



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

“Inducción de cultivos *in vitro* de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) para la obtención de Z-ligustílida”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

GUTELE DALIA GOLDHABER PASILLAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERT BYE BOETTLER

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2008



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de Marzo de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **GUI TELE DALIA GOLDHABER PASILLAS** con número de cuenta **99551227** con la tesis titulada "**Inducción de cultivos *in vitro* de *Ligusticum porteri* Coulter & Rose (Apiaceae) para la obtención de Z-ligustilida**", realizada bajo la dirección del **DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER**.

Presidente: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG DE ESPÍNDOLA
Vocal: DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS
Secretario: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER
Suplente: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de Abril de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

Agradezco al CONACYT por la beca de maestría otorgada. Así como a los proyectos de CONACYT: Estudio comparativo de cinco plantas medicinales de los bosques de pino-encino de Chihuahua: fase 1. Biología reproductiva y radical (U47512-Z), apoyado por SEP-CONACYT, responsable Dr. Robert Bye; y Establecimiento en campo de plántulas de tres especies medicinales sobre explotadas en la Sierra Tarahumara, utilizando métodos de propagación convencionales e *in vitro* (IN205907-3), apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM), responsable Dr. Robert Bye y co-responsable Dr. Víctor Chávez.

Agradezco a mi comité tutorial por el tiempo, el apoyo y la atención dedicados a mi trabajo durante los cuatro semestres de mis estudios de posgrado:

- Dr. Robert Arthur Bye Boettler
- Dra. Rachel Mata Essayag de Espíndola
- Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Le quiero dar las gracias al Dr. Bye por permitirme ser parte de este proyecto de investigación que empezó en la Sierra Tarahumara en octubre del 2005, por toda su paciencia, apoyo, tiempo dedicados a mi trabajo, el respeto y la amistad, muchas gracias!

A la Dra. Mata le agradezco haberme dejado ser parte de su laboratorio por el tiempo que duró mi trabajo, pero principalmente por ser tan amable y cariñosa con sus alumnos. También agradezco su tiempo, a su equipo de trabajo y todo el apoyo que recibí.

Al Dr. Chávez por permitirme ser parte de su laboratorio, por todo lo que aprendí y principalmente la enseñanza sobre la conservación de nuestras plantas y hacernos saber que somos nosotros los que generamos el conocimiento.

A mis compañeros de laboratorio Eva, Mariana, Mario, Araceli, Sol, Magda, Lupita, Abraham, Paquito, Claudia, Julio, Minerva, Sandra, Samantha, Iris, Fernando, Isabel, Vicente, Felipe, Jesús, Horacio, Arturo, Guadalupe, Betzy, Rosa, Paulina, Germán, Itzi, Silvio, Alejandro, Gerardo, Octavio, Wendy, Mónica, Miguel, Ariana, Neri, Roberto, Joaquín, Mara, María Luisa, Mabel, Marisela, Laura y a los que olvide, también forman parte de este agradecimiento.

Quiero agradecer la amistad que tuve con cada uno de mis compañeros de trabajo, espero que el tiempo no la borre..

Quiero agradecer especialmente a Bárbara, Gina, Rocío, Laura, Isabel, Raúl, Ángel, Hugo, Conchita y Estela por todo el apoyo técnico, la paciencia y la amistad, espero que algún día yo pueda ayudarles en la misma manera en como ustedes me ayudaron, muchísimas gracias!!

A mis amigas Cecilia e Iris. Fuimos compañeras de la licenciatura y de la maestría, muchas gracias por el cariño y por todo, estas palabras no son suficientes para expresar mi cariño por ustedes..

A mis muy queridos hermanos Heidi, Liz, Gwendy, Estefi, Jonathan, Nico y Edith, ustedes son mi vida y mi motor para seguir adelante, son mi familia, no hay palabras que expresen este sentir.. muchas gracias..

A mis sobrinos consentidos Maryfer, Regina, Moy, Michelle, Vale y Dani, son un pedacito de mi también...

A mis papás Eduardo y Silvia, ustedes han sido un ejemplo para mí, gracias por ser como son... los quiero mucho y los extraño más...

A Marisela y René por las tardes en su casa, las comidas tan agradables y las anécdotas que me han compartido. Ustedes forman parte de mi familia y han sido testigos de este proceso, no hay palabras ni manera de darles las gracias..

A mi nena, me has dado muchas alegrías y me has llenado mucho, siempre estás donde yo estoy, me sigues y no te cansas de estar conmigo... eres traviesa, dormilona, curiosa, juguetona y sobre todo, estás conmigo..

Y finalmente a Didier...eres todo... mi amante, mi amigo, mi confidente, mi compañero... sin ti no hubiera llegado a donde estoy ahora, has sido parte de mis tristezas y de mis momentos de felicidad, eres mi incondicional, mi columna vertebral y lo mejor es que te tengo todos los días para decírtelo, sin tu apoyo no sería quien soy, soy una mujer feliz a tu lado!!

Tabla de Contenidos

ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE GRÁFICAS	VIII
ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS	IX
RESUMEN	X
SUMMARY	XI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
México como país megadiverso	4
Domesticación de plantas	7
La familia Apiaceae (Umbelliferae)	9
Problemática en la reproducción de especies de la familia Apiaceae	10
Metabolitos secundarios de la familia Apiaceae	11
Biología de <i>Ligusticum porteri</i> y <i>Petroselinum crispum</i>	13
• El género <i>Ligusticum</i> L.	13
• Descripción botánica del género <i>Ligusticum</i>	14
• <i>Ligusticum porteri</i> Coulter & Rose	16
• Descripción botánica de <i>L. porteri</i>	16
• Distribución geográfica	19
• Etnobotánica	19
• Fitoquímica	22
• Problemática en el aprovechamiento de <i>Ligusticum porteri</i> en México	23
• El género <i>Petroselinum</i> Hill	23
• Descripción botánica del género <i>Petroselinum</i>	24
• <i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nyman ex A. Hill	26
• Descripción botánica de <i>P. crispum</i>	26
• Etnobotánica	28
• Fitoquímica	29
Metabolitos secundarios	31
Aceites esenciales	32
Terpenoides	33

Fenilpropanoides	34
Acetogeninas	35
Ftálidas	37
Actividad biológica de <i>Z-ligustílida</i>	57
Métodos de investigación	58
Ftálidas en otras familias	59
Cultivo de tejidos vegetales	64
Obtención de metabolitos secundarios <i>in vitro</i>	65
Obtención de metabolitos secundarios a partir de células en suspensión	67
JUSTIFICACIÓN	75
HIPÓTESIS	76
OBJETIVOS	76
• General	76
• Particulares	76
METODOLOGÍA GENERAL	77
MATERIALES Y MÉTODOS	78
• Material biológico	78
• Desinfección de semillas	78
• Germinación <i>in vitro</i>	78
• Germinación <i>ex vitro</i>	79
• Análisis fisicoquímico de suelo	79
• Inducción a callo	79
• Establecimiento de los cultivos de células en suspensión	79
• Cinética de crecimiento	80
• Obtención de los extractos de <i>L. porteri</i> y <i>P. crispum</i>	80
• Cromatografía en columna abierta	82
• Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	82
• Pruebas preliminares de <i>Ligusticum porteri</i>	83
• Prueba de viabilidad de semillas	83
• Germinación en mezclas de sustratos	84
• Desinfección de explantes	84
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87

• Material biológico	87
• Desinfección de semillas	87
• Germinación <i>in vitro</i>	89
• Germinación <i>ex vitro</i>	90
• Análisis fisicoquímico de suelo	91
• Inducción a callo	91
• Cultivo de células en suspensión	102
• Cinética de crecimiento	102
• Obtención de extractos	107
• Cromatografía en columna abierta	112
• Análisis de los extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	112
• Pruebas preliminares de <i>Ligusticum porteri</i>	134
• Viabilidad de semillas	134
• Germinación <i>in vitro</i>	135
• Germinación en suelo	137
• Inducción a callo	140
• Contaminación de explantes	140
• Cultivo de células en suspensión	141
CONCLUSIONES	143
PERSPECTIVAS	146
APÉNDICES	147
• Prueba de viabilidad con TTZ	147
• Cromatogramas	148
BIBLIOGRAFÍA	170

Índice de Tablas

Tabla 1	Comparación de la riqueza de ecosistemas, hábitats y ecoregiones entre varios países de América Latina	5
Tabla 2	Países con mayor riqueza de especies de vertebrados y plantas	6
Tabla 3	Familias de plantas vasculares de México con mayor número de géneros	7
Tabla 4	Comparación de atributos entre poblaciones naturales y domesticadas	8
Tabla 5	Patrón de distribución de metabolitos secundarios en la familia Apiaceae y otras familias botánicas	12
Tabla 6	Taxonomía de <i>Ligusticum porteri</i>	16
Tabla 7	Taxonomía de <i>Petroselinum crispum</i>	26
Tabla 8	Géneros de la familia Apiaceae que biosintetizan ftálidas	38
Tabla 9	Ftálidas extraídas de distintas especies de la familia Apiaceae	41
Tabla 10	Actividad biológica de Z-ligustílida	57
Tabla 11	Ftálidas identificadas en otros organismos y plantas	59
Tabla 12	Algunos metabolitos secundarios de plantas medicinales obtenidos <i>in vitro</i>	69
Tabla 13	Cultivos <i>in vitro</i> de especies de la familia Apiaceae	71
Tabla 14	Metabolitos secundarios obtenidos <i>in vitro</i> de especies de la familia Apiaceae	73
Tabla 15	Procedencia del material vegetal analizado	81
Tabla 16	Distintos tratamientos de desinfección de explantes y semillas	86
Tabla 17	Resultados del análisis de suelo de Chihuahua	91
Tabla 18	Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción a callo de explantes de <i>L. porteri</i> . Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los	92

	cultivos	
Tabla 19	Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción a callo de explantes de <i>P. crispum</i> . Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los cultivos	98
Tabla 20	Resultados de presencia o ausencia de Z-ligustílida de acuerdo al análisis por CCF. Material biológico obtenido de plantas adultas silvestres	107
Tabla 21	Fraccionamiento del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	111
Tabla 22	Componentes de los extractos de callos de <i>L. porteri</i>	112
Tabla 23	Componentes del extracto de semillas de <i>L. porteri</i>	115
Tabla 24	Componentes de las fracciones del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	115
Tabla 25	Componentes del extracto de raíz de <i>L. porteri</i>	116
Tabla 26	Componentes del extracto de raíz de <i>P. crispum</i>	116
Tabla 27	Distribución de algunos compuestos identificados en <i>L. porteri</i> , en el género <i>Ligusticum</i> , la familia Apiaceae y otras familias botánicas	119
Tabla 28	Resultados de inducción a callo con distintos explantes a 50 días del inicio del cultivo	139

Índice de Figuras

Figura 1	Países con mayor biodiversidad	4
Figura 2	<i>Ligusticum porteri</i>	15
Figura 3	<i>Ligusticum porteri</i> Coulter & Rose en Chihuahua, México (Octubre 2005).	18
Figura 4	Distribución geográfica de <i>Ligusticum porteri</i> en México y Estados Unidos	19
Figura 5	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nyman ex A.W. Hill	25
Figura 6	<i>Petroselinum crispum</i>	27
Figura 7	Origen biosintético de las acetogeninas	36
Figura 8	Fórmula estructural de una ftálica	37
Figura 9	Posible ruta de biosíntesis de la Z-ligustílida	39
Figura 10	Estructura química de Z-ligustílida	40
Figura 11	Estructuras químicas de algunas ftálicas mencionadas en la Tabla 9	52
Figura 12	Diagrama evolutivo de la especialización de los órdenes de las angiospermas	62
Figura 13	Modelo de una curva de crecimiento de un cultivo de células en suspensión relativo al número de células por unidad de volumen de cultivo en cuanto al tiempo de cultivo	68
Figura 14	Larva presente en las semillas de <i>L. porteri</i>	88
Figura 15	Algunas respuestas morfogénicas de los explantes de <i>L. porteri</i> con distintas combinaciones de 2,4-D/BA y ANA/BA	87
Figura 16	Algunas respuestas morfogénicas de los explantes de <i>P. crispum</i> con diferentes combinaciones de 2,4-D/BA y ANA/BA	98
Figura 17	Fotomicrografías de los cultivos en suspensión de callos de <i>L. porteri</i>	104
Figura 18	Fotomicrografías de los cultivos en suspensión de callos de <i>P. crispum</i>	106
Figura 19	Análisis por CCF de los extractos obtenidos de partes aéreas y raíces de plantas adultas de <i>L. porteri</i> y <i>P. crispum</i>	107
Figura 20	Análisis por CCF de los extractos de <i>L. porteri</i> y <i>P. crispum</i> de plantas cultivadas en invernadero	108
Figura 21	Análisis de los extractos de plántulas germinadas <i>in vitro</i> y plantas germinadas en invernadero de <i>L. porteri</i> y <i>P. crispum</i>	109
Figura 22	Análisis por CCF de extractos de callo de <i>L. porteri</i>	110

Figura 23	Estructuras químicas de algunos compuestos identificados en extractos de <i>L. porteri</i> y <i>P. crispum</i>	128
Figura 24	Prueba de viabilidad con TTZ	133
Figura 25	Semillas de <i>L. porteri</i> almacenadas un mes en organza	134
Figura 26	Plántulas de <i>L. porteri</i> germinadas in vitro en medio MS-100	136
Figura 27	Plántulas de <i>L. porteri</i> germinadas in vitro en suelo de Chihuahua	139

Índice de Gráficas

Gráfica 1	Formación de callo en medio de inducción MS-50 a partir de los distintos explantes estudiados de <i>L. porteri</i> . Resultados a los tres meses de inducción de los cultivos	94
Gráfica 2	Respuestas morfogénicas de cotiledón, hoja, pecíolo, raíz y tallo de <i>L. porteri</i> en medio de inducción MS-50. Resultados a los 3 meses de inducción de los cultivos	97
Gráfica 3	Formación de callo en medio de inducción MS-50 a partir de los distintos explantes estudiados de <i>P. crispum</i> . Respuestas a los 3 meses de inducción de los cultivos	99
Gráfica 4	Respuestas morfogénicas de cotiledón, hoja, pecíolo, raíz y tallo de <i>P. crispum</i> en medio de inducción MS-50. Resultados a los 3 meses de inducción de los cultivos	101
Gráfica 5	Cinética de crecimiento de los explantes de raíz, pecíolo y cotiledón de <i>L. porteri</i>	103
Gráfica 6	Cinética de crecimiento de los explantes de hoja, raíz, tallo y cotiledón de <i>P. crispum</i>	105
Gráfica 7	Tasa de germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>L. porteri</i>	135
Gráfica 8	Germinación de semillas de <i>L. porteri</i> en mezclas de suelo	137
Gráfica 9	Germinación de semillas de <i>L. porteri</i> en suelo de Chihuahua	138

Índice de Cromatogramas

Cromatograma 1	Callo de raíz de <i>L. porteri</i>	148
Cromatograma 2	Callo de semillas de <i>L. porteri</i>	149
Cromatograma 3	Callo de cotiledón de <i>L. porteri</i>	150
Cromatograma 4	Callo de hoja de <i>L. porteri</i>	151
Cromatograma 5	Callo de raíz de <i>L. porteri</i>	152
Cromatograma 6	Callo de pecíolo de <i>L. porteri</i>	153
Cromatograma 7	Callo de tallo de <i>L. porteri</i>	154
Cromatograma 8	Callo de pecíolo de <i>L. porteri</i>	155
Cromatograma 9	Callo de raíz de <i>L. porteri</i>	156
Cromatograma 10	Callo de pecíolo de <i>L. porteri</i>	157
Cromatograma 11	Extracto de semillas de <i>L. porteri</i>	158
Cromatograma 12	Fracción 1 del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	159
Cromatograma 13	Fracción 36 del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	160
Cromatograma 14	Fracción 40 sólida del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	161
Cromatograma 15	Fracción 40 aguas madres del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	162
Cromatograma 16	Fracción 56 del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	163
Cromatograma 17	Fracción 106 del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	164
Cromatograma 18	Fracción 131 del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	165
Cromatograma 19	Fracción 148 del extracto de partes aéreas de <i>L. porteri</i>	166
Cromatograma 20	Extracto de raíz de <i>L. porteri</i>	167
Cromatograma 21	Extracto de raíz de <i>P. crispum</i>	168

RESUMEN

Ligusticum porteri Coulter & Rose (Apiaceae), “chuchupate”, es una especie silvestre que se distribuye en el centro de las Montañas Rocallosas en E.U. y en el norte de la Sierra Madre Occidental en México. Esta hierba perenne no se cultiva y su raíz es extraída de sus poblaciones naturales para fines comerciales y medicinales. Es altamente apreciada por los Tarahumaras, Zunis, Pauties, Pimas y Mescaleros Apaches para propósitos medicinales y ceremoniales. La infusión de la raíz se consume para aliviar problemas gastrointestinales, como analgésico y remedio contra padecimientos bronco respiratorios, además de que es utilizada como talismán. Uno de los compuestos responsables de esta actividad farmacológica, la ftálida *Z*-ligustíflida, está presente en los aceites esenciales de la raíz. El objetivo fue establecer las condiciones *in vitro* para inducir la formación de callo y la biosíntesis como parte de una estrategia de conservación *ex situ* y uso sostenible. Los resultados fueron comparados con los de la especie cultivada *Petroselinum crispum*, “perejil”. Las semillas de ambas especies fueron germinadas en medio Murashige y Skoog (MS) al 100%, 50% y 25% y 1.5% de sacarosa. Las plántulas se seccionaron en hipocótilo, raíz, cotiledón, pecíolo, tallo y hoja y se indujeron de 30 a 90 días en medio MS al 50% adicionado con 0-4 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ó 0-4 mg/L ácido-alfa-naftalenacético (ANA) con 0-3 mg/L de benziladenina (BA). Los explantes de *L. porteri* desarrollaron un callo pequeño, poco friable, compacto y amarillo pajizo. En contraste, los explantes de *P. crispum*, produjeron un callo muy abundante, altamente friable, hialino y verde. A partir de los callos obtenidos en medio MS-50 con 2,4-D (4 mg/L) y ANA/BA (4:1) de ambas especies, se establecieron los cultivos de células en suspensión para iniciar una curva de crecimiento de hoja, raíz, pecíolo, tallo y cotiledón para determinar la cinética de crecimiento y la morfología celular de cada explante en las distintas fases del cultivo. Se analizaron los extractos obtenidos a partir de callos de hoja, semillas, pecíolo, tallo y raíz así como partes aéreas y raíz de plantas adultas de ambas especies por cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). A partir del extracto de partes aéreas de *L. porteri* se identificó la ftálida *E*-butilideneftálida junto con 33 componentes más. Del extracto de raíz de *P. crispum* se identificaron dos ftálidas no descritas previamente, la 3-*n*-butilftálida y la 3,6,7,-trimetoxi-isobenzofuran-13(H)-ona. De los extractos de callo de pecíolo y tallo de *L. porteri* se identificó la ftálida 3-butilideneftálida, así como en el extracto de raíz. Este es el primer trabajo que describe la germinación, el desarrollo *in vitro* y *ex vitro*, la morfología celular, describe la composición química de los extractos de *L. porteri* y explora el potencial biotecnológico de la especie silvestre *L. porteri*.

SUMMARY

Ligusticum porteri Coulter & Rose (Apiaceae), “chuchupate”, is a wild plant that grows in the central Rocky Mountains and northern Occidental Sierra Madre in Mexico. This perennial plant is not cultivated and its roots are extracted from their wild populations and sold as a drug. It is highly valued for medicinal and religious purposes by Tarahumara, Pima, Zuni, Pauite and Mescalero Apache. The root infusion is consumed to relieve gastrointestinal disorders, as an analgesic and to treat respiratory ailments. It is also used as a talisman to ward off witches and snakes. One of the biologically active compounds, the phthalide *Z*-ligustilide, is found in the root essential oils. The objective of the present work was to establish the *in vitro* conditions in order to induce callus formation and the *in vitro* biosynthesis as a *ex situ* conservational strategy and sustainable use. Results were compared to that of the cultivated plant *Petroselinum crispum*, “parsley”. Seeds were germinated in 25%, 50% and 100% Murashige and Skoog (MS) medium with 1.3% sucrose. Plants were excised into hypocotyledon root, cotyledon, petiole, stem and leaf explants and cultured in an induction media supplemented with 0-4 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or 0-4 mg/L of alpha-naphthaleneacetic acid (NAA) with 0-1 mg/L of 6-benzylaminopurine (BAP). *L. porteri*'s explants developed into a small, poorly friable, compact and yellow callus. In contrast, *P. crispum*'s explants developed into an abundant, highly friable, hyaline and green callus. Suspension cultures were established from callus cultures of both species in 50% MS medium supplemented with 2,4-D (4 mg/L) and NAA/BA (4:1). Growth kinetics and cell morphology at each culture stage were determined of leaf, root, stem, petiole and cotyledon calli cultures. Calli derived from leaf, seeds, petiole, stem and root, mature aerial parts and roots extracts were analyzed with thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography-mass spectrum (GC-MS). *E*-butylidenephthalide was identified along with other 33 compounds from the mature aerial parts extract of *L. porteri*. 3-Butylidenephthalide and 3,6,7,-trimethoxy-isobenzofuran-13(H)-one, not previously reported, were identified from the roots of *P. crispum*. 3-butylidenephthalide was identified from petiole and stem callus as well as in the root extract of *L. porteri*. This is the first report that describes the germination, the *in vitro* and *ex vitro* development, cellular morphology describes the chemical composition of the extracts of *L. porteri* and explores the biotechnological potential of the wild species *L. porteri*.

INTRODUCCIÓN

En el mundo existen más de 170 países, pero sólo 12 de ellos son considerados como megadiversos albergando entre 60 y 70% de la biodiversidad total del planeta (Figura 1). México es uno de estos países, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en riqueza vegetal con una estimación de 30 000 especies pertenecientes a dos reinos florísticos que viven en diez tipos de vegetación (Mittermeier y Goettsch, 1992; Bye, 1998) y de las cuales aproximadamente 9 500 son endémicas (Huerta, 1997).

Desde épocas remotas el hombre ha buscado en el mundo animal y vegetal sustancias útiles para aliviar y curar enfermedades (Cordero, 1996). Una parte fundamental de su evolución ha sido haber desarrollado y ampliado el conocimiento de la diversidad biológica a la que se ha enfrentado para poder subsistir (Caballero, 1990). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población en países en desarrollo consume plantas medicinales para cuidados básicos de la salud (Farnsworth *et al.*, 1985). En México, el uso de estas plantas alcanza niveles muy altos. Se ha calculado un total aproximado de flora medicinal de 3 352 especies (15% de la flora total), lo que representa el 23% de su flora total de angiospermas (Bye, 1998). Esto refleja la diversidad biológica que es conocida y utilizada por grandes núcleos de la población mexicana y representada en la medicina tradicional (Huerta, 1997).

Aproximadamente dos tercios de las 50 000 especies de plantas medicinales utilizadas en el mundo son recolectadas de su hábitat natural y sólo un bajo porcentaje es cultivado. Por esto, hay una creciente preocupación por la disminución de poblaciones naturales de estas plantas, por la pérdida de diversidad genética, extinciones locales y degradación del hábitat. Se calcula que entre 4 000 y 10 000 plantas medicinales están amenazadas (Canter, Thomas y Ernst, 2005). Ante esta situación, cabe recordar que la conservación de los recursos vegetales debe entenderse como el uso racional y sostenido a largo plazo, en particular la conservación de las plantas silvestres no cultivadas que tiene un significado muy grande porque muchas de ellas poseen un valor económico potencial (Caballero, 1990).

