Plant Defense Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4134-4137.
- 26.- Deverall, B. (1972). Phytoalexins and Disease Resistance. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 181: 233-246.
- 27.- Dixon, R. y Lamb, Ch. (1990). Molecular Communication in Interactions Between Plants and Microbial Pathogens. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol.*, 41:339-367.
- 28.- Dixon, R. (1991). *Plant Cell Culture. The Practical Approach. Series Oirl Press. Oxford, England.* pp 15-20, 91-96.
- 29.- Donovan, A., Isaac, S. y Collin, A. (1990). Dual Fungal and Plant Cell Culture. En: *Methods in Molecular Biology, Vol 6. Plant Cell and Tissue Culture* (Pollard, J., ed.). The Humana Press. pp 405-412.
- 30.- Eilert, U. (1987). Elicitation: Methodology and Aspects of Application. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 4.* Academic Press, Inc. pp 154-196.
- 31.- Eilert, U., De Luca, V., Constabel, F. y Kurz, W. (1987). Elicitor-Mediated Induction of Tryptophan Decarboxylase and Strictosidine Synthase Activitiesin Cell Suspension Cultures of *Cataranthus roseus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 254(2): 491-497.
- 32.- Ensminger, P. (1993). Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. *Physiologia Plantarum*, 88: 501-508.
- 33.- Facchini, p. y Chappell, J. (1992). Gene family for an Elicitor-Induced Sesquiterpene Cyclase in Tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 11088-11092.
- 34.- Gershenzon, J. y Croteau, R. (1990). Regulation of Monoterpene Biosynthesis in Higher Plants. En *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids, Vol 24, Capítulo 3* (Tower, N y Stafford, H., eds.). Plemon press, New York, 99-160.
- 35.- González, M. Anaya, A., Espinosa, F., Jiménez, M y Castillo, R. (1981). Allelopathic Potential of *Piqueria trinervia* (Compositae) and Piquerois A and B. *J. Chemistry Ecology*, 7(3): 509-515.

- 36.- Goodwin, T. y Mercer, E. (1988). Introduction to Plant Biochemistry. Pergamon press, Londres, Inglaterra. Capitulo 11, 400- 470.
- 37.- Gottlieb, O. (1990). Phytochemicals: Differentiation and Function. *Phytochemistry*, 29(6): 1715-1724.
- 38.- Guern, J. (1987). Regulation from Within: The Hormone Dilemma. *Annals of Botany*, 60: 75-102.
- 39.- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. y Schmelzer, E. (1995). Oligopeptide Elicitor-Mediated Defense Gene Activation in Cultured Parsley Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4150-4157.
- 40.- Hartmann, H. y Kester, D. (1980). Propagación de Plantas Principios y Prácticas. Editorial Continental, México, pp 145-226.
- 41.- Heath, I. (1990). Tip Growth in Plant and Fungal Cells. Academic Press, Inc. San Diego California USA. pp 317-335.
- 42.- Holden, P. y Y, M. (1994). Variation in the Growth and Biosynthetic Activity of Cloned cell Cultures of *Capsicum frutescens* and their Response to an Exogenously Supplied Elicitor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 31-37.
- 43.- Isaac, S (1992). Fungal-Plant Interactions. Chapman and Hall. The University Printing House, Cambridge, pp 1-74.
- 44.- Jiménez, M. y González, M (1983). Nuevo Alcohol Diterpénico Aislado de *Piqueria trinervia* Cav. *Rev. Latinoam. Quim.*, 14:20-23.
- 45.- Keon, J., Byrde, R. y Cooper, R. (1987). En: Fungal infection of Plants (Pegg, G. y Ayres, P., eds.) Symposium of the British Mycological Society. Cambridge University Press. pp 132-147.
- 46.- Khlife, S. y Tremblay, M. (1995). Maturation of Black Spruce Somatic Embryos. Part 1. Effect of L-Glutamine on the Number and Germinability of Somatic Embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 33-38.
- 47.- Kishore, G. and Somerville Ch. (1993). Genetic engineering of Commercially Useful Biosynthetic Pathways in Transgenic Plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 4:152-158.
- 48.- Kokubun, T., Harborne, J., Eagles, J. y Waterman, P. (1995). Four Dibenzofuran Phytoalexins from the Sapwood of *Maespius germanica*. *Phytochemistry*, 39(5): 1039-1042.