En México, el número de especies de plantas medicinales con raíces útiles representan el 10% (Navarro y Avendaño, 2002). Plantas como el barbasco (*Dioscorea mexicana*), la raíz de zacatón (*Muhlenbergia* spp.), la raíz de memela (*Clusia* spp.) y la raíz de pingüica (*Arctostaphylos* spp.), constituyen una importante fuente de ingresos para la población rural de las regiones donde se distribuyen dichas especies, además de que su recolecta está regulada por la norma oficial NOM-004-RECNAT-1996 (Diario Oficial de la Federación, 1996). Sin embargo, la sobre recolección de raíces de plantas silvestres como la valeriana (*Valeriana ceratophylla*), la hierba del manso

(*Iostephane heterophylla*) (Sandoval *et al.*, 2005), la cancerina (*Hippocratea excelsa*), el matarique (*Psacalium decompositum*) y el chuchupate (*Ligusticum porteri*), puede llevar a la extinción local de sus poblaciones debido a su demanda tanto en mercados locales como extranjeros (Bye, 1998).

En México, las especies de la familia Apiaceae son ecológica y económicamente importantes por ser utilizadas como alimento, condimento, saborizantes, como plantas medicinales, de ornamento, de cultivo y algunas como veneno. Estas especies se caracterizan por ser aromáticas debido a los aceites esenciales presentes en ellas, por lo que muchas son utilizadas como condimentos, pero también como remedios, en los que son utilizadas sus inflorescencias en forma de umbelas y sus raíces de almacenamiento napiformes (Calderón, 2001). En México hay 37 géneros de la familia Apiaceae, utilizados principalmente como remedio, alimento y condimento, entre los que destacan, por su papel ambiental y por sus usos, las especies de los géneros *Ligusticum* con uso medicinal y *Petroselinum* con uso medicinal y como condimento.

Ligusticum porteri es una especie silvestre que se distribuye en el norte de México en los estados de Chihuahua, Durango y Sonora en la Sierra Madre Occidental y en el suroeste de Estados Unidos en los estados de Colorado, Wyoming, Idaho, Utah, Nuevo México, Nevada y Arizona en las Montañas Rocallosas. Es una planta silvestre que no se cultiva y que se aprovecha como medicinal y cuya raíz es altamente apreciada por los Tarahumaras como talismán, para rituales religiosos y como remedio contra diversos padecimientos (Linares y Bye, 1987); que también es vendida en México y EU como tintura, pastillas y polvo, lo que ha traído como consecuencia un acelerado consumo y colecta de las poblaciones silvestres que se están agotando. *Petroselinum crispum* es una especie domesticada originaria del este del Mediterráneo, naturalizada en Europa (Gbolade y Lockwood, 1999). En México es cultivada como alimento, condimento, planta medicinal y para el comercio (Martínez *et al.*, 1995).

La raíz de *L. porteri* contiene la ftálide Z-ligustílide como componente mayoritario y a la cual se le atribuye un amplio espectro de actividades biológicas como relajante muscular, neuroprotector, antioxidante, antiesclerótico, antihipertensivo, antiviral, antifúngico y antibacterial, por mencionar algunas y que, además, carece de especificidad y tiene baja potencia sin ser tóxico, lo que lo hace útil y de gran interés para la medicina moderna (Beck y Stermitz, 1995). El hecho de que el compuesto responsable de las actividades biológicas se encuentre en la raíz, enfrenta a esta especie a una fuerte presión de colecta lo que amenaza con extinguir sus poblaciones silvestres ya que su aprovechamiento se basa en la destrucción de la planta para la colecta de la raíz, poniendo en amenaza de extinción a esta especie, sumado a la deforestación de su hábitat, sobrepastoreo, su limitada capacidad reproductiva y la falta de conocimientos sobre su propagación vegetativa y aún sobre la germinación de sus semillas.

En virtud de la escasez de *L. porteri*, la posibilidad de explorar sus respuestas morfogénicas *in vitro* enfrentan una fuerte limitante por lo que estudios semejantes con una especie domesticada de la misma familia como *P. crispum*, arrojarían información que permitirá definir y elegir tratamientos a los que podrían responder morfogénica y biosintéticamente de manera positiva los explantes cultivados de *L. porteri*.

Es por esto que el cultivo de tejidos vegetales de especies nativas ofrece una alternativa biotecnológica para su conservación *ex situ* al reducir la presión de colecta de poblaciones naturales y al ser una fuente alternativa de producción del compuesto, por lo que podrá ser parte de la solución al uso sostenible de *L. porteri*.

ANTECEDENTES

México como país megadiverso

El concepto de biodiversidad se refiere en general a la variabilidad de la vida; incluye los ecosistemas terrestres y acuáticos, los complejos ecológicos de los que forman parte, así como la diversidad entre las especies y dentro de cada especie. La biodiversidad abarca, por lo tanto, tres niveles de expresión de variabilidad biológica: ecosistemas, especies y genes. En estos niveles se integra una amplia gama de fenómenos, de manera que la biodiversidad de un país se refleja en los diferentes tipos de ecosistemas que contiene, el número de especies que posee, el cambio en la riqueza de especies de una región a otra, el número de endemismos, las subespecies y variedades o razas de una misma especie, entre otros (Neyra y Durand, 1998).

En el mundo existen más de 170 países, pero sólo 12 de ellos (Figura 1) son considerados como megadiversos y albergan en conjunto entre 60 y 70% de la biodiversidad total del planeta; México es uno de estos países (Mittermeier y Goettsch, 1992).

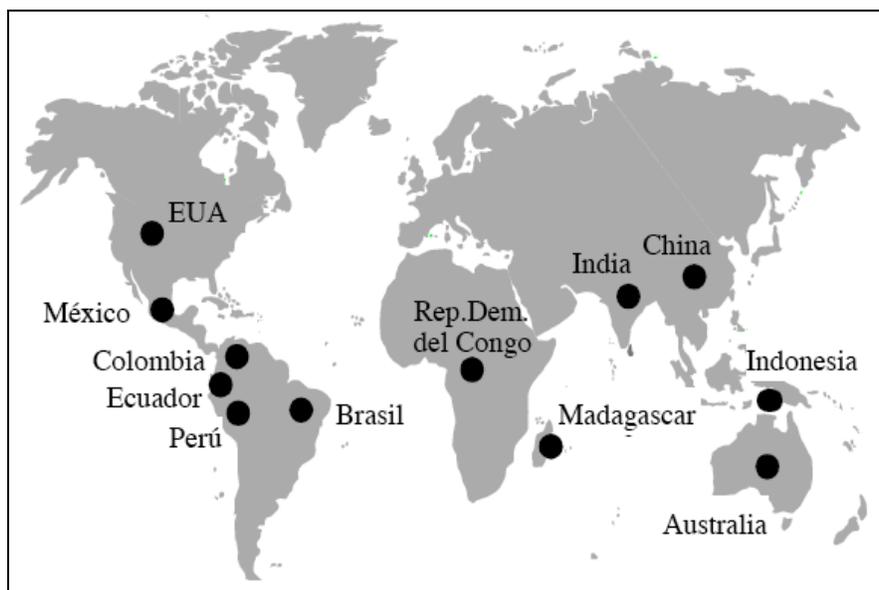


Figura 1. Países con mayor biodiversidad (Neyra y Durand, 1998).

Entre las causas que hacen de México un país de gran diversidad biológica están la topografía, la variedad de climas y una compleja historia tanto geológica y biológica como cultural. Estos factores han contribuido a formar un mosaico de condiciones ambientales y micro ambientales que promueven una gran variedad de hábitats y de formas de vida (Sarukhán *et al.*, 1996).

No es casualidad que México sea el cuarto país megadiverso en el mundo al estar presentes dentro de sus límites políticos 5 tipos de ecosistemas, por ejemplo: bosques de coníferas, pastizales, matorrales, formaciones xéricas y manglares; 9 de los 11 tipos de hábitat, por ejemplo: tropical cálido-húmedo, tropical cálido-subhúmedo, templado húmedo, templado subhúmedo, árido y semiárido y 51 de las 191 ecorregiones identificadas, por ejemplo: bosques de pino y encino de la Sierra Madre Occidental, transvolcánicos y Sierra Madre del Sur, humedales del centro de México, chaparrales costeros de *Salvia*, matorrales de cactus, bosques secos, sabanas de palmas, tundra alpina, matorral xérico (Tabla 1) (Neyra y Durand, 1998).

Tabla 1. Comparación de la riqueza de ecosistemas, hábitats y ecorregiones entre varios países de América Latina (Neyra y Durand, 1998).

<i>Tipos de ecosistemas</i>	México (5/5)	Brasil (5/5)	Colombia (4/5)	Chile (3/5)	Argentina (3/5)	Costa Rica (3/5)
<i>Tipos de hábitats</i>	México (9/11)	Brasil (8/11)	Argentina (6/11)	Colombia (6/11)	Chile (4/11)	Costa Rica (4/11)
<i>Ecorregiones</i>	México (51/191)	Brasil (34/191)	Colombia (29/191)	Argentina (19/191)	Chile (12/191)	Costa Rica (8/191)

Junto con Brasil, Colombia e Indonesia, México se encuentra en los primeros lugares de las listas de riqueza de especies. Ocupa el primer lugar en el mundo en riqueza de reptiles (707), el segundo en mamíferos (439) y el cuarto en anfibios (282) así como en plantas (26 000), además de tener cerca de 111 especies de aves y 163 especies de peces de agua dulce endémicas (Tabla 2). En términos generales se puede decir que en nuestro país se encuentra al menos 10% de la diversidad terrestre del planeta (Neyra y Durand, 1998).

Tabla 2. Países con mayor riqueza de especies de vertebrados y plantas (Neyra y Durand, 1998).

<i>Plantas</i>	Brasil 55 000	Colombia 45 000	China 30 000	México 26 000	Australia 25 000
<i>Anfibios</i>	Brasil 516	Colombia 407	Ecuador 358	México 282	Indonesia 270
<i>Reptiles</i>	México 707	Australia 597	Indonesia 529	Brasil 462	India 433
<i>Mamíferos</i>	Indonesia 519	México 439	Brasil 421	China 410	Zaire 409

Por toda esta biodiversidad, México es el país con mayor diversidad ecológica de América Latina y el Caribe, y uno de los países en donde hay más especies endémicas en América (Neyra y Durand, 1998).

Las plantas vasculares están representadas en México por 2 804 géneros nativos, de los cuales 127 son helechos y plantas afines, 14 gimnospermas, 546 monocotiledóneas y 2 117 dicotiledóneas. Estos géneros se incluyen en 304 familias y a su vez contienen un total de 23 424 especies. Estas cifras no incluyen a las plantas introducidas y naturalizadas, que alcanzan una cifra de 618 especies, repartidas en 355 géneros (Villaseñor, 2004). Las dicotiledóneas (Clase Magnoliopsida) constituyen el grupo más diverso de todas las plantas vasculares, representando 75.5% de la riqueza genérica mexicana (Tabla 3). Le siguen en importancia, en cuanto a número, las monocotiledóneas (Clase Liliopsida) y en menor escala los helechos, briofitas y las gimnospermas (Villaseñor, 2004).

Tabla 3. Familias de plantas vasculares de México con mayor número de géneros (Villaseñor, 2004).

<i>Familia</i>	<i>Número de géneros</i>
Asteraceae	362
Poaceae	166
Orchidaceae	157
Fabaceae	92
Rubiaceae	92
Cactaceae	72
Scrophulariaceae	55
Malvaceae	52
Acanthaceae	47
Brassicaceae	47
Euphorbiaceae	44
Apiaceae	37
Bignoniaceae	36
Apocynaceae	34
Mimosaceae	34
Cucurbitaceae	34
Solanaceae	33
Lamiaceae	31
Rosaceae	30

Domesticación de plantas

Las investigaciones arqueológicas indican que la agricultura se desarrolló en México alrededor del año 7000 a.C. Las crónicas y documentos que datan de los primeros años de la conquista indican que en esa época ya se habían domesticado plantas de gran importancia alimenticia para el mundo como el maíz (*Zea mays*), el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), la calabaza (*Cucurbita* spp.), el camote (*Ipomoea batatas*), los chiles (*Capsicum* spp.), el cacao (*Theobroma cacao*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el cacahuete (*Arachis hypogaea*), la vainilla (*Vanilla planifolia*) y el amaranto (*Amaranthus* spp.). Debido a esto, México es uno de los tres centros más importantes de origen de la agricultura en el mundo junto con Medio Oriente y China (Bye, 1998; Neyra y Durand, 1998). Se estima que más de 118 especies de plantas, pertenecientes a 70 géneros y 39 familias, han sido domesticadas en nuestro país (Hernández-Xolocotzi, 1993). Sin embargo, esta cantidad debe ser aún mayor dado que Hernández-Xolocotzi consideró dicho número de especies como una lista de “plantas representativas”.

Las plantas domesticadas han sido alteradas genéticamente para su desarrollo hasta el punto de que su sobrevivencia depende de la intervención directa y consciente del hombre, a su vez, éste ha modificado su conducta para adecuarla a la de la planta. Este proceso se relaciona con el entorno ecológico, la flora presente, las formas de uso del material producido y las necesidades y adaptabilidad cultural del hombre (Hernández-Xolocotzi, 1998). En contraste, las poblaciones naturales de las especies silvestres están sujetas a la selección natural para una adaptación altamente

específica a su hábitat natural. Éstas han evolucionado en comunidades en relación al suelo y al clima e incluso a otras plantas y animales. Esto significa que en general, las especies silvestres son más difíciles de cultivar que sus congéneres domesticados. En ocasiones, son inapropiadas, improductivas y costosas para su cultivo *ex situ* (Brown *et al.*, 1997; Hawkes *et al.*, 2000).

La Tabla 4 muestra muchos atributos de las plantas silvestres que afectan la facilidad de regeneración de plantas completas en su hábitat comparadas con especies relacionadas que ya están domesticadas. Estos atributos incluyen crecimiento y reproducción junto con aquellos de las fuentes originales. Esta complejidad es debida no solo a los valores generales más altos para cada atributo en plantas silvestres, sino a la variación dentro y entre diferentes especies (Brown *et al.*, 1997).

Tabla 4. Comparación de atributos entre poblaciones naturales y domesticadas (Brown *et al.*, 1997).

<i>Atributo</i>	<i>Especies silvestres en contraste con sus congéneres domesticados</i>	<i>Razón</i>
<i>Crecimiento</i>		
Dormancia de la semilla	Mayor dormancia y longevidad de la semilla	La domesticación selecciona una germinación más homogénea y anticipada
Ciclo de vida	Ciclo de vida más largo, algunas veces son perennes	La domesticación selecciona la madurez temprana
Adaptación	Altamente específica, más sensibles al fotoperíodo	La domesticación selecciona una adaptación más amplia
Madurez	Más indeterminante	La domesticación selecciona la floración y maduración más uniforme
Tamaño individual	Mayor variación en morfología	
<i>Reproducción</i>		
Sistema de cultivo	Mayor diversidad y un sistema más abierto de fertilización	La domesticación a veces hace un cambio en el manejo de la reproducción
Sistema de polinización	Vectores más restringidos	La domesticación selecciona una menor dependencia de polinizadores específicos
Fecundidad de la semilla	A veces menos semillas	Cultivares seleccionados por alta fecundidad
Dispersión de la semilla	A veces más amplia	La domesticación de cultivares selecciona la retención de la semilla y no la dispersión
<i>Fuente</i>		
Diversidad del hábitat	Mayor	Especies domesticadas crecen en medios mas uniformes, benignos y controlados
Estructura de la población	Mayor divergencia local de subpoblaciones	La mezcla de cosechas reduce el alcance para retener estructuras locales espaciales
Flujo genético interpoblacional	Propensas a niveles más altos	Sistemas de cultivo más cerrados de especies domesticadas reduce la contaminación de polen y la necesidad de aislamiento

La familia Apiaceae (Umbelliferae)

La familia Apiaceae ocupa el 12° lugar de 19 familias con mayor número de géneros distribuidos en nuestro país. El género *Ligusticum* está representado por 40-50 especies, de las cuales *L. porteri* es la única especie distribuida en México (Pimenov y Lemonov, 1993).

La familia Apiaceae está compuesta de 455 géneros y 3751 especies. Es cosmopolita de amplia distribución mundial pero estas plantas están mejor desarrolladas en climas templados a temperaturas de 15 a 18°C y en menor grado en los trópicos, la mayoría de las especies tuvieron su origen en el hemisferio norte. La mayoría son especies herbáceas, algunas arbustivas y pocos árboles. Es una de las familias con inflorescencias más conocidas, las características más sobresalientes de estas especies son las inflorescencias en forma de umbela, simple o compuesta, una raíz napiforme, frutos esquizocárpicos característicos y su química distintiva, reflejada en su olor, sabor e incluso en la toxicidad de muchos de sus miembros (Cronquist *et al.*, 1997; Huxley *et al.*, 1999).

La división de la familia Apiaceae, en tres subfamilias Hydrocotyloideae, Saniculoideae y Apioideae y doce subtribus, se propuso hace un siglo por Drude (1897-1898) en *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* y sigue siendo el sistema de clasificación predominante para la familia. Hydrocotyloideae y Saniculoideae son subfamilias pequeñas con 42 géneros con 490 especies y 9 géneros con 325 especies respectivamente, mientras que Apioideae, la subfamilia más grande y taxonómicamente más compleja, tiene 404 géneros con 2935 especies (Plunkett y Downie, 1999; Pimenov y Lemonov, 1993).

El orden Apiales incluye a la familia Apiaceae y a la familia Araliaceae. Tradicionalmente estas dos familias se han estudiado como dos linajes separados que divergieron de un ancestro común, algunas veces llamado como *pro-araliad* y algunos taxa en Apiales como *Myodocarpus*, *Hydrocotyle*, *Klotzschia* y *Mackinlaya* han sido propuestos como *géneros puente* entre estas dos familias, por lo que es de esperarse que ambas familias compartan características fenotípicas, como la morfología de las flores, genotípicas y fitoquímicas, como la presencia de aceites esenciales en canales esquizógenos, poliacetilenos, saponinas triterpénicas y ácidos grasos como el ácido petroselinico en semillas, que además comparten con la familia Asteraceae (Plunkett *et al.*, 1997; Sorensen, 1968; Crowden *et al.*, 1969, Grayer, 1999).

Muchas especies de la familia Apiaceae son cultivadas para alimento, como la zanahoria (*Daucus carota*) o más frecuentemente como especias o condimentos como el apio (*Apium graveolens*), el cilantro (*Coriandrum sativum*), el perejil (*Petroselinum crispum*), el comino (*Carum carvi*), el anís (*Pimpinella anisum*), el eneldo (*Anethum graveolens*) y el hinojo (*Foeniculum vulgare*) (Calderón de Rzedowski, 2001a). Otras especies poseen alcaloides con efectos letales

sobre el sistema nervioso central como la cicuta (*Conium maculatum*) (Aguilar y Zolla, 1982) y como remedio contra diversos padecimientos como *Thapsia garganica* utilizada para el tratamiento de cáncer de próstata, reumatismo, catarros y enfermedades pulmonares (Smitt *et al.*, 1996; Makunga *et al.*, 2003), *Centella asiatica* para el tratamiento de enfermedades de la piel, antipirético, destoxicante y diurético (Solet *et al.*, 1998), *Angelica sinensis* como estimulante de la circulación, regulador de la menstruación, analgésico, para tratar anemia, dolores de cabeza, hipertensión, bronquitis crónica, asma y reumatismo (Shi-Yu y Kuo-Chang, 1989; Hon *et al.*, 1990) y *Ammi majus* para tratar el vitiligo, enfermedades de la piel, psoriasis, micosis, pitiriasis, urticaria, alopecia, eczema atípica (Ekiert, 1993) por mencionar algunos ejemplos.

Problemática en la reproducción de especies de la familia Apiaceae

La familia Apiaceae tiene semillas con un porcentaje muy bajo de germinación debido a la ausencia de embrión que las hace no viables, semillas con embriones rudimentarios que germinan después de un periodo de almacenamiento y semillas con un embrión en estado de dormancia que necesitan estratificación a temperaturas bajas por un periodo de 40 a 95 días (Robinson, 1954) como en el caso de *L. porteri* y *Ferula gummosa* (Nadjafi *et al.*, 2006), con temperaturas de 4.4, 20 y 30 °C por periodos de 6 semanas, 12 horas o 12 semanas, respectivamente (Panter *et al.*, 2004) o generalmente acompañadas con el uso de giberelinas para germinar como en *Apium graveolens* (Bewley y Black, 1994) y en casos como en *Chaerophyllum temulum*, se requieren bajas temperaturas y el uso de giberelinas (Vandelook *et al.*, 2007).

Existen algunos estudios considerados preliminares con *L. porteri* sobre propagación vegetativa en invernadero a partir de cortes de raíces, semillas adheridas a la umbela y cortes de la corona utilizando las auxinas AIB y ANA, obteniendo resultados con AIB (2 500 y 5 000 ppm) (Sondeno y Panter, 2005) o micorrizas con resultados poco significativos (Sondeno y Panter, 2004).

Existe un gran vacío en el conocimiento acerca de la reproducción de la familia y sobre todo de la producción de plantas para su aprovechamiento y comercialización ya que no se han logrado propagar ni por esquejes ni por cultivo de tejidos. Todo esto demuestra la dificultad en el cultivo de especies de esta familia, sobre todo por su reproducción problemática lo que dificulta su propagación y en consecuencia la conservación de estas especies.

Metabolitos secundarios de la familia Apiaceae

Todas las especies de esta familia son aromáticas. Producen aceites esenciales y resinas las cuales son excretadas en canales esquizógenos en las raíces, tallos, hojas, inflorescencias y algunas veces en los frutos. Los aceites esenciales contienen principalmente monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides. Algunos compuestos presentes en los aceites esenciales son sesquiterpenoides de tipo daucano, tipo guaiano y tipo germacrano, ésteres monoterpenoides, aldehídos y ftálicos (Hegnauer, 1971; Heywood, 1971).

Los grupos de metabolitos secundarios presentes en esta familia se muestran en la Tabla 5 con algunos ejemplos que han sido reportados en varias especies así como la presencia de estos compuestos en otras familias.

Desde el punto de vista quimiotaxonómico, la familia Apiaceae es difícil de estudiarse de manera exhaustiva debido al gran número de géneros y especies; sin embargo los metabolitos secundarios más estudiados han sido las furanocumarinas y otros fenilpropanoides, terpenoides, poliacetilenos y ftálicos. Los fenilpropanoides se han encontrado en más de 300 especies estudiadas pertenecientes a las tres subfamilias: Hydrocotyloideae, Saniculoidae y Apioideae. Sin embargo el resto de los metabolitos tienen una distribución más restringida como el caso de los ftálicos encontrados generalmente en la raíces de los géneros *Angelica*, *Apium*, *Cnidium*, *Levisticum*, *Ligusticum*, *Lomatium*, *Meum*, *Conioselinum* y *Petroselinum* (Crowden *et al.*, 1969; Christensen y Brandt, 2006; Heywood, 1971).

Crowden y cols. (1969) hicieron un análisis fitoquímico de 300 especies, que representan el 7.9% de las especies de esta familia. Llegaron a la conclusión de que estas especies pueden ser divididas en dos grupos: aquellas con flavonas, como luteolina, y aquellas con flavonoles como camperol y/o quercetina. Analizaron plantas completas y encontraron que en las semillas de 130 especies, los fenilpropanoides como las furanocumarinas están ampliamente distribuidos en la familia.

El análisis de poliacetilenos presentes en raíces tuvo una distribución más restringida, sólo en las tribus Saniculeae, Scandiceae, Smyrnieae, Apieae, Peucedaneae, Laserpitieae y Dauceae se identificaron estos compuestos como el falcarinol, concluyendo que estos compuestos son de poco interés sistemático a nivel de tribu (Crowden *et al.*, 1969).

Williams y Harborne (1972) realizaron un estudio de los aceites esenciales presentes en los frutos de 24 especies pertenecientes a la tribu Caucalideae, encontrando en su mayoría monoterpenoides como α y β -pineno y limoneno, comunes a los géneros *Daucus* y *Pseudorlaya*, los sesquiterpenoides cariofileno, carotol, daucol, dauceno y caucalol, presentes en los géneros *Daucus* y *Seseli*, y otros compuestos como acetato de geranilo y bifeníl, presentes sólo en el género

Daucus. Estos resultados agrupan a los géneros *Daucus*, *Torilis* y *Orlaya*, siendo *Daucus* el género más variable con una cantidad y variedad de aceites esenciales tanto en especies silvestres y domesticadas.

Tabla 5. Patrón de distribución de metabolitos secundarios en la familia Apiaceae y otras familias botánicas (Heywood, 1971; Crowden *et al.*, 1969; Dewick, 2001).

<i>Tipo de compuesto</i>	<i>Ejemplos</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Presencia en otras familias</i>
Aceites esenciales	Aceite de anís	Ubicuos	Araliaceae, Asteraceae, Pittosporaceae, Burseraceae, Simaroubaceae, Rutaceae
Fenilpropanos	Miristicina, elemicina, anetol, estragol, apiol, asarona, dillapiol	Frecuentes	Myristicaceae, Illiciaceae
Ácidos cinámicos	Ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido rosmarínico	Frecuentes	Rubiaceae, Rosaceae, Asteraceae, Fabaceae, Rutaceae, Bromeliaceae, Poaceae
Furanocumarinas	Umbeliferona, isoimperatorina, angelicina, atamantina, ostrutina, seselina, farnesiferol A, bergapteno, xantotoxina, psoraleno, isopimpinellina	Frecuentes	Rutaceae, Pittosporaceae, Fabaceae, Moraceae
Piranocumarinas	(+/-)-3'-angeloil-4'-acetoxi- <i>cis</i> -kelactona	Frecuentes	Rutaceae
Acetilenos	Falcarinona, falcarinol, oenantotoxina, cicutoxina, aetusina, carbinol	Frecuentes	Araliaceae, Asteraceae, Pittosporaceae, Campanulaceae
Sapogeninas triterpénicas tipo urseno y oleaneno	Asiaticósido	Algunos géneros	Araliaceae, Pittosporaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Ranunculaceae
Flavonoides	Quercetina, camperol, luteolina, apigenina, isoramnetina, crisoeriol, diosmetina, acaetina, cianidina, hesperitina, selinona, apiina	Algunos géneros	Capparaceae, Rosaceae, Theaceae, Alliaceae, Vitaceae, Rutaceae, Brassicaceae, Ranunculaceae, Hamamelidaceae
Ácidos grasos	Ácido petroselinico	Frecuentes	Araliaceae, Geraniaceae
Oligosacáridos	Rafinosa, umbeliferosa, cestosa, centellosa, manitol, ribitol	Frecuentes	Fabaceae, Brassicaceae, Asparagaceae
Ftálicas	<i>Z</i> y <i>E</i> -ligustílica, 3-butilideneftálica, senquiunólidas, diligustílica, wallichílica, levistólida A, angelicina, toquinólida A y B	Pocos géneros	Asteraceae, Gentianaceae, Typhaceae, Loganiaceae, Rosaceae
Terpenoides	α y β -pineno, cariofileno, limoneno, humuleno, α y β -felandreno, <i>p</i> -cimeno, timol, espatulenol, α -copaeno, germacreno D, β -bourboneno, β -eudesmol, citranelol	Frecuentes	Asteraceae, Magnoliaceae, Pinaceae, Piperaceae, Lamiaceae, Poaceae

Los compuestos volátiles, que incluyen ftálicas, hasta ahora se han reportado sólo en algunos representantes de la subfamilia Apioideae (Pimenov y Leonov, 1993), en algunos hongos, bacterias y algunas hepáticas (Lin *et al.*, 2005). Estos compuestos se encuentran en aceites esenciales destilados de hojas, tallos y raíces y son los responsables de la actividad antifúngica y actividad relajante sobre el músculo liso, por mencionar algunas. Muchos de estos compuestos están presentes en esencias altamente valoradas en la industria alimenticia y farmacéutica.

No existen estudios fitoquímicos de las partes aéreas de *L. porteri* o alguna otra especie del mismo género, los estudios se han concentrado en los componentes químicos, principalmente ftálicas y fenilpropanoides, presentes en la raíz y la farmacología de éstos.

Biología de *Ligusticum porteri* y *Petroselinum crispum*

El género Ligusticum L.

El nombre del género se deriva del latín *Ligustikon* o *Ligystikos* y hace referencia a la abundancia de una planta de la familia Apiaceae, probablemente *Levisticum sp.*, que crecía en la región de Liguria, cuyo territorio incluía partes de lo que ahora es el sureste de Francia así como la provincia de Liguria en Italia (Cronquist *et al.*, 1997; Huxley *et al.*, 1999).

El género *Ligusticum* de la familia Apiaceae incluye 25 especies distribuidas en la zona templada del hemisferio norte y oeste, de las cuales 11 especies están distribuidas en Norte América: *L. scothicum* L., *L. tenuifolium* S. Watson, *L. filicinum* S. Wats., *L. porteri* Coulter & Rose (Figura 2), *L. grayi* Coulter & Rose, *L. hultenii* Fernald, *L. canadense* L., *L. californicum* Coulter & Rose, *L. canbyi* Coulter & Rose, *L. apiifolium* (Nutt.) A. Gray y *L. verticillatum* (Geyer) Coulter & Rose (Mathias y Constance, 1944; Pimenov y Leonov, 1993; USDA Natural Resources Conservation Service, 2007).

En Estados Unidos se recolectan *L. filicinum*, *L. tenuifolium* y *L. grayi* además de *L. porteri* con propósitos medicinales y son utilizadas y vendidas con el nombre de “osha” en los mercados. Estas especies se distinguen por la estructura y el número de rayos de la umbela (Cronquist *et al.*, 1997), aunque frecuentemente son confundidas con *Conioselinum scopulorum* (Appelquist, 2005).

Descripción botánica del género Ligusticum
(basada en Cronquist *et al.*, 1997; Mathias y Constance, 1944; observaciones personales)

Hierbas monoicas, perennes. Tallos duros o delgados, erectos, escaposos a caulescentes, sencillos o ramificados, glabros o algo puberulentos. Raíz axonomórfica, perenne, con pocas raíces adventicias desde la corona, fibrosas y coronada sobre la raíz principal. Hojas ternadas y ternadas-pinnadas compuestas a disectadas, pecioladas, membranosas a subcoriáceas, basales o caulinas o totalmente basales; con o sin foliolo ancho bien definido, lineales a obovadas o cuneadas, completa o pinnadas lobadas e incisas; pecíolos cubiertos. Inflorescencia de umbelos compuestos; pedúnculos terminales o laterales, o sólo terminales, rayos pocos a numerosos, esparcidos ascendentes, involucre ausente o de brácteas deciduas inconspicuas; involucelo ausente, o de pocas brácteas o bracteetas estrechas inconspicuas lineales o filiformes más cortas que las flores; pedicelos delgados, esparcidos ascendentes. Flores blancas o algunas veces rosadas; dientes del cáliz evidentes a oscuros; pétalos espatulados a obovados con un ápice inflexible estrecho; estambres 5; ovarios 2; estilos cortos, esparcidos; el estilopodio bajo cónico o casi en forma de cojín; carpóforo bífido en la base. Fruto esquizocarpo de 2 mericarpos, oblongo a ovado o suborbicular, subterete o ligeramente comprimido lateralmente, glabro, costillas evidentes, a veces aladas, aceites resinosos 1-6 en los intervalos, 2-10 en la comisura; mericarpo con una semilla aplanada dorsalmente o subterete en sección transversal, normalmente acanaladas bajo los intervalos, la cara plana a profundamente cóncava, con o sin una cresta central longitudinal. n = 11.



Figura 2. *Ligusticum porteri*. Hunt Institute for Botanical Documentation.
Carnegie Mellon University, Pittsburgh, Pennsylvania.

***Ligusticum porteri* Coulter & Rose**

La clasificación taxonómica de *L. porteri* se muestra en la Tabla 6:

Tabla 6. Taxonomía de *Ligusticum porteri* (Cronquist *et al.*, 1997; Pimenov y Lemonov, 1993).

<i>Reino</i>	Plantae
<i>Subreino</i>	Tracheobionta
<i>Superdivisión</i>	Espermatophyta
<i>División</i>	Magnoliophyta
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Subclase</i>	Rosidae
<i>Orden</i>	Apiales
<i>Familia</i>	Apiaceae
<i>Subfamilia</i>	Apioideae
<i>Tribu</i>	Apieae
<i>Género</i>	<i>Ligusticum</i> L.
<i>Especie</i>	<i>Ligusticum porteri</i> Coulter & Rose

Los sinónimos de *L. porteri* (J.M. Coulter & Rose, Revision of North American Umbelliferae, 86. 1888) son:

- *Ligusticum goldmani* J. M. Coulter & Rose, Proceedings of the Washington Academy of Sciences, 1: 146. 1900.
- *Ligusticum nelsoni* J. M. Coulter & Rose, Proceedings of the Washington Academy of Sciences, 1: 147. 1900.
- *Ligusticum simulans* J. M. Coulter & Rose, Contributions from the U. S. National Herbarium, 7: 135.1900.
- *Ligusticum affine* A. Nelson, Bulletin of the Torrey Botanical Club, 28:223-224. 1901.
- *Ligusticum madrense* Rose, Contributions from the U. S. National Herbarium, 8: 336. 1905.

Descripción botánica de L. porteri

(basada en Mathias y Constance, 1944; Cronquist *et al.*, 1997; Galaviz *et al.*, 1994; Constance *et al.*, 1976; observaciones personales) (Fig. 2 y 3A-I)

Hierba monoica, perenne. Tallo firme, caulescente, ramificado libremente, de 5 a 10 dm de altura (Fig. 3A-B), glabro a través de o la inflorescencia puberulenta. Raíz axonomórfica, perenne, con pocas raíces adventicias desde la corona, fibrosas y coronada sobre la raíz principal (Fig. 3B-C).

Hojas ovadas en el contorno general (Fig. 3E), excluyendo los pecíolos 15-28 cm de largo, 12-20 cm de ancho, 1-3 ternadas-pinnadas, foliolos ovados, mayormente distintos, sésiles a peciolados, 2.5-5 cm de largo, 1-3 cm de ancho, regularmente incididos, los lóbulos obtusos o agudos, completamente o dentados; pecíolos 1-3 dm de largo; hojas caulinas como las basales, con divisiones poco lobadas; pedúnculos firmes, alternados y algunas veces verticilados, 6-30 cm de largo, ligeramente hinchados en el ápice; involucro ausente u ocasionalmente solitario en una bráctea decidua; involucelo ausente o en varias bracteetas lineales, 2-7 mm de largo, igualmente o más cortos que las flores y frutos. Inflorescencia de umbelos compuestos (Fig. 3F), los rayos del umbelo principal generalmente 10 o 13-25, 11-24 rayos, ascendentes, desiguales, 2.5-6 cm de largo; pedicelos ascendentes separados preferentemente estrictos, 5-12 mm de largo. Flores blancas (Fig. 3G). Estambres 5. Ovarios 2. Frutos esquizocárpicos oblongos (Fig. 3H), 5-8 mm de largo, 2-4 mm de ancho, teretes, las costillas estrechamente aladas; 4-6 tubos aceitosos en los intervalos, 8-10 en la comisura. Semillas aplanadas dorsalmente en la sección transversal, acanaladas bajo los tubos. n = 11 (Figura 3I).

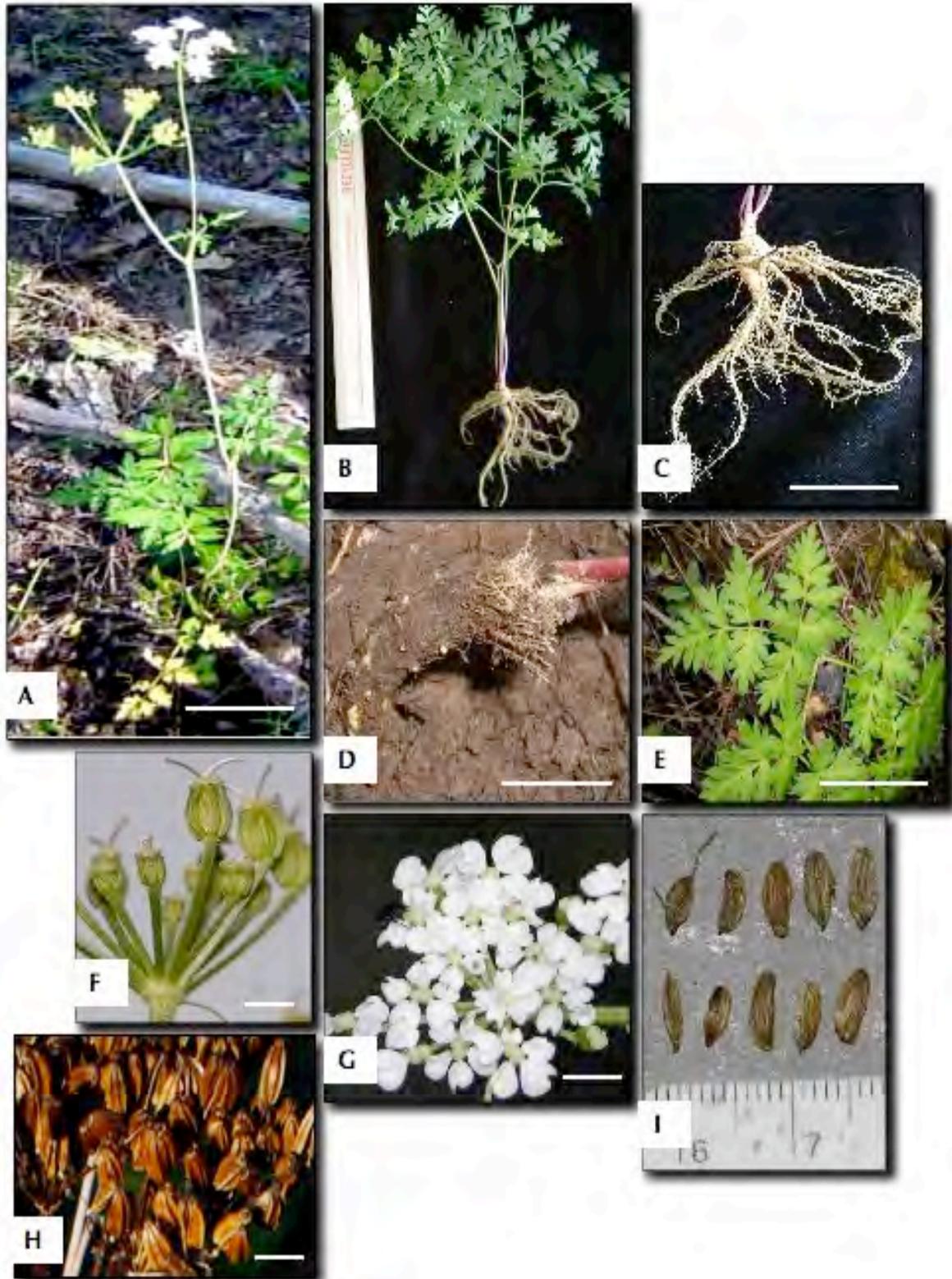


Figura 3. *Ligusticum porteri* Coulter & Rose en Chihuahua, México (Octubre 2005).

A-B. Planta completa (D. Goldhaber), barra: 20 cm, C-D. Raíz (D. Goldhaber), barra: 10 cm, E. Hojas (D. Goldhaber), barra: 10 cm, F. Inflorescencia (R. Bye), barra: 5 cm, G. Flores (R. Bye), barra: 5 cm, H. Frutos (R. Bye), barra: 5 cm, I. Semillas (R. Bye).

Distribución geográfica

Existen 10 especies en Norte América y *Ligusticum porteri* es la especie que se encuentra en el límite sur de su distribución geográfica. Es una especie holártica propia de climas templados con poblaciones en bosques de pino-encino en el norte de la Sierra Madre Occidental en los estados de Chihuahua, Durango y Sonora y en el sur de las Montañas Rocallosas en Estados Unidos en los estados de Colorado, Wyoming, sur de Idaho, sur de Utah, Nuevo México, este de Nevada y sur de Arizona (Mathias y Constance, 1944; Cronquist *et al.*, 1997) (Figura 4) con poblaciones muy pequeñas y muy dispersas en un espacio extenso (Walter y Gillet, 1998).

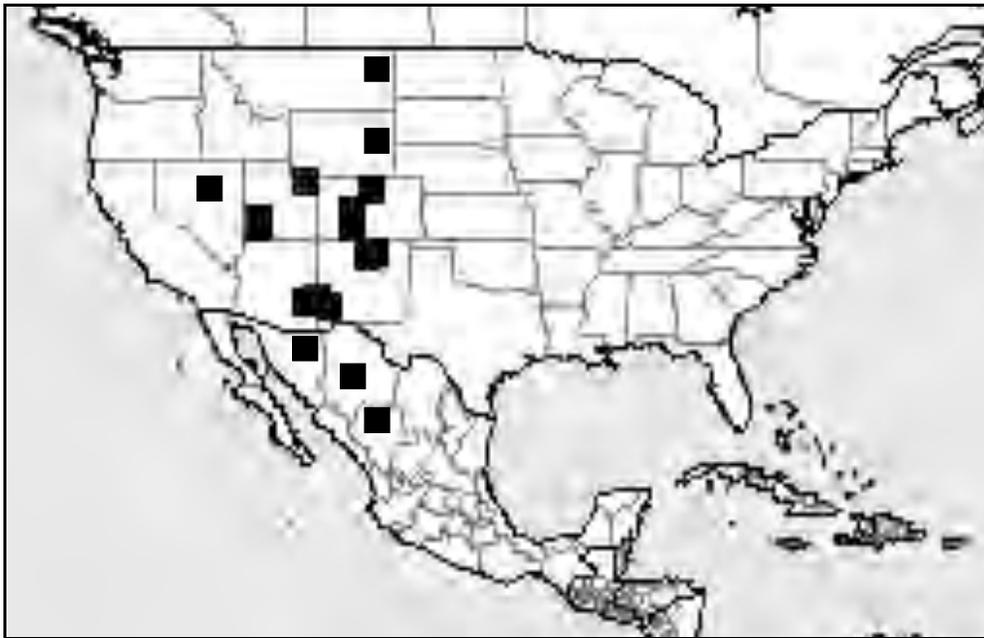


Figura 4. Distribución geográfica de *Ligusticum porteri* en México y Estados Unidos (Modificado de w³ TROPICOS de Missouri Botanical Garden, 2006).

Etnobotánica

Ligusticum porteri es conocida como “chuchupate”, “chuchupaste” “guarica”, “chuchufate” y “chuchupasto” en Chihuahua y el Distrito Federal; “ha-chi-de”, “ha-chi-di” por los Mescaleros Apaches en Nuevo México; “kwimi dechi” por los Zunis en Nuevo México; “osha” en Colorado, Nuevo México; “pah-net-snap” por los Pauite en Utah; “raíz angélica” en Texas; “raíz de cochino”

en Durango; “wadda-e-gopa” por los Puites en Nevada; “wasia” por los Tarahumaras en Chihuahua; “yerba del cochino” en Chihuahua y Durango (Linares y Bye, 1987).

En la antigüedad, la raíz estaba recomendada en Guazápares para el dolor precipitado y cólicos; en Guaguachic para limpiar los oídos con señales de piojos; en Chínipas para dolores generales y en San Buenaventura y Nabogame para la flatulencia y otros desórdenes intestinales. “Chuchupastle” era una planta medicinal para los indígenas Névomes de Sonora. “Chuchupasto” fue registrada entre los indígenas Tepehuanes de Chihuahua. “Chuchupate”, un remedio para cólicos y flatulencia en *Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades* (Esteyneffer, 1978), es probable que se refiera a la *L. porteri* nativa más que a *M. balsamum* de Sudamérica, reportado por Anzures y Bolaños (1978) (Linares y Bye, 1987; Bye, 1986). Es utilizada para quitar el dolor del pulmón causado por trabajar mucho o bien por levantar cosas pesadas cuando la persona se empieza a hacer vieja y que se manifiesta por cansancio, se toma una taza del cocimiento de la raíz, por la mañana, a medio día y por la tarde (Argueta *et al.*, 1994).

La raíz de *L. porteri* es gruesa y con un olor fuerte y muy característico. La infusión de la raíz seca o fresca se consume para aliviar dolores de estómago, cólicos, úlceras y diarreas, como analgésico y remedio contra la bronquitis, neumonía, tuberculosis, resfriados y tos. Las infusiones y extractos alcohólicos se consumen para aliviar la garganta irritada, la infusión se utiliza de manera tópica contra dolores del cuerpo y en baños para el tratamiento de fiebres. La infusión se recomienda para tratar diabetes, problemas de circulación y resacas. La raíz pulverizada se aplica de manera tópica en heridas y cortaduras para prevenir infecciones. En el sur de Colorado y la zona adyacente de Nuevo México, se rasura la raíz seca y se mastica como aperitivo y para mantener la juventud del cuerpo, se ha sugerido que es el equivalente mexicano del ginseng. Se cree que al colocar el cataplasma de la raíz en mordidas de insectos y alacranes, saca el veneno y el cataplasma solo o combinado con pino (*Pinus edulis*) y hojas de “ponche mexicano” (*Nicotiana* sp.) se aplica en áreas del cuerpo con dolores reumáticos, calambres y huesos rotos. La raíz se utiliza como emético mezclada con sal y agua caliente (Linares y Bye, 1987; Appelt, 1985; Ortiz *et al.*, 2007; Bye, 1985).

Las hojas y las raíces pulverizadas de *L. porteri* son valoradas como condimento para carnes y frijoles. En el Valle de San Luis en Colorado, “oshá del jardín” (*Levisticum officinale*) es utilizada como sustituto de “oshá” (Linares y Bye, 1987; Bye y Linares, 1986).

Las infusiones de *L. porteri* son utilizadas en ceremonias rituales-curativas por los Tarahumaras y Zunis (Camazine y Bye, 1980). La raíz es utilizada como talismán para alejar a las brujas y serpientes venenosas así como para dar suerte. Para contrarrestar los efectos del “aire”, el cuerpo completo se soba con la tintura. Los Tarahumaras también utilizan la raíz como piscicida

(Linares y Bye, 1987).

Entre los indígenas Tewa de Nuevo México, la raíz de “osa” era altamente apreciada para tratar diarrea y otros desórdenes gastrointestinales. Robbins y cols. (1916) reportaron que una planta, talvez *Angelica grayi*, tiene una raíz similar a la de *L. porteri* pero sin el olor característico. También indicaron que la raíz se utiliza de manera similar por los indígenas Yavapais y otras tribus en el sur de Arizona y que es un artículo de intercambio entre los Tewa y los vendedores ambulantes mexicanos. Entre los indígenas Pauite del sur de Utah, *L. porteri* (antes identificada como *L. apiifolium* era un remedio popular para el dolor de estómago (Linares y Bye, 1987).