- 49.- Kokubun, T., Harborne, J., Eagles, J. y Waterman, P. (1995). Antifungal Biphenyl Compounds are the Phytoalexins of the Sapwood of *Sopbus aucuparia*. *Phytochemistry*, 40(1): 57-59.
- 50.- Kolattukudy, P., Rogers, L., Li, D., Hwang, Ch. y Flaishman, M. (1995). Surface Signaling in Pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4080-4087.
- 51.- Kuhn, P., Hargreaves, J. (1987). Antifungal Substances from Herbaceous Plants. En: *Fungal Infection of Plants* (Pegg, G. y Ayres, P., eds.). Symposium of the British Mycological Society. Cambridge University Press. pp 193-218.
- 52.- Kurantz, M. y Osman, S. (1983). Class Distribution, Fatty Acid Composition and Elicitor Activity of Phytophthora Infestans Mycelial Lipids. *Physiological Plant Pathology*, 22: 363-370.
- 53.- Kutney, J. (1993). Plant Cell Culture Combined with Chemistry: A Powerful Route to Complex Natural Products. *Acc. Chem. Res.*, 26: 559- 566.
- 54.- McGarvey, D. y Croteau, R. (1995). Terpenoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7: 1015-1026.
- 55.- Messner, B. y Boll, M. (1993). Elicitor-Mediated Induction of Enzymes of Lignin Biosynthesis and Formation of Lignin-Like Material in a cell Suspension Culture of Spruce (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 261-269.
- 56.- Mulder-Kieger, Th., Verporte, R. Baerheim-Svendsen y Scheffer, J. (1988). Production of Essential Oils and Flavours in Plant cell and Tissue Cultures. A review. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 13: 85-154.
- 57.- Payne, G., Bringi, U., Prince, C and Shuler, M. (1991). *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers, New York. pp 25-39, 147-163, 329-335.
- 58.- Peters, N. y Verma, D. (1990). Phenolic Compounds as Regulators of Gene Expression in Plant-Microbe Interactions. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 3: 4-8.
- 59.- Ren, Y. y West, A. (1992). Elicitation of Diterpene Biosynthesis in Rice (*Oryza sativa* L.) by Chitin. *Plant Physiol.*, 99: 1169-1178.
- 60.- Romo, J., Romo, A., Quijano, L., Ríos, T. y Díaz, E. (1970). Los Componentes Terpenoides de la *Piqueria trinervia* Cav. *Revista Latinoamericana de Química*, 2:72-81.
- 61.- Rubio, M., Bunge, A. y Jiménez, M. (1985). Estructura Electrónica de Piquerol A y Piquerol B. *Rev. Latinoamer. Quim.*, 16(2): 69-72.

- 62.- Rubluo, A., Flores, A., Jiménez, M. y Brunner, I. (1995). *Piqueria trinervia* Cav.: In Vitro Culture and the Production of Piquerol. En: Biotechnology of Medical and Aromatic Plants (Bajaj, Y., ed.) Springer-Verlag.
- 63.- Ruiz-Herrera, J. (1995). Fungal Cell Wall. Structure, Synthesis and Assembly. CRC Press. pp 1-35.
- 64.- Shepherd, K. and Mayo, G. (1972). Genes Conferring Specific Plant Disease Resistance. *Science*, 175:375-380.
- 65.- Soriano-García, M., Jiménez, M., González, M., Hernández, A., Schatz, M. y Campana, C. (1983). Crystal and Molecular Structure of Piquerol A (A potente growth-inhibiting factor). *Chemistry Letters*, 616-620.
- 66.- Taticek, R., Moo-Young, M. y Legge, R. (1991). The Scale-up of Plant cell culture: Engineering Considerations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24: 139-158.
- 67.- Terras, F., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N., Osborn, R., Kester, A., Rees, S., Torrekens, S., Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. y broekaert, W. (1995). Small Cysteine-Rich Antifungal Proteins from Radish: Their Role in Host Defense. *The Plant Cell*, 7: 573-588.
- 68.- Tomiyama, K., Okamoto, H. y Katou, K. (1983). Effect of Infection by *Phytophthora infestans* on the Membrane Potential of Potato cells. *Physiological Plant Pathology*, 22: 233-243.
- 69.- Tremblay, L. y Tremblay, F. (1995). Maturation of Black Spruce Somatic Embryos: Sucrose Hydrolysis and Resulting Osmotic Pressure of the Medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 39-46.
- 71.- Wichham, K. y West, CH. (1992). Biosynthesis of Rice Phytoalexins: Identification of Putative Diterpene Hydrocarbon Precursors. *Arch. Biochem. Biophys.*, 293(2): 320-332.
- 72.- Wickremesinhe, E. y Arteca, R. (1994). *Taxus* Cell Suspension Cultures: Optimizing Growth and Production of Taxol. *J. Plant Physiol.*, 144: 183-188.
- 73.- Wierman, R. (1981). Secondary Plant Products and Cell and Tissue Differentiation. En: *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*, Vol 7. (Stumpf, P. y Conn, E. eds.) Academic Press, Inc. USA, pp 85-111.
- 74.- Wit, P. (1987). Specificity of Active Resistance Mechanisms in Plant-Fungus Interactions. En: *Fungal Infection of Plants* (Pegg, G. y Ayres, P., eds.) Symposium of the British mycological Society. Cambridge University Press. pp 1-24.