En Sonora, la flora medicinal Pima de Yecora la menciona para “el tratamiento del resfriado, tos, estómago suelto, falta de sueño: se toma una taza de cocimiento de la raíz, en la mañana y en la tarde. Para el tratamiento de las picaduras de alacrán o reumas: se toma un vaso del cocimiento de la raíz, tres veces al día. Para el mal puesto: se reza cuando se está cociendo la raíz y se da una copita a la persona, tres veces al día. También menciona la causa y síntomas de estas enfermedades: el resfriado y la tos se presentan generalmente en tiempos de frío, por el cambio de clima. La falta de sueño puede deberse a que el estómago está muy recargado, porque se ha comido mucho o que la comida tenía mucho chile o grasa. Las reumas se deben a que a la persona le llovió en el campo y se quedó con la ropa mojada y se le secó en el cuerpo, o se acercó al fuego con la ropa mojada. Una persona tiene mal puesto por problemas personales con otras personas, éstas le desean todo mal, si la persona es débil de pensamiento y no tiene fe, se enferma y puede morir. La persona que está tomando la raíz no se debe mojar, si lo hace se le puede hinchar el cuerpo, por lo que se recomienda no coger agua. La raíz se puede coleccionar en cualquier tiempo, pero en octubre es mejor porque ya está “sazona” (Galaviz *et al.*, 1994).

En Durango la infusión de la raíz se bebe para aliviar el dolor de estómago, remedio que también se da a los niños para tratar los cólicos (Argueta *et al.*, 1994).

Los indígenas Zuni del oeste-centro de Nuevo México utilizan la raíz pulverizada en agua fresca aplicada en el cuello e ingerido para aliviar la garganta adolorida. La infusión es aplicada tópicamente para aliviar dolores del cuerpo. En ceremonias curativas, la raíz es masticada por el paciente y el curandero para aliviar varios padecimientos (Camazine y Bye, 1980).

A través de toda su distribución natural, grupos indígenas hispanos y americanos usan y compran “chuchupate”. Más allá de su distribución en el noreste y centro de México, es considerada una medicina efectiva que exige un alto precio (Linares y Bye, 1987).

Fitoquímica

En la raíz de *L. porteri* se han identificado las ftálicas Z-ligustílida, E-ligustílida, (Z)-3-butilideneftálida (Delgado *et al.*, 1992; Cégiéla-Carlioiz *et al.*, 2005), riligustílida, (Z,Z')-rel-(6R,7R)-6.6',7.3a'-diligustílida y Z-8.6',3.7'-diligustílida (Delgado *et al.*, 1988; Reza, 1987), los terpenoides α -pineno, α -felandreno, limoneno, β -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno (Delgado *et al.*, 1992), α -tujeno, sabineno, β -pineno, mirceno, γ -terpineno, *cis*-tujona, 1,2-epóxido de α -felandreno, sabinol, α -terpineol, α -barbateno, β -funebreno, widreno, miristicina, β -barbateno, α -chamigreno, α -eudesmol, 1,3,8-mentatrieno, terpinen-4-ol, 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno, kesano, ligulóxido (Cégiéla-Carlioiz *et al.*, 2005), los compuestos fenólicos isovainillina, ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico (Delgado *et al.*, 1988; Reza, 1987) elemicina, *o*-metileugenol y otros compuestos como pentilbenzeno, timil metiléter, carvacril metiléter, isotujil acetato, sabinil acetato, *trans*-pinocarveil acetato, bornil acetato, 4-vinilguayacol, 4-terpinil acetato, α -terpinil acetato (Cégiéla-Carlioiz *et al.*, 2005).

De otras especies del género *Ligusticum* como: *L. involucratum*, *L. elatum*, *L. multivittatum*, *L. tenuissimum* y *L. seguieri* se han identificado: bergapteno, psoraleno, anomalina, pterixina, kelactona (Appelt, 1985); ácido ferúlico, tetrametilpirazina, coniferil ferulato (Li *et al.*, 2006); quercetina (3-rutinósida y 3-glucósido), luteolina (Crowden *et al.*, 1969); manitol, *trans*-kelactona, β -sitosterol (Kapoor *et al.*, 1972), isoimperatorina, isooxipeucedanina, bergapteno (Lemmich *et al.*, 1971), anomalina, pterixina, selinidina, epoxipterixina, *cis*-kelactona (Gupta *et al.*, 1975), liginvolonas A-D (Shibano *et al.*, 2005), imperatorina, xantotoxina, isopimpinellina, angelicina, umbeliferona, nutralina, *cis*-kelactona, 3'(R),4'(R)-4'senecioil kelactona, 3'(R),4'(R)-3',4'-disenecioil kelactona, (+)-octanoilomatina, (+)-decanoilomatina, (+)-dodecanoulomatina, faltarindiol, ácido ferúlico, (+)-peujaponisina y multivitanas A-D (Kondo *et al.*, 2008). Cabe mencionar que estos compuestos también han sido identificados en especies de los géneros *Cnidium* (Kobayashi *et al.*, 1987), *Meum* (Kaouadji y Pouget, 1986), *Apium* (MacLeod y Ames, 1989) y *Angelica* (Kaul *et al.*, 1996). Los géneros *Cnidium*, *Meum* y *Apium*, que pertenecen a la subfamilia Apioideae y a la tribu Apieae, pueden ser agrupados taxonómicamente desde el punto de vista fitoquímico, y éstos a su vez, agruparse con el género *Angelica* (tribu Angeliceae), debido a que biosintetizan los mismos tipos de compuestos encontrados en raíces y partes aéreas.

Problemática en el aprovechamiento de Ligusticum porteri en México

Mientras que su aprovechamiento se mantuvo como remedio contra males de las comunidades locales, las poblaciones de *L. porteri* se conservaron; sin embargo, ahora han sido y son sumamente afectadas por la acción combinada del aumento de la demanda y la población que han resultado en la colecta indiscriminada de su raíz, además del sobrepastoreo, la pérdida de su hábitat debido a la tala inmoderada de los bosques y su uso se ha extendido a las ciudades del país, lo que ha hecho crecer la presión por la colecta para su comercialización y sobre todo porque su cultivo por métodos agrícolas ha sido muy poco eficiente (CITES, 1999).

Esta especie fue propuesta en 1999 por la Universidad de Maryland dentro del Programa de Desarrollo Sustentable y Biología de la Conservación a la Autoridad Científica del Departamento de Pesca y Vida Silvestre de Estados Unidos para ser incluida en el Apéndice II de CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) debido a la creciente demanda de la planta y a que la industria no distingue entre especies de *Ligusticum*, lo que amenaza también al resto de ellas (CITES, 1999). En México, la norma oficial NOM-004-RECNAT-1996 que trata sobre los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de raíces y rizomas de vegetación forestal no incluye a *L. porteri*.

Además, *L. porteri* está citada como especie “rara” por la Lista Roja de Plantas Amenazadas de 1997 (Walter y Gillett, 1998). Esto significa que *L. porteri* tiene una población mundial pequeña que no está en peligro de extinción o es vulnerable, pero está en riesgo de serlo. Las especies designadas como raras tienen un tipo de hábitat específico, una distribución restringida o se le encuentra ampliamente dispersa en un área muy extensa (Walter y Gillett, 1998). El Fondo para la Vida Silvestre Mundial (World Wildlife Fund) clasificó a las poblaciones de *L. porteri* en declive desde hace 10 años (Robbins, 1999).

El género Petroselinum Hill

El nombre del género viene del griego *Petroselinon*, el nombre del perejil común. Es un género con 8 especies: *P. crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill (Figura 5), *P. dissectum* Benth, *P. hortense* Hoffm., *P. humile* Meisn, *P. peregrinum* Lag., *P. petroselinum* (L.) H. Karst., *P. sativum* Hoffm., y *P. vulgare* Lag. Es un género nativo de Europa y la región del Mediterráneo. En el Valle de México existe sólo una especie, *P. crispum*.

Descripción botánica del género Petroselinum
(basada en Calderón de Rzedowski, 2001; Cronquist *et al.*, 1997; observaciones personales)

Hierbas bianuales. Tallo corto. Una raíz principal, pivotante. Hojas basales pinnadas o ternadas-pinnadas; compuestas o decompuestas; pecioladas, con los pecíolos envainantes en la base; láminas una o más veces o pinnadas, o bien, ternado-pinnadas, los últimos segmentos ovados a lineares, dentados o lobados. Inflorescencias en forma de umbelas compuestas; sobre pedúnculos terminales y axilares; involucre constituido por pocas brácteas inconspicuas o ausente; involucelo de varias bracteolas lineares, cortas; radios pocos a numerosos, extendidos y ascendentes. Flores amarillas o verdoso-amarillentas; dientes del cáliz diminutos u obsoletos; pétalos con el ápice angosto e inflexo; estilos cortos, extendidos, estilopodio bajo, cónico; carpóforo partido hasta la mitad o hasta la base. Fruto esquizocárpico de 2 mericarpos (“semillas”) ovoide a oblongo, aplanado lateralmente, glabros, con las costillas prominentes, filiformes, tubos oleíferos solitarios en los espacios intercostales y dos en la cara comisural. n = 11.

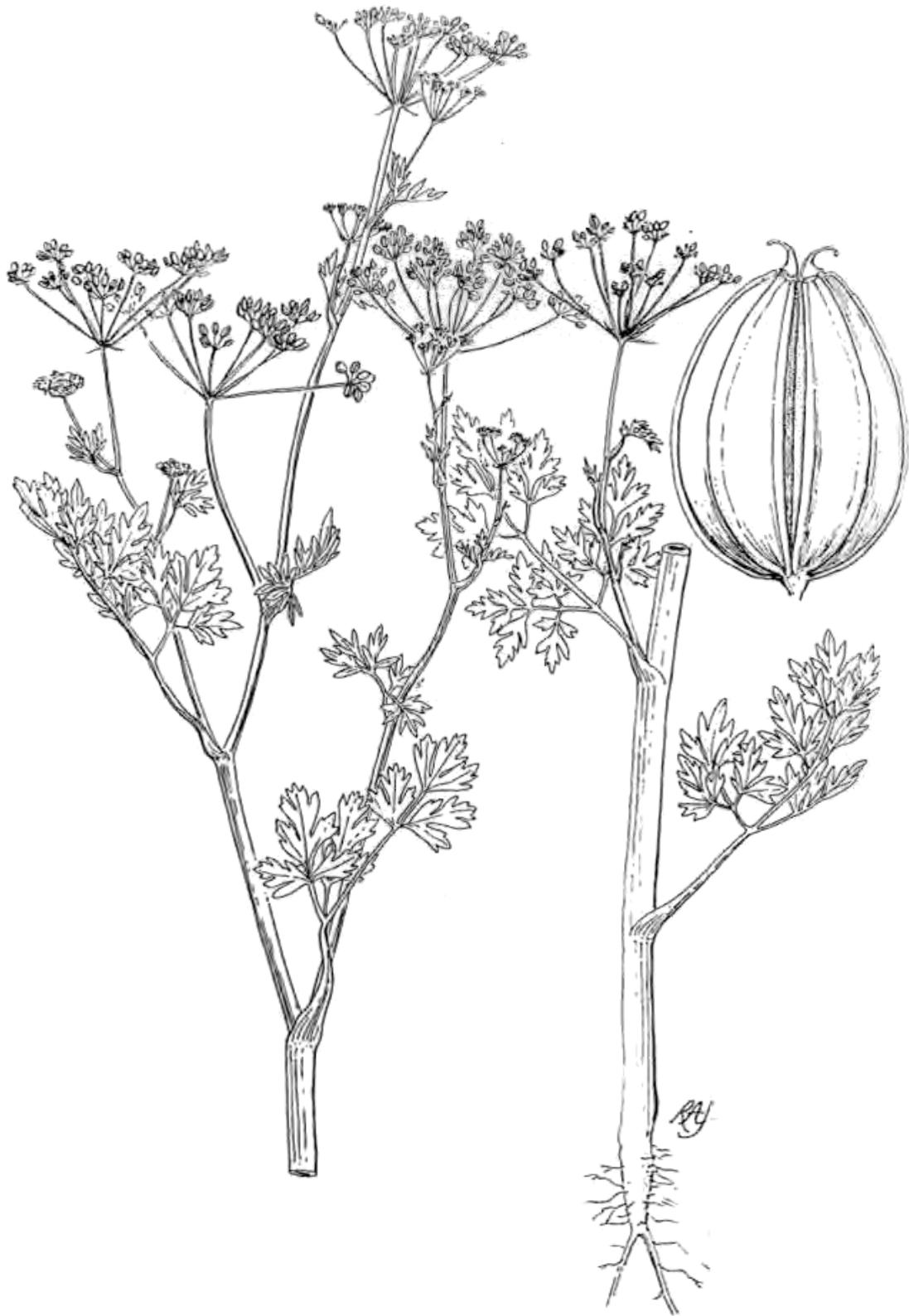


Figura 5. *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A.W. Hill.
(Cronquist *et al.*, 1997).

***Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill**

La clasificación taxonómica de *Petroselinum crispum* se muestra en la Tabla 7:

Tabla 7. Taxonomía de *Petroselinum crispum* (Cronquist *et al.*, 1997; Pimenov y Lemonov, 1993).

<i>Reino</i>	Plantae
<i>Subreino</i>	Tracheobionta
<i>Superdivisión</i>	Espermatophyta
<i>División</i>	Magnoliophyta
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Subclase</i>	Rosidae
<i>Orden</i>	Apiales
<i>Familia</i>	Apiaceae
<i>Subfamilia</i>	Apioideae
<i>Tribu</i>	Apieae
<i>Género</i>	<i>Petroselinum</i> Hill
<i>Especie</i>	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nyman ex A. W. Hill

Descripción botánica de P. crispum

(basada en Calderón de Rzedowski, 2001; Argueta *et al.*, 1994; observaciones personales) (Fig. 5 y 6A-G)

Hierba (Fig. 6A) bianual o anual, glabra, erecta, hasta de 1.3 m de alto. Tallo corto (Fig. 6B). Una sola raíz, larga y de color claro (Figura 6C). Hojas basales (Fig. 6D); hojas inferiores sobre pecíolos de 10 a 20 cm de largo, láminas biternadas o bi a tripinnadas, de 4 a 10 cm de largo y de ancho, foliolos peciolulados, ovados a estrechamente lanceolados, enteros, trífidos, dentados o lobulados, de 2 a 5 cm de largo por 0.5 a 4 cm de ancho; las hojas superiores con los pecíolos más cortos (Fig. 6E), totalmente envainantes y con las divisiones más angostas en general. Inflorescencias en umbelas (Figura 6F) numerosas, terminales y axilares, sobre pedúnculos de 3 a 15 cm de largo, involucre ausente o formado por pocas brácteas enteras, inconspicuas, radios 10 a 20, de 1 a 5 cm de largo, involucelo de 4 a 7 bracteolas lineares o lanceoladas. Flores amarillas (Figura 6G), amarillo-verdosas o blanco-verdosas; fruto ovoide-oblongo, de 2 a 4 mm de largo por 1 a 3 mm de ancho; $n = 11$ (Figura 6H). Originaria de la región del Mediterráneo, está presente en climas cálidos, semisecos, semicálidos y templado desde 200 a 2300 m.s.n.m. Ha sido introducida y cultivada en muchos lugares del mundo; esporádicamente se le encuentra escapada y está adaptada a diferentes condiciones ecológicas.

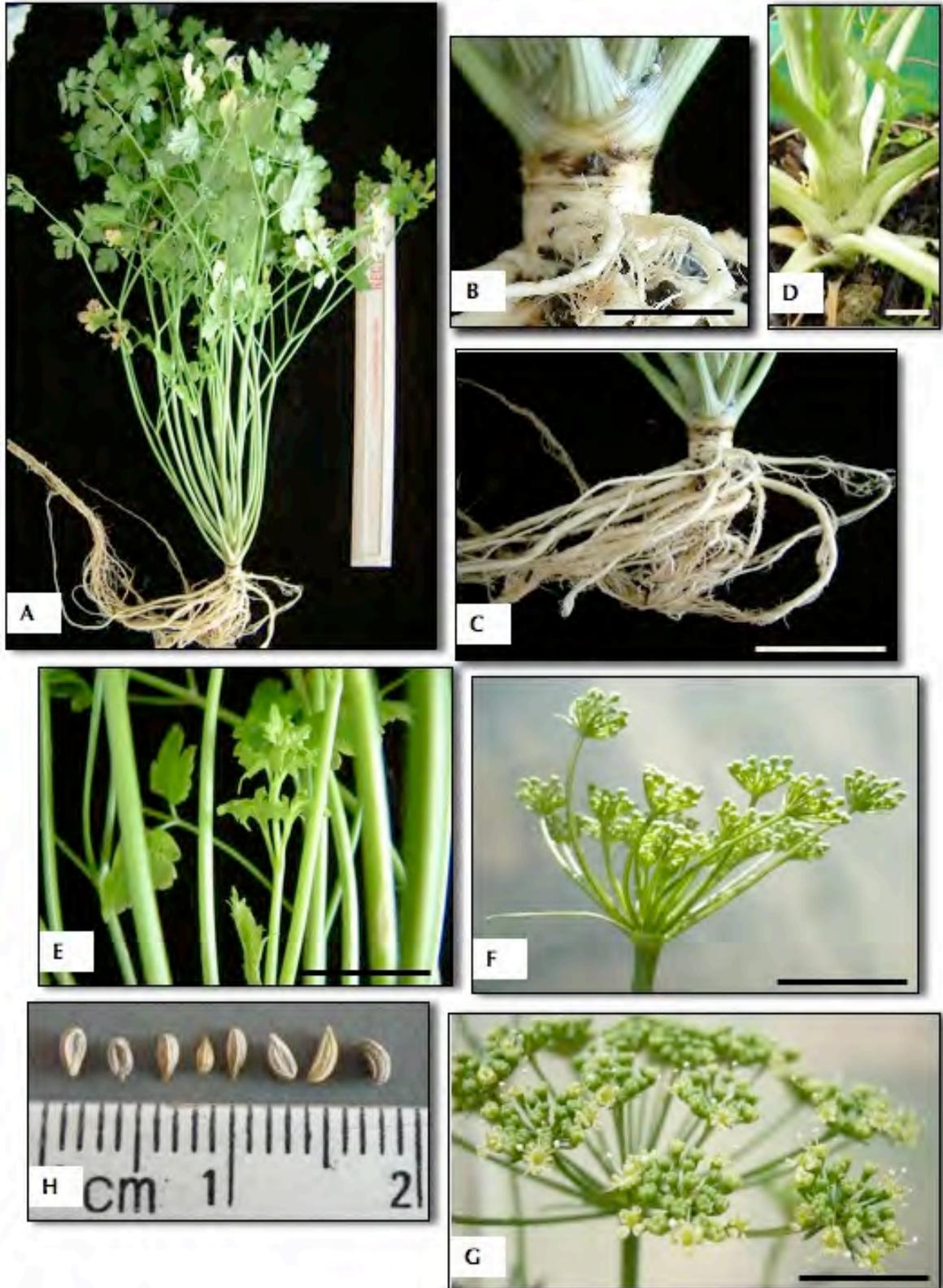


Figura 6. *Petroselinum crispum* A. Planta completa (D. Goldhaber), B. Tallo (D. Goldhaber), barra: 1.5 cm, C. Raíz (D. Goldhaber), barra: 10 cm, D. Hojas inferiores (D. Goldhaber), barra: 5 cm, E. Hojas superiores (D. Goldhaber), barra: 5 cm, F. Inflorescencia (D. Goldhaber), barra: 10 cm, G. Flores (D. Goldhaber), barra: 5 cm, H. Semillas (D. Goldhaber).

Etnobotánica

En el siglo XVII, Gregorio López relata que el perejil “abre y desopila hígado y bazo, provoca orina y menstruación, deshace piedra de vejiga y riñones, disminuye la leche en las que crían, resuelve ventosidades y cura apostemas, sana sarna y postillas, es contra tiricia, alegra y refresca la sangre, calienta los miembros al que está frío y helado” (Argueta *et al.*, 1994).

A inicios del siglo XVIII, Juan de Esteyneffer señala su uso “contra la hidropesía, males de la pituita, desgano de comer, cólera, destemplanza del hígado, obstrucción hepática, hidropesía, calenturas y morbo gálico”. Para el siglo XX, Alfonso Herrera refiere: su utilidad contra la conjuntivitis, también como diurético, antiperiódico y emenagogo y además su uso como condimento. Posteriormente, Maximino Martínez reporta su empleo como afrodisíaco, antiepiléptico, antipirético, diurético, hemostático, hidropesía y para la nefritis. Finalmente, Luis Cabrera la cita como afrodisíaco, diurético y emenagogo (Argueta *et al.*, 1994).

Las hojas frescas del perejil son ampliamente utilizadas como adorno y cortadas, ya sea frescas o secas, para dar un sabor característicamente fuerte a los alimentos en todo el mundo. Todas las partes de la planta son utilizadas en infusiones o tinturas como carminativo, antiespasmódico, diurético (Kreydiyyeh y Usta, 2002), emenagogo, expectorante, antirreumático, antibacterial y antioxidante (Wong y Kitts, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Tradicionalmente, se ha usado para dispepsias flatulentas, cistitis cólica, disuria, tos con bronquitis en gente mayor, dismenorrea, amenorrea funcional, mialgia y específicamente para dispepsia flatulenta con cólicos intestinales (Gbolade y Lockwood, 1999).

En Michoacán y Puebla el perejil es utilizado para el dolor de muelas, con este propósito se hacen buches con el cocimiento de tallos y hojas. En Guerrero se utiliza como diurético, carminativo y emenagogo. Para obtener estos efectos se toma el cocimiento de la planta completa en la comida o se bebe como caldo. De igual forma, se aconseja usarlo cuando hay calor en el estómago o paño en la cara, aunque en este último caso se puede comer crudo, en ensalada.

Por otra parte, para controlar la hemorragia nasal por calor, se emplea la infusión de la planta. Para bajar de peso se toma el jugo de toda la planta. Y como anticonceptivo se bebe el té por tres días seguidos antes de la regla. Además se le utiliza en enfermedades de tipo digestivo como diarrea, cólicos de niños, dolor de estómago, así como para aliviar las postemillas, curar el “espanto” y el “susto”. El perejil, la albahaca y el sauco, se emplean para tratar la “caída de mollera”, con este fin la curandera lava a la criatura con las plantas, después de haberle hecho una “limpia” con romero, sauco y albahaca. En general, esta especie se utiliza para el tratamiento de la bilis, vesícula, bronconeumonía, tosferina, para favorecer la menstruación o retenerla, la “alferecía

de niño”, la circulación, el corazón y “hervor de sangre”, “mal de orín”, la diabetes, cólicos, hemorragia nasal, caspa y el “ataque” (Argueta *et al.*, 1994).

En Puebla, se utilizan los tallos y las hojas en fresco para el “espanto”, “mal de ojo” y ataques. En Pahuatlán, para el “espanto”, se pone a calentar una hoja de plátano húmeda, se coloca encima la hierba del golpe, perejil, toronjil, estafiate, ruda, Santa María y muicle, se tapa por tres minutos, luego se restriega en una bandeja con medio litro de refino, se le da a tomar al enfermo un vasito y lo demás se frota en el cuerpo (Martínez *et al.*, 1995).

El nombre local es perejil, su uso es como especia y medicinal, la parte usada son los tallos y hojas y su distribución en Puebla es en Cuetzalán del Progreso y Pahuatlán, crece en huertos, es de abundancia regular, se cosecha de agosto a septiembre, tiene calidad de planta “caliente” y su vía de administración es oral o local (Martínez *et al.*, 1995).

Fitoquímica

Del aceite esencial de hojas y pecíolos se han identificado los monoterpenoides α y β -pineno, sabineno, *p*-xileno, mirceno, α y β -felandreno, terpinoleno, *p*-mentatrieno (Freeman *et al.*, 1975), timol, *p*-menta-1,3,8-trieno (Simon y Quinn, 1988), α -tujeno, campfeno, sabineno, α y γ -terpineno, limoneno, *cis* y *trans*- β -ocimeno, *p*-cimeno, α -terpinoleno, α -cubebeno, β y γ -elemeno, α -terpineol, α y β -terpineno; los sesquiterpenoides γ -cadineno, β -bisaboleno, δ -cadinol, β -cariofileno, α -copaeno, sesquifelandreno, miristicina, apiol, elemicina, criptona (MacLeod *et al.*, 1985) y carotol (Karting *et al.*, 1972); las furanocumarinas psoraleno, bergapteno, xantotoxina, isopimpinlina, isoimperatorina, oxipeucedanina, hidrato de oxipeucedanina, saxalina, graveolona (Beber *et al.*, 1994; Chaudhary *et al.*, 1986); el flavonoide quercetina (Crowden *et al.*, 1969); los alcoholes *cis*-hex-3-en-1-ol, etanol y metanol (Freeman *et al.*, 1975); los componentes azufrados sulfuro de dimetilo, disulfuro de carbono, disulfuro de dimetilo; los hidrocarburos aromáticos benceno, tolueno, etil benceno, *o* y *p*-xileno, 4-isopropenil-1-metilbenceno, cumeno, naftaleno, 4-propan-2-ol-2-il-tolueno (Simon y Quinn, 1988; Karting *et al.*, 1972); los aldehídos fenilacetaldehído, hexanal (MacLeod *et al.*, 1985), *trans*-2-hexenal, y 2,4-decadienal y el compuesto orgánico benzoato de bencilo (Karting *et al.*, 1972).

Del aceite esencial de los frutos son varios los metabolitos que se han identificado: las furanocumarinas oxipeucedanina, isoimperatorina, imperatorina, psoraleno (Ceska *et al.*, 1987). Del aceite esencial de las semillas se han identificado los sesquiterpenos crispano, crispanona (Spraul *et*

al., 1992) y heraclenol (Kato *et al.*, 1978). Del aceite esencial de la raíz se han identificado los alcoholes poliacetilénicos falcarinol y falcarindiol (Nitz *et al.*, 1990); los monoterpenos α y β -pineno y los fenilpropanoides miristicina y apiol (Lamarti *et al.*, 1991); los sesquiterpenoides crispano y crispanona (Spraul *et al.*, 1992) y la furanocumarina oxipeucedanina (Chaudhary *et al.*, 1986)

Metabolitos secundarios

Las plantas han sido utilizadas durante siglos por diversos grupos humanos para tratar diversos padecimientos ya que representan la principal fuente de productos naturales que producen efectos terapéuticos importantes en el cuerpo humano. Estos productos naturales o metabolitos secundarios representan un recurso para el desarrollo de nuevos fármacos (Rao y Ravishankar, 2002).

Las vías metabólicas primarias que dan origen a los compuestos primarios: aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos carboxílicos, etc., suministran un número sorprendentemente reducido de moléculas fundamentales, las cuales, a través de las mismas o similares vías de biosíntesis, dan origen a otro tipo de compuestos que por sus características particulares y específicas se denominan *metabolitos secundarios*. Éstos se caracterizan por la gran heterogeneidad de su estructura química, su distribución restringida, su formación por medio de enzimas codificadas por material genético especial, el control estricto de su biosíntesis, la compartimentación de enzimas, precursores, intermediarios y productos involucrados en su biosíntesis, almacenamiento y desintegración, la expresión de este metabolismo como un aspecto de especialización celular, o bien, de la formación de nuevas células especializadas que se integran en los programas de diferenciación y desarrollo del organismo productor, la importancia relativa para la célula sintetizadora como tal, y la mayor importancia para el organismo como un todo y la falta de continuidad filogenética en muchos de ellos (Anaya, 2003).

Sin embargo, algunas de las características anteriores pueden ser aplicables a ciertos compuestos primarios como las proteínas; por ello, en algunos casos, es sumamente difícil establecer una frontera definida entre metabolitos primarios y secundarios, por ejemplo, existen muchos aminoácidos poco comunes, que deben ser considerados como metabolitos secundarios, por el contrario, muchos de los compuestos considerados como secundarios se encuentran presentes en todas las plantas y son esenciales para su sobrevivencia (Anaya, 2003).

Respecto a los precursores de los metabolitos secundarios, éstos se pueden derivar del *ácido shiquímico*, es precursor de muchos compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos aromáticos, ácidos cinámicos y ciertos polifenoles; los aminoácidos *ornitina*, *alanina*, *lisina*, *fenilalanina* y *triptófano*, entre otros compuestos, dan origen a los alcaloides, y el *acetato*, es precursor de poliacetilenos, polifenoles, flavonoides, naftalenos, antracenos e isoprenoides a través de rutas biosintéticas separadas (Anaya, 2003; Valencia 1995).

Los metabolitos secundarios desempeñan un papel ecológicamente importante. Son moléculas que acarrear información del organismo hacia el medio, particularmente hacia otros organismos (Anaya, 2003). En el caso de las plantas, los metabolitos secundarios pueden servir como atrayentes para polinizadores, servir como defensa, protección o químicos de ataque contra microorganismos, insectos y herbívoros e incluso contra otras plantas como herbicidas (Verpoorte *et al.*, 2000).

Sin embargo, la disponibilidad de los metabolitos secundarios es un factor limitante debido a dos causas básicas: *intrínsecas o endógenas* donde intervienen factores inherentes a la genética del organismo vegetal, el estado fisiológico y de desarrollo, y *extrínsecas o exógenas*, con factores inherentes a las condiciones del medio en que crece la planta como la sobreexplotación, mal manejo de las fuentes naturales, al sobrepastoreo, al continuo cambio en los ecosistemas y sobre todo al rápido crecimiento poblacional humano que han puesto en peligro de extinción o han extinguido ya a muchas especies vegetales (Chrispeels y Sadava, 1994; Valencia, 1995; Oskman-Caldentey e Inze, 2004).

Por estas razones la búsqueda de nuevas alternativas para la producción de compuestos útiles de origen vegetal y estudios biotecnológicos, específicamente el cultivo de tejidos vegetales, tienen potencial para darle valor agregado a la agricultura tradicional respecto a la producción de metabolitos bioactivos vegetales, ya que ofrecen la oportunidad de explorar las células, tejidos, órganos o el organismo completo para cultivarlos *in vitro* y llegar a manipularlos genéticamente para obtener estos compuestos. Además del interés comercial, los cultivos celulares de vegetales son un sistema modelo muy útil para estudiar la biosíntesis de metabolitos secundarios (Verpoorte *et al.*, 2000).

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son comercialmente importantes porque sirven de base en los perfumes naturales y en especias y como saborizantes en la industria alimenticia. Las familias botánicas ricas en aceites esenciales son: Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae, Brassicaceae, Liliaceae y Apiaceae (Harborne, 1973).

Estos compuestos pueden actuar como repelentes de insectos, animales o parásitos, previniendo la destrucción de las flores y hojas, pueden desempeñarse como atrayentes de insectos para la polinización o en algunos casos ejercer el papel de reservas para la planta, para sellar heridas o como protección contra la evaporación excesiva de agua (Tyler *et al.*, 1988; Guenther, 1942).

Los constituyentes químicos de los aceites esenciales se pueden dividir en dos clases generales basados en su origen biosintético: (1) derivados de terpenos formados por la ruta acetato-ácido mevalónico y (2) compuestos aromáticos formados por la vía del ácido shiquímico-fenilpropanoide (Tyler *et al.*, 1988). Los terpenos presentes en aceites esenciales pueden dividirse en mono y sesquiterpenos e isoprenoides C_{10} y C_{15} ; y los monoterpenos se pueden dividir a su vez en acíclicos (geraniol), monocíclicos (limoneno) o bicíclicos (α y β -pineno), y dentro de cada grupo, los monoterpenos pueden ser hidrocarburos insaturados (mentol) o tener grupos funcionales y ser alcoholes (mentol), aldehídos o cetonas (mentona y carvona) (Harborne, 1973).

Prácticamente, todos los aceites esenciales consisten de mezclas químicas que generalmente son muy complejas y varían en composición. Casi cualquier tipo de compuesto orgánico puede encontrarse en ellos como hidrocarburos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, óxidos, éteres, entre otros, y sólo algunos aceites esenciales poseen un solo componente en alto porcentaje como el aceite de mostaza (93% de alilisotiocianato) o el aceite de clavo (85% eugenol) y sin embargo, no es difícil encontrar aceites con más de 200 componentes (Tyler *et al.*, 1988). Muchas plantas medicinales son utilizadas por su contenido de aceites esenciales como la manzanilla (*Matricaria sp.*), la menta (*Mentha sp.*), el eucalipto (*Eucalyptus sp.*), el pino (*Pinus sp.*), aceites de cítricos (*Citrus sp.*), anís (*Pimpinella sp.*), comino (*Cuminum sp.*), eneldo (*Anethum sp.*) y alcaravea (*Carum sp.*) (Harborne, 1973).

Terpenoides

Este grupo de compuestos se producen a partir de acetil-CoA por dos rutas: la ruta del ácido mevalónico o la ruta del metilertitriol fosfato, y están formados por unidades de isopreno (C_5H_8)_n en una cadena linear. Esta cadena puede ciclarse dando origen a una gran variedad de terpenos cíclicos (Anaya, 2003).

Los terpenoides se dividen según el número de unidades de isopreno que contenga su molécula. Estos grupos son los siguientes (Anaya, 2003; Romo de Vivar, 1985):

1. Hemiterpenoides (C_5), formados por una unidad de isopreno (alcohol dimetilalílico, isopentenol, alcohol isoamílico);
2. Monoterpenoides (C_{10}), formados por dos unidades de isopreno (geraniol, mentol, timol);
3. Sesquiterpenos (C_{15}), formados por tres unidades de isopreno (farnesol, bisabolol, cariofileno, copaeno);
4. Diterpenoides (C_{20}), formados por cuatro unidades de isopreno (ácido abiético, giberelinas)
5. Sesterterpenoides (C_{25}), formados por cinco unidades de isopreno (constituyentes de extractos de lípidos insaponificables);
6. Triterpenoides (C_{30}), formados por seis unidades de isopreno (escualeno, esteroides);
7. Tetraterpenoides (C_{40}), formados por ocho unidades de isopreno (carotenos, xantofilas);
8. Politerpenoides (C_n), formados por más de ocho unidades de isopreno (hule, guatapercha, solanesol, espadicol).

En la ruta del ácido mevalónico, a partir de la unión de tres moléculas de acetil-CoA, se forma el ácido mevalónico que se pirofosforila, descarboxila y se deshidrata para dar isopentenil pirofosfato

(IPP), que es la molécula a partir de la cual se formarán los terpenos. En la segunda ruta, que opera en cloroplastos y otros plástidos, el IPP puede formarse también a partir de intermediarios de la glicólisis. El gliceraldehído-3-fosfato y dos átomos del piruvato se condensan y forman el 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato, que después de un rearrreglo y una reducción a 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato, es convertido a IPP (Taiz y Zeiger, 2006).

El IPP puede combinarse con una unidad de isopreno o dimetilalil difosfato (DMAPP) para dar geranyl difosfato (GPP) que da origen a los monoterpenos. El GPP se une a otra molécula de IPP y da lugar al farnesil difosfato (FPP) que da origen a los sesquiterpenos y triterpenos; y la adición de otra molécula de IPP da lugar al geranylgeranyl difosfato (GGPP) que es el precursor de los diterpenos; y finalmente, FPP y GGPP se dimerizan para dar origen a los triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Taiz y Zeiger, 2006).

Los terpenoides son el grupo de metabolitos secundarios más numeroso y están ampliamente distribuidos en microorganismos, plantas y animales. Muchos de ellos tienen funciones de defensa para la planta como los piretroides, presentes en las hojas y flores de *Chrysanthemum*, que tienen actividad insecticida, y los limonoides, con actividad antiherbívora, y característicos por su sabor amargo en frutos de cítricos (Taiz y Zeiger, 2006).

Fenilpropanoides

Estos metabolitos secundarios se derivan de la fenilalanina, que se forma a partir de la ruta del ácido shiquímico, la cual también da origen a los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano. Esta ruta convierte carbohidratos sencillos precursores derivados de la glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato en aminoácidos aromáticos (Anaya, 2003; Taiz y Zeiger, 2006).

Las estructuras de estos compuestos van desde simples fenilpropanoides como el ácido *trans*-cinámico, el ácido *p*-cumárico y sus derivados como el ácido caféico y el ácido vainílico; fenilpropanoides lactónicos (ésteres cíclicos) como las cumarinas y los derivados del ácido benzóico como el ácido gálico. La combinación de la ruta del ácido shikímico con la ruta del acetato da origen a la biosíntesis de, estirilpironas, flavonoides, estilbenos, flavolignanós e isoflavonoides (Taiz y Zeiger, 2006; Dewick, 2001).

La desaminación de la fenilalanina es catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) y da lugar al ácido cinámico, a partir del cual se derivan los ácidos benzóicos. Esta enzima es el punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario. La actividad de esta enzima aumenta en situaciones de estrés para la planta como niveles bajos de nutrientes, luz e infección fúngica, que estimula la biosíntesis de compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger, 2006).

A partir del ácido *p*-cumárico se derivan fenilpropanoides simples, cumarinas y los precursores de la lignina. Con la adición de un acetil-CoA se forma el *p*-cumaroil-CoA, que da origen a precursores de ligninas. La adición de tres moléculas de malonil-CoA, catalizada por la enzima chalcona sintasa, da lugar a las chalconas, flavanonas, que originan a las flavonas e isoflavonas, y dihidroflavonoles que dan origen a los flavonoles, antocianinas y taninos condensados (Taiz y Zeiger, 2006; Buchanan *et al.*, 2000; Dewick, 2001).

Estos compuestos representan el 40% del carbono orgánico que circula en la biosfera. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias pero no en animales. Las plantas lograron adaptarse evolutivamente a la vida terrestre en parte por la producción masiva de compuestos fenólicos. Aunque la mayoría de éstos tienen papeles estructurales en la pared celular como la lignina, muchos de ellos tienen papeles de defensa contra herbívoros, insectos y hongos, limitando el crecimiento de otras plantas, dando características a ciertas maderas para conferirles durabilidad, dan el color a las flores y por lo tanto son atractivos de animales e insectos, protegen de los rayos UV absorbiendo la luz de onda corta y contribuyen a ciertos sabores y olores (Taiz y Zeiger, 2006; Buchanan *et al.*, 2000).

Acetogeninas

Las acetogeninas comprenden más de 1 000 compuestos cuya biosíntesis es similar a la de las grasas, aunque en las acetogeninas generalmente se alternan un metileno con un carbonilo ($-\text{CH}_2-\text{CO}$)_n (Anaya, 2003).

Las acetogeninas o policétidos, provienen de la condensación de varias unidades de acetato. Forman compuestos de cadena abierta que, por posterior aromatización, originan sustancias fenólicas con funciones oxigenadas alternadas (Gros *et al.*, 1985).

La unidad acetato es en realidad un ácido acético rico en energía, la acetil coenzima A ($\text{CH}_3\text{CO-SCoA}$), es decir, el resto acetilo se encuentra unido a la enzima formando un tioéster (Gros *et al.*, 1985).

La combinación de unidades de acetato difiere de las conocidas auto condensaciones de la química orgánica, no sólo en la naturaleza de la unidad de acetato, sino en que la dimerización transcurre enzimáticamente debido a una transformación de valor termodinámico: la acetil coenzima A se convierte primero en la malonil coenzima A mediante carboxilación enzimática y luego genera un compuesto con un metileno activo. Esta unidad de tres carbonos se condensa con otra unidad de acetil-CoA, de dos carbonos, en simultánea descarboxilación, lográndose como resultado final la condensación de dos unidades de acetato, se repite el proceso con condensaciones cabeza-cola con otras moléculas de malonil-CoA (Gros *et al.*, 1985) (Figura 7).

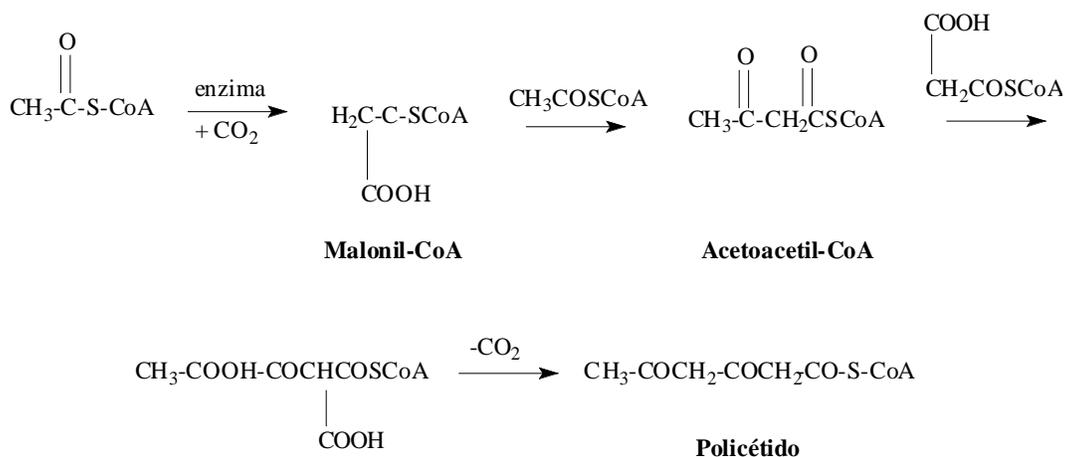


Figura 7. Origen biosintético de las acetogeninas (Gros *et al.*, 1985).

Así se originan sustancias policetometilénicas que forman compuestos no saturados de cadena abierta por reducción total o parcial de los grupos ceto e hidroxilos y deshidratación posterior, o bien se ciclizan. Estas etapas de la aromatización enzimática no se conocen bien, pero como se ha podido comprobar la presencia de policétidos en forma libre se supone que tienen lugar en la enzima sintetasa y permanecen unidos covalentemente a ella hasta que se estabilizan por ciclización (Gros *et al.*, 1985; Anaya 2003).

La molécula desprendida de la enzima experimenta enseguida una serie de reacciones: reducción, oxidación, introducción de hidroxilos, O y C metilaciones, O y C glicosidaciones y C prenilaciones (Gros *et al.*, 1985; Anaya 2003).

La principal fuente de diversidad de las acetogeninas deriva de lo siguiente (Gros *et al.*, 1985; Anaya 2003):

- La posibilidad que tiene la cadena de estos compuestos de ciclizarse de formas distintas, usualmente esta ciclización da origen a un anillo de benceno;
- Del número variable de unidades malonil que intervienen en su formación;
- De la amplia variedad de transformaciones de los esqueletos básicos.

Ftálidas

Las ftálidas, comprendidas dentro del grupo de las acetogeninas, son metabolitos secundarios volátiles y constituyentes únicos de las tribus Apieae, Angeliceae, Coriandreae y Peucedaneae. Se han identificado más de 180 ftálidas de origen natural, de las cuales 137 han sido aisladas de plantas. Muchas de ellas son biológicamente activas y tienen un amplio espectro de efectos farmacológicos, que incluyen actividad sobre el sistema nervioso central, anti-angina, prevención de la agregación de plaquetas, antiproliferativos de músculo liso, prevención de trombosis, modulación de la función cardíaca y protección contra isquemia cerebral (Lin *et al.*, 2005).

Tienen la estructura general 1(3H)-isobenzofuranona, en la cual el anillo A puede estar parcial o totalmente saturado y con la presencia de sustituyentes. En el anillo lactónico se pueden presentar dos posibilidades: una en la que $R_1 = H$ y $R_2 =$ alquilo y otra en la que R_1 y R_2 representen un grupo alquilideno (Figura 8) (Gijbels *et al.*, 1979; Lin *et al.*, 2005).

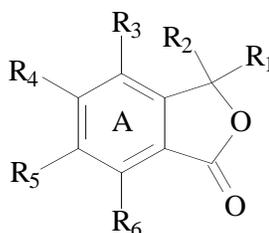


Figura 8. Fórmula estructural de una ftálida.

Todas las ftálidas de origen natural son derivadas de 1(3H)-isobenzofuranona. Sus estructuras pueden tener la estructura principal con uno o más grupos en diferentes posiciones o contener una forma reducida, dos dobles enlaces en el anillo A o no tenerlos y varias sustituciones en diferentes posiciones (Lin *et al.*, 2005).

A partir del género *Ligusticum* se han aislado más de 60 ftálidas pertenecientes a 15 especies, por ejemplo, a partir de *L. chuanxiong* se han aislado 40 y a partir de *L. wallichii* 27. Del género *Angelica* se han aislado 38 de 9 especies, una de ellas *A. sinensis*, de la cual se han aislado 28 y de *Levisticum officinale* se han aislado 20 (Lin *et al.*, 2005; Beck y Chou, 2007). Algunos ejemplos de éstas y su distribución taxonómica dentro de la familia Apiaceae se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Géneros de la familia Apiaceae que biosintetizan ftálicas.

<i>Familia</i>	<i>Subfamilia</i>	<i>Tribu</i>	<i>Especie</i>	<i>Referencia</i>	
Apiaceae	Apioideae	Apieae	<i>Apium graveolens</i>	MacLeod <i>et al.</i> , 1988; Kitajima <i>et al.</i> , 2003; Gijbels <i>et al.</i> , 1985	
			<i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i>	MacLeod y Ames, 1989	
			<i>Apium graveolens</i> var. <i>rapaceum</i>		
			<i>Cnidium officinale</i>	Tsukamoto <i>et al.</i> , 2005; Kwon y Ahn, 2002; Gijbels <i>et al.</i> , 1981	
			<i>Conioselinum kamtschaticum</i>	Gijbels <i>et al.</i> , 1979	
			<i>Levisticum officinale</i>	Santos <i>et al.</i> , 2005	
			<i>Ligusticum acutilobum</i>	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1963	
			<i>Ligusticum acutilobum</i> var. <i>sugiyamae</i>		
			<i>Ligusticum chuanxiong</i>	Naito <i>et al.</i> , 1992ab	
			<i>Ligusticum filicinum</i>	Gillespie y Duszynski, 1998	
			<i>Ligusticum glaucescens</i>	Chen y Yang, 2006	
			<i>Ligusticum hulthenii</i>	Meepagala <i>et al.</i> , 2005	
			<i>Ligusticum jeholense</i>	Yook <i>et al.</i> , 1997	
			<i>Ligusticum jeholense</i> var. <i>tenuisectum</i>		
			<i>Ligusticum mutellina</i>	Passreiter <i>et al.</i> , 2005	
			<i>Ligusticum porteri</i>	Delgado <i>et al.</i> , 1988	
			<i>Ligusticum sinense</i>	Yook <i>et al.</i> , 1997	
			<i>Ligusticum tenuifolium</i>	Gillespie y Duszynski, 1998	
			<i>Ligusticum tenuissimum</i>	Yook <i>et al.</i> , 1997	
			<i>Ligusticum officinale</i>		
	<i>Ligusticum wallichii</i>	Pushan <i>et al.</i> , 1984; Ogawa <i>et al.</i> , 1989			
	<i>Meum athamanticum</i>	Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2004; Tesso <i>et al.</i> , 2006			
	<i>Petroselinum crispum</i> var. <i>tuberosum</i>	Gijbels <i>et al.</i> , 1985			
	Angeliceae	Apioideae	Apieae	<i>Angelica acutiloba</i>	Miyazawa <i>et al.</i> , 2004; Tsuchida <i>et al.</i> , 1987
				<i>Angelica acutiloba</i> var. <i>sugiyamae</i>	Lin <i>et al.</i> , 2005
				<i>Angelica anomala</i> var. <i>chinesis</i>	Gijbels <i>et al.</i> , 1979
				<i>Angelica carmichaeli</i>	Lin <i>et al.</i> , 2005
				<i>Angelica dahuricae</i>	Lin <i>et al.</i> , 2005
				<i>Angelica glauca</i>	Kaul <i>et al.</i> , 1996
				<i>Angelica pubescentis</i>	Lin <i>et al.</i> , 2005
				<i>Angelica sinensis</i>	Lao <i>et al.</i> , 2004; Lin <i>et al.</i> , 1998
				<i>Angelica tenuissima</i>	Lin <i>et al.</i> , 2005
				<i>Angelica teruata</i>	
	Peucedaneae	Apioideae	Apieae	<i>Anethum graveolens</i> var. <i>graveolens</i>	Fischer y Gijbels, 1987
				<i>Anethum graveolens</i> var. <i>sowa</i>	
				<i>Capnophyllum peregrinum</i>	Gijbels <i>et al.</i> , 1984
				<i>Lomatium californicum</i>	Meepagala <i>et al.</i> , 2005
				<i>Lomatium dasycarpum</i>	Asuming <i>et al.</i> , 2005
				<i>Lomatium dissectum</i> var. <i>dissectum</i>	Bairamian <i>et al.</i> , 2004
				<i>Lomatium lucidum</i>	Asuming <i>et al.</i> , 2005
				<i>Lomatium macrocarpum</i>	
				<i>Lomatium rigidum</i>	Beauchamp <i>et al.</i> , 2004
<i>Lomatium utriculatum</i>				Asuming <i>et al.</i> , 2005	
<i>Opopanax chironium</i>				Gijbels <i>et al.</i> , 1983	
<i>Peucedanum ostruthium</i>				Gijbels <i>et al.</i> , 1984	
Coriandreae	Apioideae	Apieae	<i>Bifora testiculata</i>	Gijbels <i>et al.</i> , 1985	

La mayoría de las ftálicas se oxidan rápidamente por la influencia del aire y tienden a formar polímeros fácilmente, además, como estas sustancias tienen diferencias estructurales muy pequeñas resulta difícil separar una mezcla de las mismas (Reza, 1987).