X.- APENDICE

Embriogénesis Somática de *Piqueria trinervia* Cav.

La estandarización de un sistema de propagación *in vitro* para la planta, la embriogénesis somática, garantizó que no se pondrá en riesgo este valioso recurso vegetal ante la eventual explotación comercial de la planta a gran escala, como resultado posible del uso de tecnologías desarrolladas en este trabajo o en otros posteriores.

1.- Metodología

a.- Inducción

Se probaron dos tratamientos para la inducción de callo embriogénico: que consistía en MB más 1mg/l de 2,4-D y MB con 1mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina. Los experimentos se montaron en medios sólidos y líquidos. En el primer caso, se colocaron cinco explantes en frascos de 150 ml que contenían 25 ml de medio sólido, se ocuparon porciones de tallo, raíces y hojas como explante y se hicieron diez repeticiones por tratamiento. Los frascos se mantuvieron a 25 °C, en fotoperiodo largo (16 horas luz/8 horas oscuridad) bajo una radiación promedio de 0.01 watt/m²). Para los cultivos líquidos se ocuparon matraces Erlenmayer de 125 ml, que contenían 50 ml de medio de inducción, se agregaron 8 porciones de tallo o de raíces en cada matraz y se hicieron tres repeticiones por tratamiento. Los matraces se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm, a 25 °C, en penumbra. La respuesta se evaluó después de cinco semanas de tratamiento por la presencia de callo embrionario y la frecuencia de respuesta.

b.- Desarrollo

Se probaron cinco tratamientos para el desarrollo de embriones somáticos de *Piqueria trinervia*: MB con 2% de sacarosa, MB con 3% de sacarosa, MB con 6% de sacarosa, MB con 3% de sacarosa y 750 mg/l de L-glutamina y MB con 6% de sacarosa y 750 mg/l de L-glutamina. Se utilizaron matraces Erlenmayer de 125 ml que contenían 50 ml de medio de desarrollo, se adicionaron 2g de callo embriogénico por matraz, se hicieron tres repeticiones por tratamiento. A los callos que habían estado en medios líquidos se les retiró el medio de inducción con ayuda de una malla de acero inoxidable de 200 mesh. Los matraces se mantuvieron en las condiciones antes descritas durante cuatro semanas. La

respuesta se evaluó por la presencia de embriones somático en estado cotiledonario y su capacidad para germinar en medio basal sin hormonas.

2.- Resultados y Discusión

Los dos medios empleados: MB con 1mg/l de 2,4-D y MB con 1mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina, resultaron igualmente eficientes para la inducción de callo embriogénico; tanto en la forma sólida como en la líquida, lo generaron con un 100% de eficiencia (ver tabla 8a y b). Todos los explantes probados originaron callo embriogénico con iguales características: opaco, pardo, friable y con crecimiento en zonas globulares.

Cuando se empleó medio sólido, en el ápice de los glóbulos apareció un pigmento rojo intenso, alrededor de la tercera semana de tratamiento, para desaparecer dos semanas después. Probablemente este pigmento sea una señal química que se traduce en una pauta determinada de crecimiento, porque también se presenta en la radícula de los embriones cuando empieza a desarrollarse. Los tejidos en crecimiento activo de muchas angiospermas suelen presentar tonalidades intensas cuando se reinicia crecimiento después de una época de reposo, tal es el caso de los renuevos de los árboles y de los brotes de las cactáceas. En los medios líquidos el callo presentaba sólo en ocasiones este pigmento.