Estos compuestos son análogos estructurales del anhídrido ftálico, de ahí su nombre. El olor característico de las plantas de la familia Apiaceae se debe a los derivados de estos compuestos (Miyazawa *et al.*, 2004).

En cuanto a la ruta de biosíntesis de las ftálicas, sólo se conoce la del Z-ligustílica, sin embargo aún no se conoce con detalle y la información que se tiene está basada en estudios hechos con *Levisticum officinale* a partir del ácido acético a través de unión cabeza-cola ilustrado en la Figura 9 (Reza, 1987; Figueroa, 1997). Esta afirmación parece confirmarse dado que los compuestos fenólicos como el ácido ferúlico han sido aislados junto con ftálicas (Kobayashi y Mitsuhashi, 1987).

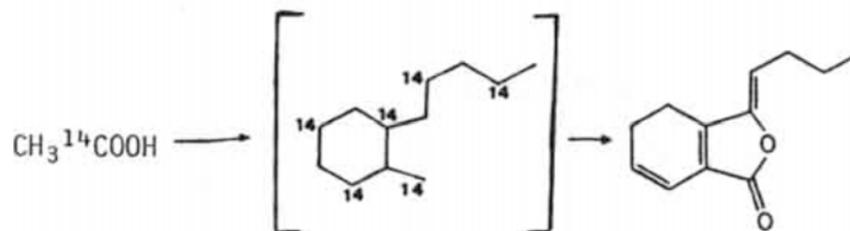


Figura 9. Posible ruta de biosíntesis del Z-ligustílica.

Z-ligustílica es un componente líquido volátil e inestable que puede cambiar su estructura a otras ftálicas por oxidación, isomerización, dimerización o rápida descomposición a altas temperaturas por su estructura de dihidrobenzeno (Zhang *et al.*, 2003).

De acuerdo a Kaouadji y Pouget (1986) es probable que *Cnidium officinale*, *Ligusticum wallichii* y *Meum athamanticum* produzcan ftálicas por la misma ruta biosintética, probablemente a partir de Z-ligustílica (Figura 10), la ftálica con mayor acumulación en plantas de la familia Apiaceae.

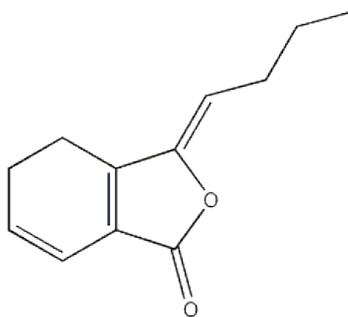


Figura 10. Estructura química de Z-ligustílida.

Z-ligustílida es el metabolito secundario más abundante de la raíz de *L. porteri*, *L. wallichii*, *L. chuanxiong*, *Angelica sinensis*, *Cnidium officinale* y *Levisticum officinale* (Lin *et al.*, 1998; Crowden *et al.*, 1969). En el caso de *Angelica sinensis* la raíz contiene aproximadamente 0.2% a 0.65% de aceite esencial del cual aproximadamente 45% a 60% corresponde a Z-ligustílida, por lo que es la ftálida mayoritaria (American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium, 2003).

Además de la Z-ligustílida, se han encontrado otras ftálidas que se han extraído de partes aéreas, raíces y semillas de diferentes especies con solventes de diferente polaridad. Se aislaron 37 ftálidas a partir de raíces, 14 de tallos, 10 de hojas, 9 de frutos, 6 de partes aéreas, 3 de semillas, 2 de flores y 1 de raíces transformadas y tubérculos (Tabla 9). Las estructuras químicas de algunas de ellas se muestran en la Figura 11.

Las especies que biosintetizan Z-ligustílida son: *Angelica acutiloba*, *A. sinensis*, *Apium graveolens*, *Cnidium officinale*, *Ligusticum chuanxiong*, *L. porteri*, *L. mutellina*, *Levisticum officinale*, *Lomatium californicum*, *L. dasycarpum*, *L. lucidum*, *L. macrocarpum*, *L. utriculatum* y *Meum athamanticum* representadas en las tres tribus mencionadas y se ha obtenido en extractos polares como metanol y agua y de mediana polaridad como cloroformo principalmente de raíces aunque también se ha obtenido de semillas y partes aéreas. En los casos de *Angelica*, *Cnidium* y *Ligusticum* el compuesto se aisló de la raíz con solventes como metanol y cloroformo y en los casos de *Apium* y *Meum* el compuesto se aisló de partes aéreas con solventes como metilbutano. Esto sugiere, que dependiendo de la parte de la planta, el compuesto es extraído con solventes de diferente polaridad debido a la estructura de Z-ligustílida que tiene una parte lipofílica y otra soluble en agua. De lo anterior se desprende que Z-ligustílida es soluble en diferentes solventes y los distintos autores han utilizado diferentes solventes para extraerlo.

Tabla 9. Ftálicas extraídas de distintas especies de la familia Apiaceae.

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálica obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Anethum graveolens</i> var. <i>graveolens</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>cis</i>-Neocnidilida 	Fischer y Gijbels, 1987
<i>Anethum graveolens</i> var. <i>sowa</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>cis</i>-Neocnidilida 	
<i>Angelica acutiloba</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butilideneftálida • Z-ligustílida 	Miyazawa <i>et al.</i> , 2004
		<ul style="list-style-type: none"> • Levistólida A • Senquiunólida E, F, H, I • Toquinólida A, B • Angeloilsenquiunólida F 	Tsuchida <i>et al.</i> , 1987
<i>Angelica gigas</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida 	Piao <i>et al.</i> , 2007
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Butilidenedihidroftálida 	Cho <i>et al.</i> , 2007
<i>Angelica glauca</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • Z-3-butilideneftálida • <i>E</i>-3-butilideneftálida • <i>E</i>-ligustílida • Z-ligustílida + 3-valeriftálida • 3-Hexil-4,5-dihidroftálida • 6,7-Dihidroxi-6,7-dihidrologustílida 	Kaul <i>et al.</i> , 1996
		<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butilideneftálida • <i>E</i>-3-butilideneftálida • Z-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida 	Thappa <i>et al.</i> , 2005

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Angelica sinensis</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida I, H, F, E, D, B, C, G, K • Riligustílida • Sedanenólida • Neocnidílida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • <i>E</i>-ligustílida • Z-ligustílida • Z-3-butilideneftálida • Z,Z'-6.8'.7-3'-diligustílida • Angelicina • Levistólida A • Dímero E-232 de Z-ligustílida • Z,Z'-3.3',8.8'-diligustílida • Z-6-hidroxi-7-metoxi-dihidroiligustílida • <i>E</i>-6,7-dihidroxi-dihidroiligustílida • Z-6,7-epoxiligustílida 	Lin <i>et al.</i> , 1998
		<ul style="list-style-type: none"> • Gelispirólida • Riligustílida 	Deng <i>et al.</i> , 2006
		<ul style="list-style-type: none"> • Dímero E-232 de Z-ligustílida 	Hon <i>et al.</i> , 1990
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida 	Song <i>et al.</i> , 2004
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Z-butilideneftálida • 3-butiliden-4-hidroxiftálida • <i>E</i>-butilideneftálida • Senquiunólida A, F, H, I • Z-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida • 6,7-Epoxiligustílida • 6,7-Dihidroiligustílida 	Lao <i>et al.</i> , 2004
		<ul style="list-style-type: none"> • 10-Angeloilbutilftálida • Sinaspirólida • Anaspirólida • Z-ligustílida • Z-butilideneftálida • Senquiunólida I • Z-6-hidroxi-1-metoxidihidroiligustílida 	Deng <i>et al.</i> , 2006
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida A 	Yi <i>et al.</i> , 2005

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Apium graveolens</i>	Tallos	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Sedanólida • Sedanenólida 	MacLeod <i>et al.</i> , 1988
		<ul style="list-style-type: none"> • Sedanólida • Sedanenólida • <i>trans</i>-Butilideneftálida • <i>cis</i>-Butilideneftálida • 3-<i>n</i>-Butilftálida 	Uhlig <i>et al.</i> , 1987
	Semillas	<ul style="list-style-type: none"> • Sedanólida • Senquiunólida N y J 	Momin y Nair, 2001
		<ul style="list-style-type: none"> • Celeftálida A, B, C • 3<i>S</i>-3'-hidroxi-3-3-<i>n</i>-butilftálida 	Kitajima <i>et al.</i> , 2003
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Sedanenólida 	Bjeldanes y Kim, 1977
	Hojas y tallos	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Sedanenólida • <i>trans</i>-Sedanólida • <i>cis</i>-Sedanólida 	Kurobayashi <i>et al.</i> , 2006
	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • Neocnidilida • Senquiunólida 	Saleh <i>et al.</i> , 1985
		<ul style="list-style-type: none"> • Cnidilida • Z-ligustílida • Senquiunólida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Neocnidilida 	Gijbles <i>et al.</i> , 1985
	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Neocnidilida 	Mitsubishi <i>et al.</i> , 1963
		<ul style="list-style-type: none"> • 3,3α-<i>cis</i>-Neocnidilida 	Fischer y Gijbels, 1987
<i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i>	Tallos	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • <i>E</i>-3-butilideneftálida • <i>Z</i>-3-butilideneftálida • Sedanenólida • <i>cis</i>-Sedanólida • <i>E</i>-ligustílida • Z-ligustílida • <i>trans</i>-Sedanólida • Metil sedanonato • 3-Butilhexahidroftálida 	MacLeod y Ames, 1989
<i>Apium graveolens</i> var. <i>graveolens</i>	Fruto, flores, hojas, tallos, raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida • 3a,4-Dihidroisobutilideneftálida 	Fehr, 1979

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Apium graveolens</i> var. <i>rapaceum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butilideneftálida • E-3-butilideneftálida • Z-ligustílida • E-ligustílida • Neocnidilida • Senquiunólida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • E-3-butilideneftálida • Z-3-butilideneftálida • Sedanenólida • <i>cis</i>-Sedanólida • <i>trans</i>-Sedanólida • Metil sedanonato • 3-Butilhexahidroftálida 	Gijbles <i>et al.</i> , 1985; MacLeod y Ames, 1989
		<ul style="list-style-type: none"> • <i>cis</i>-Neocnidilida 	Fischer y Gijbels, 1987
	Fruto, hojas, tallos, tubérculo y raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida • 3a,4-Dihidroisobutilideneftálida 	Fehr, 1981
	Tallos	<ul style="list-style-type: none"> • Sedanólida • Sedanenólida • <i>trans</i>-Butilideneftálida • <i>cis</i>-Butilideneftálida • 3-<i>n</i>-Butilftálida 	Uhlig <i>et al.</i> , 1987
<i>Apium graveolens</i> var. <i>secalinum</i>	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • Sedanólida • Neocnidilida • 3-Isobutilideneftálida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Z-ligustílida • 3-Isobutilidene-3α,4-dihidroftálida 	Saleh <i>et al.</i> , 1985
<i>Bifora testiculata</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • Senquiunólida • Neocnidilida 	Gijbles <i>et al.</i> , 1985
<i>Capnophyllum peregrinum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida 	Gijbels <i>et al.</i> , 1984
<i>Conioselinum kamtschaticum</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida 	Gijbels <i>et al.</i> , 1979

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Cnidium officinale</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida 	Kwon y Ahn, 2002
		<ul style="list-style-type: none"> • Cnidilida • Z-ligustílida • 3S-3-n-butilftálida • Neocnidilida 	Tsukamoto <i>et al.</i> , 2005
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida B, C, E, F, G, H, I, J • Z-ligustílida 	Kobayashi <i>et al.</i> , 1987
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida • 3-n-Butilftálida • Cnidilida • Neocnidilida 	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1963
		<ul style="list-style-type: none"> • Cnidilida • Neocnidilida 	Bohrmann <i>et al.</i> , 1967
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida • 3-n-Butilftálida • Cnidilida • Senquiunólida • Neocnidilida 	Gijbels <i>et al.</i> , 1981
		<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida 	Gijbels <i>et al.</i> , 1982
	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • <i>cis</i>-Butilideneftálida • <i>cis</i>-3-Isobutilideneftálida • 3-n-Butilftálida • Z-ligustílida • 3-Butildihidroftálida 	Choi <i>et al.</i> , 2002
<i>Glauco sciadium cordifolium</i>	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E</i>-3-butilideneftálida • Z-ligustílida • Z-3-butilideneftálida 	Baser <i>et al.</i> , 2000

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Levisticum officinale</i>	Raíces transformadas	<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butilideneftálida • E-3-butilideneftálida • Z-ligustílida • E-ligustílida • 3-Validen-4,5-dihidroftálida 	Santos <i>et al.</i> , 2005
	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida 	Segebrecht y Schilcher, 1989
		<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • E-ligustílida • Z-butilideneftálida • E-butilideneftálida • Senquiunólida • 3-Validen-4,5-dihidroftálida • Propilideneftálida • Isosenquiunólida 	Gijbels <i>et al.</i> , 1982
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida 	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1963
	Tallos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>trans</i>-Butilideneftálida • <i>cis</i>-Butilideneftálida • 3-<i>n</i>-Butilftálida 	Uhlig <i>et al.</i> , 1987
	Hojas, tallos, semillas y flores	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Z-3-butilideneftálida • E-3-butilideneftálida • Z-ligustílida • E-ligustílida • 3-Validen-4,5-dihidroftálida 	Bylaite <i>et al.</i> , 1998
<i>Ligusticum acutilobum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Ácido sedanónico 	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1963
		<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • 3-Butilideneftálida 	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1960
<i>Ligusticum acutilobum</i> var. <i>sugiyamae</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Cnidilida • Ácido sedanónico • Neocnidilida 	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1963
		<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butilideneftálida • Z-ligustílida 	Mitsuhashi <i>et al.</i> , 1960

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Ligusticum chuanxiong</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E</i>-Senquiunólida E • Senquiunólida H, N, J, B, C, D, E, F, G, I, L • <i>Z</i>-3-butiliden-7-hidroxi-ftálida • (3<i>S</i>)-3-butil-4-hidroxi-ftálida • <i>Z</i>-ligustílida • 3-Butilideneftálida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Cnidilida • Neocnidilida 	Naito <i>et al.</i> , 1992(a)
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida J, I, H • Sedanenólida • <i>E</i>-6,7-dihidroxi-dihidroligustílida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Riligustílida • <i>Z</i>-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida 	Zhang <i>et al.</i> , 2003
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida Q, M • Senquiunona 	Naito <i>et al.</i> , 1992(b)
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida R, S 	Naito <i>et al.</i> , 1996
		<ul style="list-style-type: none"> • 3,8-Dihidro-diligustílida • 4,5-Dehidro-diligustílida • Levistólida A • Toquinólida B • Riligustílida • 3-<i>n</i>-Butilftálida 	Lim <i>et al.</i> , 2006
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida A • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Neocnidilida • <i>Z</i>-ligustílida 	Zschocke <i>et al.</i> , 2005
		<ul style="list-style-type: none"> • Chuanxiongnólida A, B • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Condilida • <i>Z</i>-ligustílida • Toquinólida B • Levistólida A • Riligustílida • 7-Hidroxi-3-butilideneftálida • 4-Hidroxi-3-3-<i>n</i>-butilftálida • Senquiunólida H, I • 3-Hidroxi-4,5,6,7-tetrahidro-6,7-dihidroxi-3-butilftálida 	Li <i>et al.</i> , 2006
		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Z</i>-ligustílida 	Shi <i>et al.</i> , 2006
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida I, H, A • <i>Z</i>-ligustílida • Neocnidilida • 3-Butilideneftálida • Levistólida A, 	

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
		<ul style="list-style-type: none"> Riligustfílida 	Yan <i>et al.</i> , 2005
<i>Ligusticum filicinum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida 	Gillespie y Duszynski, 1998
<i>Ligusticum glaucescens</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida Levistólida A 	Chen y Yang, 2006
<i>Ligusticum jeholense</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida Cnidilida 	Yook <i>et al.</i> , 1997
<i>Ligusticum jeholense</i> var. <i>tenuisectum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida Cnidilida 	Yook <i>et al.</i> , 1997
<i>Ligusticum officinale</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida Cnidilida 	Yook <i>et al.</i> , 1997
<i>Ligusticum porteri</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida Riligustfílida Z-6.6',7.3a'-diligustfílida 	Delgado <i>et al.</i> , 1988
		<ul style="list-style-type: none"> 3-Butilideneftálida Z-ligustfílida E-ligustfílida 	Delgado <i>et al.</i> , 1992
		<ul style="list-style-type: none"> Toquinólida B Diligustfílida Senquiunólida I 	Vázquez, 1996
		<ul style="list-style-type: none"> Diligustfílida Wallichfílida Demetilwallichfílida 	Ríos <i>et al.</i> , 1998
		<ul style="list-style-type: none"> Diligustfílida Demetilwallichfílida 	Quiroz-García <i>et al.</i> , 2004
		<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida Ligulóxido (Z)-3-butilideneftálida E-ligustfílida 	Cégiéla-Carlio <i>et al.</i> , 2005
		<ul style="list-style-type: none"> Diligustfílida Toquinólida A, B Riligustfílida endo-Z,Z'-(3.3',8.8')-diligustfílida Z-ligustfílida 	Quiroz-García <i>et al.</i> , 2005
<i>Ligusticum mutellina</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida 	Passreiter <i>et al.</i> , 2005
<i>Ligusticum sinense</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida Cnidilida 	Yook <i>et al.</i> , 1997; Gijbels <i>et al.</i> , 1979
<i>Ligusticum tenuifolium</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> Z-ligustfílida E-ligustfílida 	Gillespie y Duszynski, 1998

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Ligusticum tenuissimum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • Cnidilida • 3-Butilideneftálida • 3-Butiliden-4,5-dihidroftálida 	Yook <i>et al.</i> , 1997
<i>Ligusticum wallichii</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Butiliden-7-hidroxi-ftálida • <i>cis</i>-6,7-Dihidroligustílida • <i>trans</i>-6,7-Dihidroligustílida • Wallichflida • 3-Butil-4,5-dihidro-3-hidroxi-ftálida 	Pushan <i>et al.</i> , 1984
		<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida K, L, M 	Kobayashi y Mitsuhashi, 1987
		<ul style="list-style-type: none"> • Z-6.8',7.3'diligustílida 	Kaouadji <i>et al.</i> , 1986
		<ul style="list-style-type: none"> • Z'-3,8-dihidro-6.6',7.3'a-diligustílida • Z-6,7-epoxiligustílida 	
		<ul style="list-style-type: none"> • Z,Z-diligustílida 	Kaouadji <i>et al.</i> , 1983(a)
		<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustilidiol 	Kaouadji <i>et al.</i> , 1983(b)
	<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butil-4-hidroxi-ftálida 	Ogawa <i>et al.</i> , 1989	
<i>Lomatium californicum</i>	Semillas	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida 	Meepagala <i>et al.</i> , 2005
<i>Lomatium dasycarpum</i>	Frutos, tallos, hojas y raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Senquiunólida 	Asuming <i>et al.</i> , 2005
	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butilideneftálida • Cnidilida • <i>E</i>-3-butilideneftálida • Neocnidilida • Z-ligustílida 	
	Tallos y hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida 	
<i>Lomatium dissectum</i> var. <i>dissectum</i>	Frutos	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida 	Bairamian <i>et al.</i> , 2004
<i>Lomatium foeniculaceum</i> sp. <i>fimbriatu</i>	Frutos	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Z-3-butilideneftálida • Cnidilida • <i>E</i>-3-butilideneftálida • Senquiunólida • Neocnidilida • Z-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida 	Beauchamp <i>et al.</i> , 2006
<i>Lomatium grayi</i>	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Z-3-butilideneftálida • <i>E</i>-3-butilideneftálida • Senquiunólida • Neocnidilida • Z-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida 	Dev <i>et al.</i> , 2007

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Lomatium lucidum</i>	Frutos, raíz, tallos y hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butilideneftálida • Z-ligustílida • Cnidilida • Senquiunólida 	Asuming <i>et al.</i> , 2005
<i>Lomatium macrocarpum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Senquiunólida • Z-ligustílida 	Asuming <i>et al.</i> , 2005
<i>Lomatium rigidum</i>	Frutos, tallos, hojas y raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Senquiunólida • Neocnidilida • Z-ligustílida 	Beauchamp <i>et al.</i> , 2004
<i>Lomatium utriculatum</i>	Frutos, tallos, hojas y raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Z-3-butilideneftálida • E-3-butilideneftálida • Senquiunólida • Z-ligustílida • E-ligustílida 	Asuming <i>et al.</i> , 2005
	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Cnidilida 	
<i>Meum athamanticum</i>	Hojas y tallos	<ul style="list-style-type: none"> • Z-3-butilideneftálida • Z-ligustílida • E-ligustílida 	Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2004
	Parteas aéreas y frutos	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • 3-Butiltetrahidroftálida • Z-ligustílida 	Stahl y Bohrmann, 1967
	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 7-Hidroxi-3-butilideneftálida 	Kaouadji y Pouget, 1986
		<ul style="list-style-type: none"> • 4-Hidroxi-3-butilideneftálida • 5-Hidroxi-3-butilideneftálida • 3-(2-Hidroxibutilidene)-ftálida • 9-Hidroxiligustílida • <i>cis</i>-6,7-Dihidroxiligustílida • <i>trans</i>-6,7-Dihidroxiligustílida 	
	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • (3<i>Z</i>), (2'<i>E</i>)-3-but-2'-eniliden-4,5,6,7-tetrahidroftálida • Z-ligustílida • Z-butiliden-4,5,6,7-tetrahidroftálida 	Tesso <i>et al.</i> , 2006
<i>Opopanax chironium</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • Z-3-butilideneftálida • Senquiunólida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Cnidilida 	Gijbels <i>et al.</i> , 1983
<i>Peucedanum ostruthium</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • Cnidilida • Senquiunólida 	Gijbels <i>et al.</i> , 1984