Se determinó que las hojas son explantes más eficientes que los tallos para la inducción de callo embriogénico, en una prueba efectuada a cincuenta explantes de cada tipo. Las hojas producen una biomasa mayor de callo en seis semanas de tratamiento, con rendimientos de 202 ± 28 mg/explante contra 71 ± 21 mg/explante obtenidos con tallos. Esto puede deberse a que las hojas tienen una proporción mayor de meristemas por unidad de área -el callo empieza a generarse en las venas de las hojas, que son zonas meristemáticas- y a su pequeño grosor (aproximadamente 1mm) que facilita el transporte de los reguladores de crecimiento a través del tejido.

Las raíces fueron igual de eficientes que las hojas en la producción de biomasa. Las razones parecen ser las mismas, cuentan con muchas células meristemáticas y son muy delgadas -incluso más que las hojas-, pero no resultan un buen inóculo porque además de ser un tejido escaso, el callo que generan produce en la fase de desarrollo embriones aberrantes, que no germinan. Por lo tanto, el mejor explante para la inducción de callo embriogénico fueron las hojas.

**TABLA 8a.- TRATAMIENTOS PROBADOS
 PARA LA INDUCCION DE CALLO
 EMBRIOGENICO DE P. trinervia.**

SISTEMA	EXPLANTE	TRATAMIENTO HORMONAS (mg/l)		CARACTERISTICAS DEL CALLO ²
		2,4-D	CIN ¹	
SOLIDO	RAIZ	1	0.2	- CALLO EMBRIOGENICO
		1	-	- CRECIMIENTO GLOBULAR CON PUNTOS ROJOS
SOLIDO	TALLO	1	0.2	- EXPLANTE ESCASO
		1	-	- CALLO EMBRIOGENICO
SOLIDO	HOJA	1	0.2	- CRECIMIENTO LENTO, GLOBULAR CON PUNTOS ROJOS
		1	-	- CALLO EMBRIOGENICO
SOLIDO	HOJA	1	0.2	- CRECIMIENTO RAPIDO, GLOBULAR CON PUNTOS ROJOS
		1	-	- EXPLANTE ABUNDANTE
LIQUIDO	RAIZ	1	0.2	- CALLO EMBRIOGENICO
		1	-	- CRECIMIENTO LENTO
LIQUIDO	TALLO	1	0.2	- CALLO EMBRIOGENICO
		1	-	- CRECIMIENTO LENTO

1 CINETINA

2 SE OBTUVO INDUCCION DE CALLO EN 50/50 EXPLANTES, EN TODOS LOS TRATAMIENTOS.

TABLA 8b.- TRATAMIENTOS PROBADOS PARA EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS EN P. trinervia.

INDUCCION ¹				DESARROLLO				
SISTEMA	EXPLANTE	HORMONAS (ng/l)		MEDIO ²	EMBRION *	VASTAGO **	RAIZ ***	COLOR DEL EMBRION
SOLIDO	HOJA	1	0.2	MS SOLIDO	+	+	+	VERDE
				MS LIQUIDO	+	+	+	VERDE
1		-		MS SOLIDO	+	-	+	VERDE
				MS LIQUIDO	+	-	+	VERDE
LIQUIDO	RAIZ	1	0.2	MS LIQUIDO	+	-	+	BLANCO
				MS LIQUIDO	+	-	+	BLANCO
LIQUIDO	TALLO	1	0.2	MS LIQUIDO	+	+	+	VERDE
				MS LIQUIDO	+	-	+	VERDE

1 TRATAMIENTO RECIBIDO POR EL CALLO EMBRIOGENICO EN LA ETAPA DE INDUCCION.

2 MEDIO LIBRE DE REGULADORES DE CRECIMIENTO.

* PRESENCIA EN EL MEDIO DE DESARROLLO DE EMBRIONES EN ESTADO COTILEDONARIO.

** DESARROLLO DE VASTAGO EN LA GERMINACION DE LOS EMBRIONES.

*** DESARROLLO DE RAIZ EN LA GERMINACION DE LOS EMBRIONES.

En medio sólido la respuesta fue más rápida que en medio líquido (8 a 10 días contra 15 a 18) y la biomasa producida también es mayor, alrededor del doble. No obstante, es mejor trabajar con cultivos en suspensión porque ofrecen muchas ventajas: igual disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento para todas las células; posibilidad de seleccionar líneas altamente embriogénicas; disponibilidad de células por subcultivo, sin necesidad de pasar por la fase de inducción; y monitoreos frecuentes de los cultivos para establecer la secuencia de desarrollo de los embriones. Además, los cultivos en suspensión exhiben cambios más rápidos en morfología y actividad biosintética que los cultivos de callo (42). Una manera rápida de obtener cultivos en suspensión resultó la inducción de callo en medio sólido, y subcultivo después de cuatro semanas de tratamiento al mismo medio empleado en la inducción, pero ahora líquido. Transcurridas tres semanas más el cultivo en suspensión está listo para nuevos subcultivos o para ser trasladado al medio de desarrollo.

La variable fundamental que desencadena el desarrollo de embriones a partir de células embriogénicas en *piqueria trinervia* es la ausencia de auxinas en el medio de cultivo. Bajo esta condición es posible obtener embriones en estado cotiledonario con cualquiera de los siguientes procedimientos: con callo transplantado de medio sólido a medio sólido, con callo transplantado de medio sólido a medio líquido y con células en suspensión trasladadas a medio líquido.

Los tratamientos empleados para el desarrollo de embriones somáticos ponen en evidencia que en esta planta, al igual que en muchas otras (46, 69), hay además dos factores que tienen influencia en el proceso embriogénico: la concentración de sacarosa y la presencia de L-glutamina en el medio de desarrollo. Cuando el medio contiene sólo 2% de sacarosa el proceso se interrumpe y los embriones no se desarrollan; cuando está presente en el medio 3 o 6% de sacarosa los embriones continúan desarrollándose y con la última concentración se presenta además crecimiento muy activo de las células libres. Se conocen varias plantas que pueden incluso disparar el proceso de formación de embriones ante un cambio a concentraciones altas de sacarosa, el caso de la alfalfa es bien conocido (28, 70). La respuesta se ha relacionado tanto con la osmolaridad del medio como con la disponibilidad de carbono y energía, es probable que se trate de un efecto combinado. Hay en efecto una relación comprobada entre el estado hídrico del callo y este proceso morfogenético. Por

otro lado, la planta requiere abundante carbono y energía cuando inicia un proceso de división y crecimiento celular acelerado.

La presencia de L-glutamina en el medio de desarrollo incide, en las características de los embriones obtenidos, que resultan más parecidos a los embriones zigóticos, tanto por el tamaño como por el desarrollo del meristemo apical (más aparente por su color blanquecino). Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura (46), donde se encontró efecto significativo de este aminoácido sobre el número, el peso y las características de los embriones somáticos de abeto.

A partir de la síntesis de este aminoácido es que las plantas incorporan el nitrógeno a su metabolismo y por eso tiene que ver con su regulación (16). Aunque los pasos finos que conectan esta vía metabólica con la embriogénesis no se han dilucidado, se sabe que la L-glutamina tiene un efecto triple, porque funciona como osmótico, es un precursor central en la síntesis de otros aminoácidos y tiene influencia sobre los niveles hormonales endógenos. Ya se mencionó antes que la osmolaridad del medio incide favorablemente en el desarrollo y maduración de embriones; la embriogénesis precisa de una gran cantidad de enzimas para la síntesis y almacenamiento de sustancias de reserva, por tanto, se requieren Aa en abundancia; y las hormonas -en especial las auxinas y el ABA-, tienen un papel muy importante en este proceso.

Al germinar los embriones se establecieron diferencias entre tratamientos que antes no fueron evidentes. Los embriones generados con callo inducido en el medio que no contenía cinetina, resultaron aberrantes porque no presentaron epicotilo, lo mismo ocurrió con los embriones desarrollados a partir de raíz en cualquiera de los medios empleados. Por lo tanto el mejor medio fue MB con 1 mg/l de 2,4-D y 0.2 mg/l de cinetina, ya que con él se generaron embriones normales. El efecto de la L-glutamina se notó sobre todo en esta fase, pues los embriones tratados con ella, generaron los epicotilos mejor desarrollados.