<i>Especie</i>	<i>Parte de la planta</i>	<i>Ftálida obtenida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Petroselinum crispum</i>	Células en suspensión	<ul style="list-style-type: none"> • 5-Hidroxiutilideneftálida • 7-Hidroxiutilideneftálida • 7-Hidroxiutilideneftálida 7-<i>O</i>-glucósido • 7-Hidroxiutilideneftálida 7-<i>O</i>-(6'-malonilglucósido) 	Hagemeier <i>et al.</i> , 1999
<i>Petroselinum crispum</i> var. <i>tuberosum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustilida • Senquiunólida • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Z-3-butilideneftálida 	Gijbles <i>et al.</i> , 1985

n.e.: no especificado

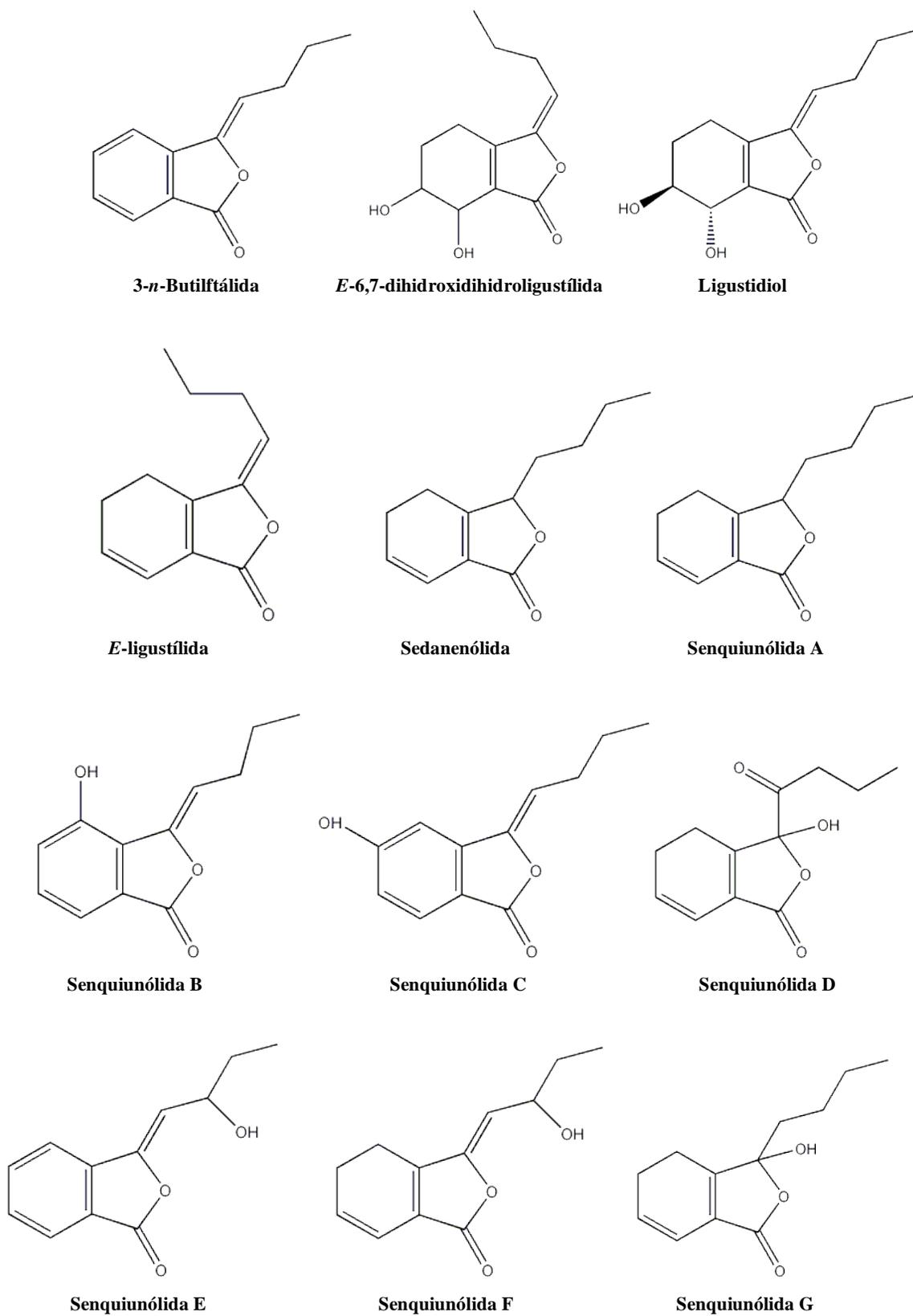
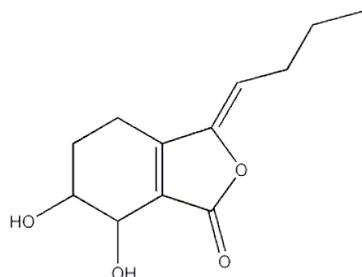
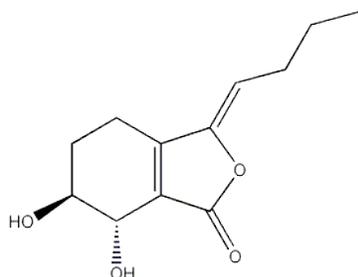


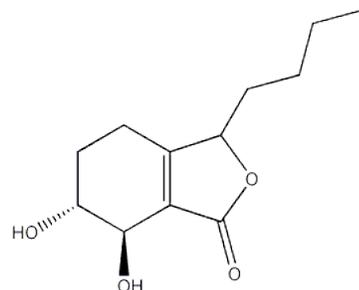
Figura 11. Estructuras químicas de algunas ftálidas mencionadas en la Tabla 9.



Senquiunólida H



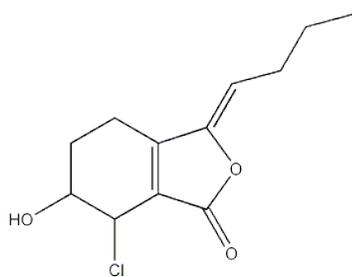
Senquiunólida I



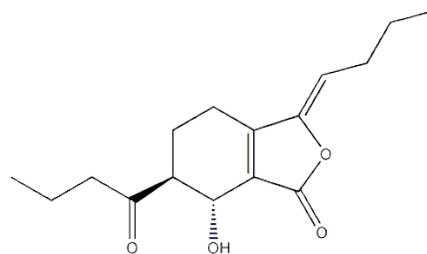
Senquiunólida J



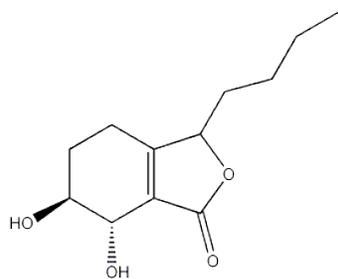
Senquiunólida K



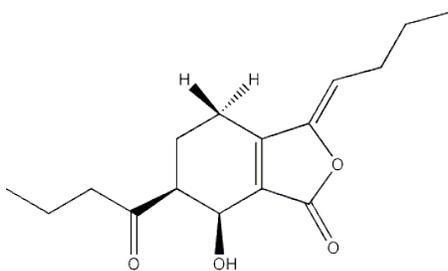
Senquiunólida L



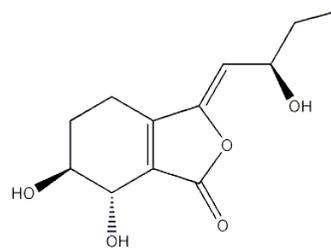
Senquiunólida M



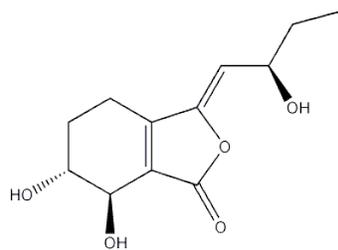
Senquiunólida N



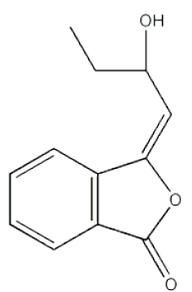
Senquiunólida Q



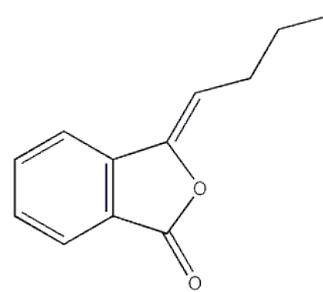
Senquiunólida R



Senquiunólida S

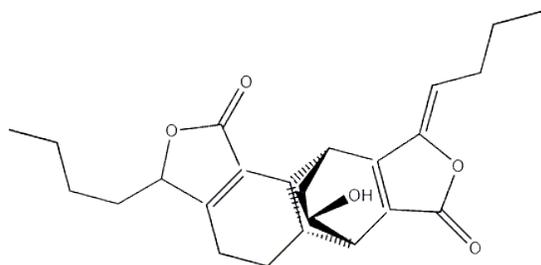


E-Senquiunólida E

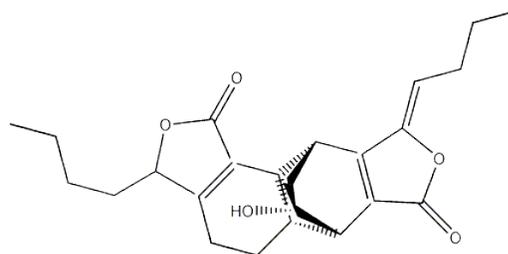


Z-3-butilideneftálida

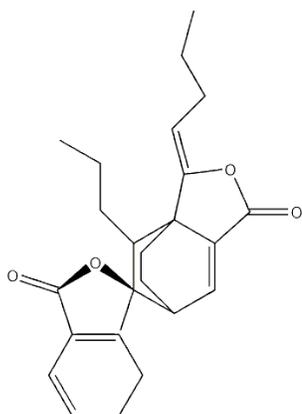
Figura 11. Continuación



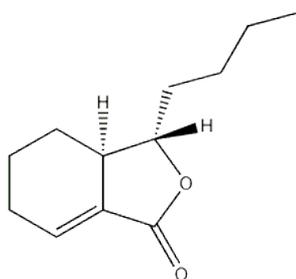
Chuanxiognólida A



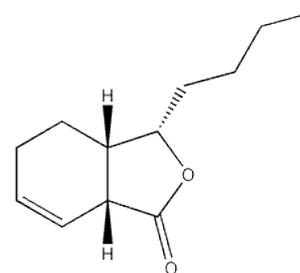
Chuanxiognólida B



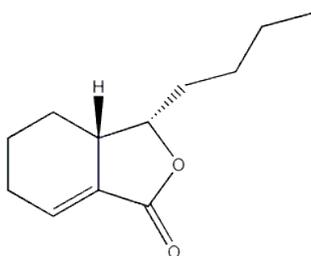
Dímero E-232



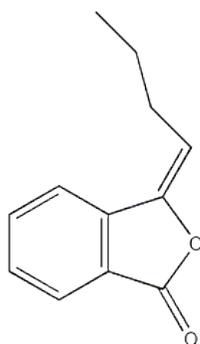
trans-Neocnidilida



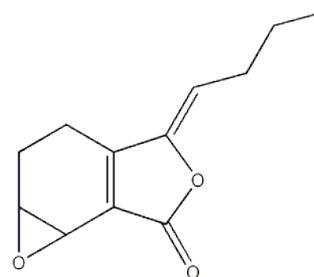
Cnidilida



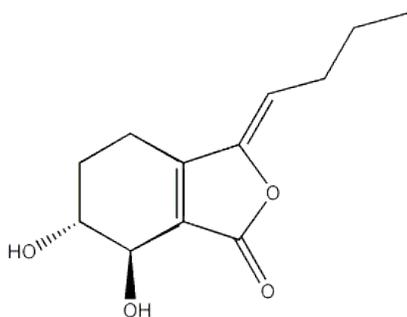
cis-Neocnidilida



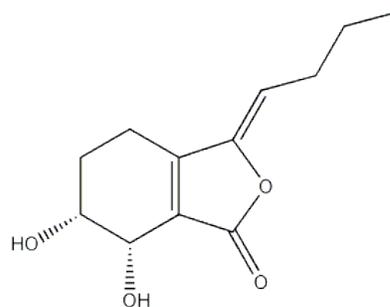
E-butilideneftálida



Z-6,7-epoxiligustílida

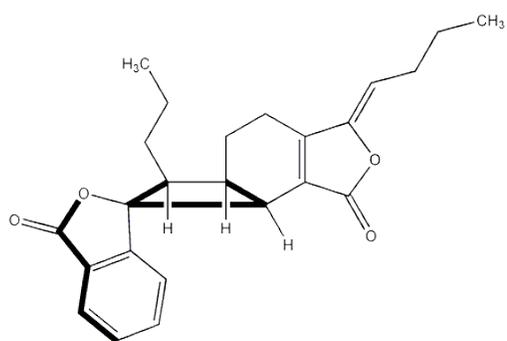


trans-6,7-Dihroxiligustílida

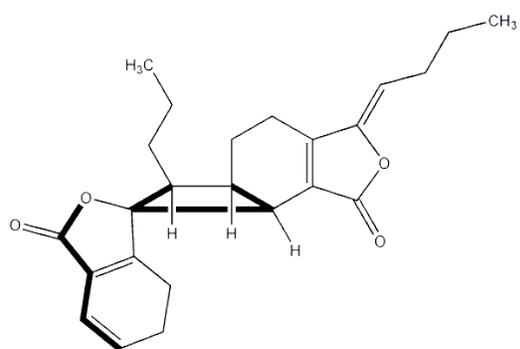


cis-6,7-Dihroxiligustílida

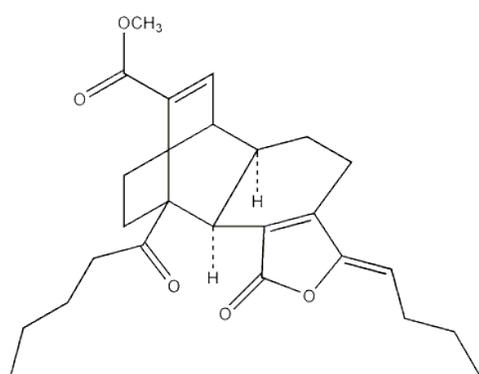
Figura 11. Continuación



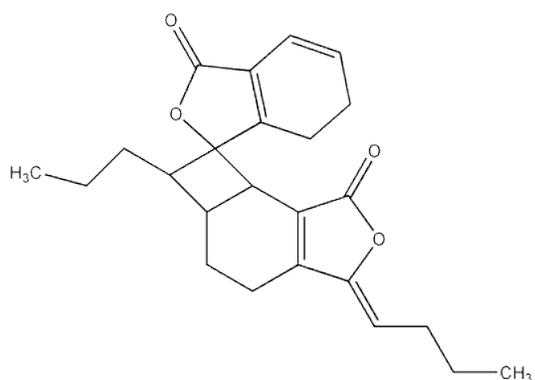
Gelispírolida



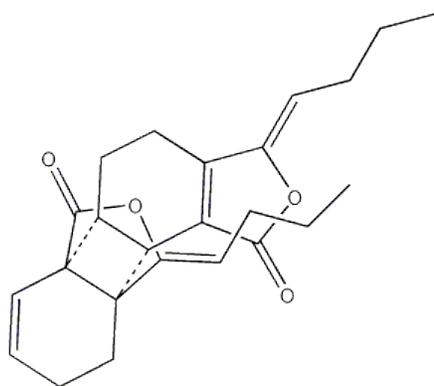
Riligustírida



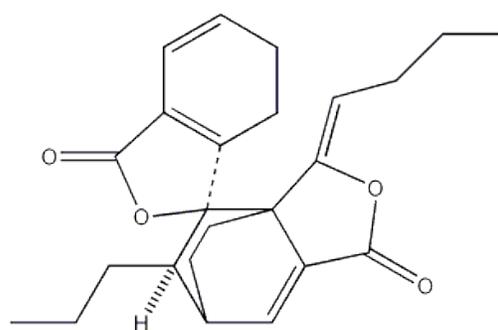
Wallichírida



Angelicina

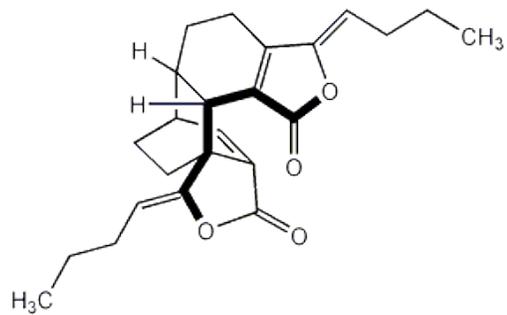


Toquinólida A

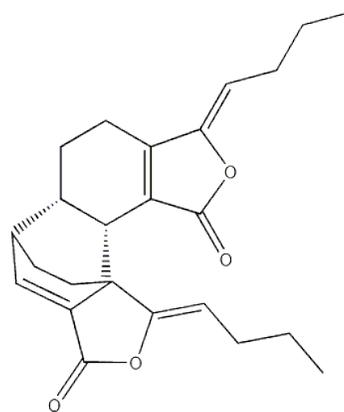


Toquinólida B

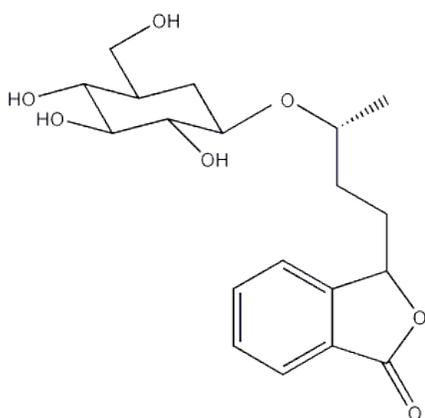
Figura 11. Continuación



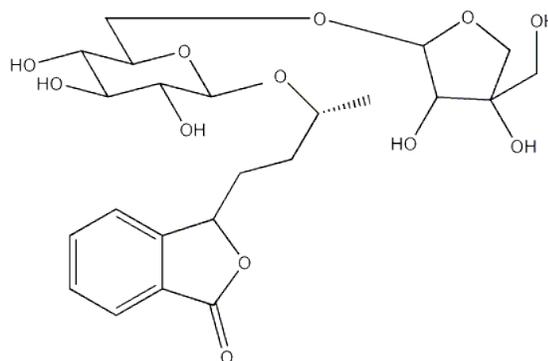
Diligustilida



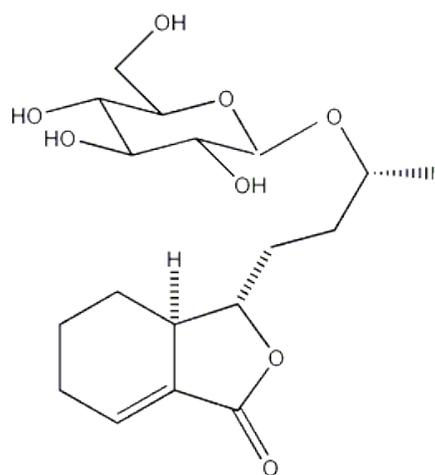
Levistolida A



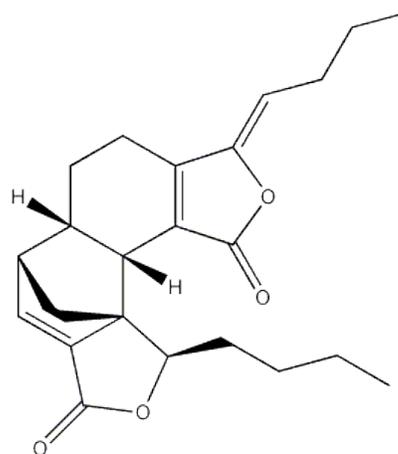
Celeftalida A



Celeftalida B



Celeftalida C



3'R,8'-dihydrodiligustilida

Figura 11. Continuación

Actividad biológica de Z-ligustílida

La actividad biológica y farmacológica de Z-ligustílida es muy amplia. Los estudios han sido realizados en diversos organismos como algas, virus, bacterias, artrópodos, ratas y ratones, probando ser biológicamente activa con distintas propiedades benéficas, ya que tiene efectos sobre el músculo liso como relajante, antiinflamatorio y analgésico, así como antiviral, antibacteriana, antioxidante, entre otras (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad biológica de Z-ligustílida.

<i>Actividad biológica</i>	<i>Sobre</i>	<i>Referencia</i>
<i>Inhibición del crecimiento</i> (Magnoliophyta) (Chlorophyta)	<i>Lemna paucicostata</i> (I_{50} = 600 μ M) <i>Selenastrum capricornutum</i> (LCIC = 53 μ M)	Meepagala <i>et al.</i> , 2005
<i>Tóxica</i> (Cyanophyta)	<i>Oscillatoria perornata</i> (LCIC = 53 μ M)	
<i>Neuroprotector</i> (Chordata)	Isquemia cerebral del procéncéfalo transitoria en ratones Daño permanente por isquemia focal en ratas Isquemia del procéncéfalo permanente en ratas Déficit cognitivo crónico Línea celular de feocromocitoma adrenal de rata (PC12) Sueño inducido por pentobarbitales en ratón (20 mg/Kg.) Isquemia cerebral del procéncéfalo transitoria en ratones	Kuang <i>et al.</i> , 2006 Peng <i>et al.</i> , 2007 Kuang <i>et al.</i> , 2007 Yu <i>et al.</i> , 2008 Matsumoto <i>et al.</i> , 1998 Kuang <i>et al.</i> , 2006
<i>Antioxidante y antiapoptótico</i> (Chordata)		
<i>Antiviral</i> (Vira)	Citomegalovirus (I = 23%) Rinovirus tipo II (0.3 μ M)	Heimbegner, <i>et al.</i> , 2004
<i>Tóxico</i> (Arthropoda)	<i>Artemia salina</i> (DL_{50} =10.3 ppm) <i>Artemia salina</i> (LC_{50} = 20.1 ppm)	Heimbegner <i>et al.</i> , 2004 Figueroa, 1997
<i>Relajante muscular</i> (Chordata)	Contracciones uterinas en rata (EC_{50} = 4.4 μ g/ml) Atenuación de $PGF_2\alpha$ Contracciones inducidas por Ach Contracciones inducidas en aorta de ratas (IC_{50} = 64 μ g/ml) por fenilefrina Contracciones inducidas por ácido acético y formalina Vasoconstricción <i>in vitro</i> de segmentos de aorta abdominal de rata Vasorrelajante de aorta aislada de rata Vasodilatador de arteria mesentérica de rata (10 μ M) Antiasmático	Du <i>et al.</i> , 2006(a) Du <i>et al.</i> , 2006(b) Du <i>et al.</i> , 2007 Liang <i>et al.</i> , 2005 Chan, <i>et al.</i> , 2007 Cao <i>et al.</i> , 2006 Tao <i>et al.</i> , 1984
<i>Insecticida</i> (Arthropoda)	Larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> (2.54 μ mol/ml)	Miyazawa <i>et al.</i> , 2004; Tsukamoto <i>et al.</i> , 2005
<i>Antiesclerótico y antihipertensivo</i>	Proliferación y migración de células vasculares del músculo liso de aorta torácica de ratas	Lu <i>et al.</i> , 2006
<i>Antioxidante</i> (Chordata)	Suprime la producción de especies reactivas de oxígeno	
<i>Antibacterial</i> (Proteobacteria) (Bacteria)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> y <i>Shigella sonnei</i>	Figueroa, 1997
<i>Antifúngico</i> (Ascomycota)	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Candida albicans</i>	Figueroa, 1997
<i>Antiproliferativo</i> (Chordata)	Células vasculares de músculo liso de rata inducidas por bFGF Células de músculo liso de aorta de ratón	Liang y He, 2006 Kobayashi <i>et al.</i> , 1993

La mayoría de los trabajos se han realizado con extractos de raíces o de plantas completas de especies de los géneros *Angelica*, *Cnidium* y *Ligusticum*, principalmente. Estas especies al igual que *L. porteri*, no se cultivan y son colectadas de su hábitat natural para ser aprovechadas en China y Japón, principalmente, como plantas medicinales.

Estos extractos han demostrado tener una actividad biológica similar a la observada con el compuesto puro (Hou *et al.*, 2005). Es posible que los aceites esenciales presentes en la raíz de estas especies, que poseen un alto porcentaje de ftálicas, tengan una acción sinérgica entre ellos, dando como resultado la actividad biológica por la que son conocidas y utilizadas estas especies.

Sin embargo, algunos compuestos, como la diligustólida, no pueden ser utilizados de manera pura, pues presentan una actividad altamente tóxica sobre *Artemia salina* (Vázquez, 1996).

Las raíces de *L. porteri* y *P. crispum* contienen la ftálica Z-ligustólida como componente mayoritario y al cual se le atribuye un amplio espectro de actividad biológica que carece de especificidad y baja potencia sin ser tóxico lo que lo hace útil y de gran interés para la medicina moderna (Beck y Stermitz, 1995).

Métodos de investigación

Los métodos de investigación utilizados sobre ftálicas para su extracción, aislamiento y análisis por medio de técnicas analíticas han sido muy diversos. Para la obtención de estos compuestos se han utilizado tanto disolventes polares como no polares, generalmente se extraen de raíces. Los métodos de aislamiento y caracterización incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG) o CG acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía de columna (CC), resonancia magnética nuclear (RMN H^1 y C^{13}), espectroscopía en rayos infrarrojos (IR), rayos ultravioleta (UV) y cristalografía de rayos X (Beck y Chou, 2007).

En los comienzos de los estudios químicos de las ftálicas, se identificaban por métodos espectroscópicos tales como rayos X, IR, UV y CG-EM (MacLeod *et al.*, 1988; Pushan *et al.*, 1984). En años más recientes, estos compuestos han sido detectados por CLAR acoplada a técnicas espectroscópicas como UV, EM y RMN de dos dimensiones. Una de las técnicas que siguen vigente es la CG-EM. Con la ayuda de estas técnicas, los constituyentes principales han sido caracterizados e identificados simultáneamente, haciendo el análisis de estos compuestos, sencillo, sensible y rápido (Zschocke *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002; Zschocke *et al.*, 1998; Beck y Chou, 2007).

Ftálidas en otras familias

Se han encontrado ftálidas en hongos, hepáticas y en plantas pertenecientes a las familias Gentianaceae, Typhaceae, Loganiaceae, Rosaceae, Rhamnaceae, Nymphaeaceae, Orchidaceae y Asteraceae entre otras. En la Tabla 11 se muestra la distribución botánica de estas ftálidas.

Tabla 11. Ftálidas identificadas en distintas familias botánicas.

<i>Nombre</i>	<i>Obtenido a partir de</i>	<i>Ftálida</i>	<i>Referencia</i>
<i>Akebia quinata</i> (Lardizabalaceae)	Frutos y tallos	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • (3Z)-butilideneftálida 	Kawata <i>et al.</i> , 2007
<i>Alternaria porri</i> (Pleosporaceae)	Cultivo líquido	<ul style="list-style-type: none"> • Porritoxinol 	Suemitsu <i>et al.</i> , 1994
		<ul style="list-style-type: none"> • Zinnimidina • 5-(3',3'-dimetilaliloxi)-7-metoxi-6-metilftálida 	Suemitsu <i>et al.</i> , 1995
<i>Anaphalis araneosa</i> (Asteraceae)	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • Ftalidacromeno • Araneoftálida • Aranocromanoftálida 	Jakupovic <i>et al.</i> , 1987
<i>Anthocleista djalonensis</i> <i>A. vogelli</i> (Loganiaceae)	Corteza	<ul style="list-style-type: none"> • Djalonensina 	Okorie, 1976
<i>Asarum canadense</i> (Aristolochiaceae)	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida • Sedanólida 	Motto y Secord, 1985
<i>Banisteriopsis caapi</i> (Malpighiaceae)	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • Shihunina • Dihidroshihunina 	Kawanishi <i>et al.</i> , 1982
<i>Corollospora maritima</i> (Halosphaeriaceae)	Medio de cultivo	<ul style="list-style-type: none"> • Corollosporina 	Liberra <i>et al.</i> , 1998
<i>Corydalis sempervirens</i> (Fumariaceae)	Toda la planta	<ul style="list-style-type: none"> • Feruloil-octopamina 	Majak <i>et al.</i> , 2003
<i>C. stewartii</i>	Toda la planta	<ul style="list-style-type: none"> • (+)-Adlumidina • (+)-Domesticina 	Hussain <i>et al.</i> , 1988
<i>Dendrobium lohohense</i> <i>D. pierardii</i> (Orchidaceae)	Toda la planta	<ul style="list-style-type: none"> • Shihunina • Dihidroshihunina 	Murakoshi <i>et al.</i> , 1964; Kawanishi <i>et al.</i> , 1982
<i>Fumaria agraria</i> (Fumariaceae)	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • Adlumicefna • Adlumidicefna 	Bentley, 1999
<i>F. bastardii</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • Bububulina • Corlumina • β-Hidrastina 	Bentley, 1999
<i>F. capreolata</i> , <i>F. muralis</i> <i>F. officinalis</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • Adlumicefna • Adlumidicefna 	Bentley, 1999
<i>F. densiflora</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • (-)-Adlumina • (+)-Bicuculina • Fumaflorina 	Bentley, 1998
<i>F. macrosepala</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • (+)-Bicuculina • Adlumina 	Suau <i>et al.</i> , 2002
<i>F. parviflora</i>	n.e.	<ul style="list-style-type: none"> • Adlumicefna • Adlumidicefna • Corledina • Corlumidina • α-Hidrastina 	Bentley, 1999

Nombre	Obtenido a partir de	Ftálida	Referencia
<i>F. vaillantii</i>	Toda la planta	<ul style="list-style-type: none"> • (+)-Bicuculina • (-)-Capnoidina • (-)-Adlumina • <i>N</i>-Metilhidrastefina • <i>Z</i>-fumaramina • Adlumiceína 	Sener <i>et al.</i> , 1983
<i>Gentiana pedicellata</i> (Gentianaceae)	Hojas	<ul style="list-style-type: none"> • Pedicelósina (deglucosilpedicelósida) • 6''-<i>O</i>-glucosilpedicelósida 	Mpondo <i>et al.</i> , 1987
		<ul style="list-style-type: none"> • Pedicelósido 	Chulia <i>et al.</i> , 1984
		<ul style="list-style-type: none"> • Pedirutinósido • <i>n</i>-Propanoxi-3-ftálida • Pedirutinósido 	Chulia <i>et al.</i> , 1986
<i>G. pyrenaica</i>	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • Pediglucósido 6'-vanilloilpediglucósido 	García <i>et al.</i> , 1989
<i>Geum montanum</i> (Rosaceae)	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida • <i>E</i>-ligustílida • 3-Butilideneftálida • Isómero de 3-butilideneftálida • Isómero de butilidenedihidroftálida 	Vollmann y Schultze, 1995
<i>Helichrysum arenarium</i> (Asteraceae)	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Arenoftálida A 	Vrkoc <i>et al.</i> , 1975; Vrkoc <i>et al.</i> , 1973
<i>H. platypterum</i>	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • Platipteroftálida 	Jakupovic <i>et al.</i> , 1987
<i>Myrsine africana</i> (Myrsinaceae)	Raíz	<ul style="list-style-type: none"> • 5-Metoxi-7-hidroxi-ftálida 	Li y McLaughlin, 1989
<i>Nuphar pumilum</i> (Nymphaeaceae)	Rizoma	<ul style="list-style-type: none"> • Z-ligustílida 	Myazawa <i>et al.</i> , 2005
<i>Papaver fugax</i> (Papaveraceae)	Cápsulas	<ul style="list-style-type: none"> • (-)-α-Narcotina • Narceína 	Phillipson, 1973
<i>P. pseudo-orientale</i>	Partes aéreas	<ul style="list-style-type: none"> • (-)-α-Narcotina • Narceína 	Sariyar y Asma, 1986
<i>P. triniifolium</i>	Cápsulas	<ul style="list-style-type: none"> • (-)-α-Narcotina • Narceína 	Sari y Sanyer, 1997
<i>Plagiochila killarniensis</i> (Plagiochilaceae)	Espécimen completo	<ul style="list-style-type: none"> • Kilarninsólida 	Rycroft <i>et al.</i> , 1999
<i>Polygonum multiflorum</i> (Polygonaceae)	Tubérculos	<ul style="list-style-type: none"> • <i>cis</i>-<i>E</i>-3-butiliden-4,5,6,7-tetrahidro-6,7-dihidroxi-1(3H)-isobenzofuranona • <i>trans</i>-<i>E</i>-3-butiliden-4,5,6,7-tetrahidro-6,7-dihidroxi-1(3H)-isobenzofuranona 	Grech <i>et al.</i> , 1994
<i>Quillaja saponaria molina</i> (Rosaceae)	Corteza	<ul style="list-style-type: none"> • 4-Metil-7-hidroxi-ftálida glucósido 	Steinbeck <i>et al.</i> , 1995
<i>Rhamnus wightii</i> (Rhamnaceae)	Corteza	<ul style="list-style-type: none"> • 7-Hidroxi-5-metoxi-ftálida • Naftálida 	Pepalla <i>et al.</i> , 1991
<i>Scorzonera hispanica</i> (Asteraceae)	Toda la planta	<ul style="list-style-type: none"> • <i>cis</i>-Sedanólida • <i>trans</i>-Sedanólida 	MacLeod y Ames, 1991
<i>Sporotrichum laxum</i> (Corticaceae)	Medio de cultivo	<ul style="list-style-type: none"> • Esporotrical • 6-Hidroxisporotrical 	Bava <i>et al.</i> , 2006
<i>Trifolium pratense</i> <i>T. repens</i> (Fabaceae)	Flores	<ul style="list-style-type: none"> • 3-<i>n</i>-Butilftálida 	Buchbauer <i>et al.</i> , 1996
<i>Typha capensis</i> (Typhaceae)	Rizoma	<ul style="list-style-type: none"> • Tifaftálida 	Shode <i>et al.</i> , 2002

n.e.: no especificado

Las familias Fumariaceae y Papaveraceae están cercanamente relacionadas debido a que ambas biosintetizan alcaloides, particularmente del tipo ftáldaisoquinolinas (Suau *et al.*, 2002). Además ambas familias pertenecen al orden Papaverales, por lo que podría explicarse la presencia de estos compuestos en estas familias.

La presencia de algunas de las ftáldas identificadas en la Tabla 11 ha sido reportada en especies de los géneros *Ligusticum*, *Levisticum*, *Meum* y *Cnidium*, denotando la relación quimiotaxonómica entre éstos y ésta misma con otras familias tan distantes como la Orchidaceae y organismos como hongos microscópicos patógenos y marinos así como hepáticas.

Es de gran interés notar que *Z*-ligustílida se identificó en las raíces de *Nuphar pumilum* y *Geum montanum* y en los frutos y semillas de *Akebia quinata*. Estas especies, excepto *G. montanum*, pertenecen a la subclase Magnoliidae y están en el orden Ranunculales y Nymphaeales, respectivamente. La familia Apiaceae y *G. montanum* pertenecen a la subclase Rosidae dentro del orden Umbelales y Rosales, respectivamente (Figura 12). Estas tres especies pertenecen al grupo Magnoliopsida y crecen en hábitats montañosos y en suelos ácidos, característica que comparten con las especies de Apiaceae que biosintetizan ftáldas. Por lo tanto, *Z*-ligustílida podría ser un carácter taxonómico que agrupe a estas familias.

La presencia de ftáldas no isoquinolinas se identificó en los órdenes Rhamnales, Ericales, Fabales, Polygonales y Aristolochiales. Éstos están más alejados taxonómicamente entre sí, ya que pertenecen a tres distintas subclases, Rosidae, Dilleniidae y Caryophylliidae.

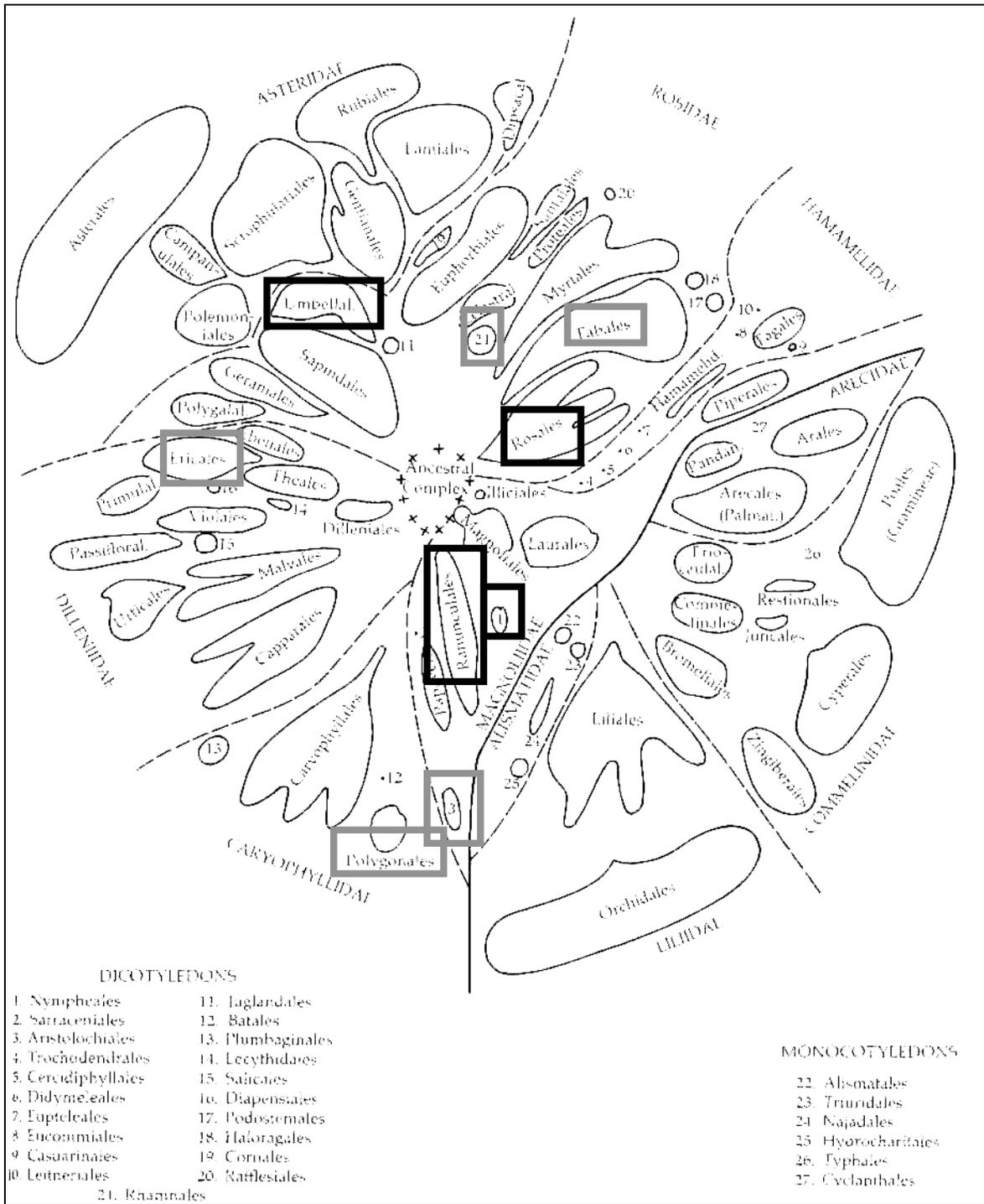


Figura 12. Diagrama evolutivo de la especialización de los órdenes de las angiospermas (Stebbins, 1974). En los recuadros negros se indican los órdenes Umbelales, Rosales, Ranunculales y Nymphaeales. En los recuadros grises se indican los órdenes Rhamnales, Fabales, Ericales, Polygonales y Asteroles.

La ausencia o presencia de metabolitos secundarios puede ser un indicativo de un ancestro común. Sin embargo, la expresión de estructuras químicas similares de éstos en familias distantes ocurre en el reino vegetal. La co-ocurrencia de una clase estructural puede ser un indicativo de una relación monofilética. Esto puede ser debido a una evolución convergente o a una expresión diferencial de genes, es posible que en algunos casos los genes que codifican para las enzimas para la biosíntesis de un metabolito secundario hayan tenido una evolución temprana. Estos genes no se pierden durante la filogenia pero pueden estar “apagados”. De igual manera, estos genes pueden “encenderse” en otro momento evolutivo (Wink, 2003).

Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de células, tejidos y órganos vegetales es un conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y multiplicación de células bajo condiciones asépticas en un medio de composición químicamente definido y condiciones ambientales controladas (Roca y Mroginski, 1993). La base teórica para el cultivo de tejidos fue propuesta por Haberlandt en 1902 cuando estableció claramente el concepto de totipotencialidad indicando más tarde que la técnica de cultivo de células vegetales aisladas en una solución nutritiva permitirá el estudio de problemas importantes desde un nuevo acercamiento experimental (Thorpe, 2007; Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006).

Las aplicaciones de esta técnica son: modelos de estudio para aspectos fundamentales de la fisiología vegetal, genética y bioquímica; el incremento de la variabilidad genética; la generación de individuos fértiles modificados genéticamente; la obtención de plantas libres de patógenos; la micropropagación de plantas; la conservación de germoplasma de especies amenazadas; la manipulación de rutas metabólicas de metabolitos secundarios y la bioconversión y producción de metabolitos secundarios (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006).

Sin embargo, se deben tener en cuenta varias consideraciones para el éxito del cultivo de tejidos. La primera de ellas es la elección del explante que está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal estudiada así como el estado fisiológico del mismo. La segunda es la asepsia, evitar contaminación con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito del establecimiento del cultivo, para su incubación y para su manipulación. Si bien es cierto que en el cultivo de plantas, es más común la contaminación por hongos y virus y en menor grado por bacterias, es necesario sobrepasar este factor ya que puede ser el paso limitante para el establecimiento del cultivo. La tercera es la elección del medio y de los reguladores de crecimiento y por último las condiciones de incubación (Roca y Mroginski, 1993; Steward *et al.*, 1970; Hurtado y Merino, 1987).

Esta técnica explora las condiciones que promueven la división celular y la reprogramación genética en condiciones *in vitro*. Esto se logra al manipular las concentraciones exógenas y endógenas de reguladores de crecimiento vegetal. Los reguladores de crecimiento más utilizados para ello son las auxinas y las citocininas y se utilizan para la inducción de callos y morfogénesis (Parr, 1989).

También influyen la diferenciación de las células vegetales: una alta concentración de citocininas y baja de auxinas promueven la formación de brotes, las auxinas inician el crecimiento de raíces y una cantidad equimolar de citocininas y auxinas promueven la proliferación de callo (Buchanan *et al.*, 2000).

Las *auxinas* regulan la elongación celular, la dominancia apical, el desarrollo de frutos, la elongación de brotes, la inducción de la división celular en el cambium, la iniciación de la raíz

principal y raíces adventicias, la embriogénesis, la diferenciación de tejidos vasculares, previenen la abscisión y están involucradas en tropismos. La principal auxina presente en la mayoría de las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA), es derivada del L-triptófano y es sintetizada en tejidos jóvenes aéreos y en la punta de la raíz. También existen auxinas sintéticas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalen-1-acético (ANA). Su papel en la elongación celular es acidificar la pared celular para provocar un debilitamiento temporal cambiando la presión osmótica estimulando ATPasas de H⁺ que permiten la entrada de agua lo que provoca la elongación de la célula. Se transportan de manera unidireccional, es decir, de manera polar desde la parte apical hacia la parte basal (basipétala). También se pueden transportar por el floema hacia las raíces, es decir, de manera acropétala (Taiz y Zeiger, 2006; Buchanan *et al.*, 2000).

Las *citocininas* regulan la división y proliferación celular, la dominancia apical, la formación y la actividad de los meristemos apicales, el desarrollo floral, retardan la senescencia de las hojas, promueven la movilización de nutrientes, el desarrollo y diferenciación de cloroplastos, el metabolismo autotrófico, la expansión de hojas y cotiledones y la interrupción de la dormancia de yemas. La citocinina más abundante en la mayoría de las plantas es la *trans*-zeatina y en menor cantidad la *cis*-zeatina y la dihidrozeatina. También existen citocininas sintéticas como la benziladenina (BA), *orto* y *meta*-topolinas. Son derivados estructurales de la adenina con cadenas laterales de tipo isoprenoides y aromáticas. Su biosíntesis está regulada espacial y temporalmente, hay altos niveles en las semillas inmaduras, en las puntas de raíces y en el meristemo apical. Se biosintetizan en la punta de la raíz principalmente. Se transportan por difusión a las células blanco y/o sistemas de transporte selectivo (Taiz y Zeiger, 2006; Buchanan *et al.*, 2000). Su papel en la división celular es inducir la expresión de los genes *cdc2*, *cdk4* y *cdk6*, ciclinas dependientes de cinasa que se asocian con ciclinas tipo B seguido por una fosforilación para la transición de la fase G2 a la fase M y activan la expresión de ciclinas tipo D y del gen *cd4* para la transición de la fase G1 a la fase S (D'Agostino y Kieber, 1999).

Obtención de metabolitos secundarios *in vitro*

Las plantas son la fuente de muchas medicinas modernas. Se estima que una cuarta parte del número total de las medicinas contienen extractos vegetales de ingredientes activos obtenidos de sustancias vegetales o modeladas a partir de ellas. Como ejemplo el analgésico más común, la aspirina, es derivada de especies de *Salix* y *Spiraea* y los productos anticancerígenos más valiosos como el paclitaxel y la vinblastina son derivados de fuentes vegetales (Tripathi y Tripathi, 2003).

Muchas plantas que sintetizan productos de alto valor son difíciles de cultivar y están siendo o están alcanzando el estatus de amenazadas por la sobrecolecta, lo cual es muy preocupante, además de que la síntesis de compuestos derivados de plantas no es factible económicamente, en algunas ocasiones debido a la gran complejidad de sus estructuras y sus requerimientos estereoespecíficos (Oksman-Caldentey e Inze, 2004).

Los sistemas de cultivos celulares pueden ser utilizados a gran escala para cultivar células vegetales de las cuales se pueden extraer metabolitos secundarios. Una de las ventajas de estos métodos es que puede proveer productos naturales de manera continua y de una fuente confiable. La biosíntesis de estos compuestos ocurre a una velocidad similar o superior a la de las plantas intactas. Algunos metabolitos secundarios localizados en tejidos u órganos morfológicamente especializados de plantas nativas se han producido en estos sistemas no sólo induciendo cultivos organizados específicos, sino desdiferenciando los cultivos celulares como los cultivos de callos (Mulabagal *et al.*, 2004).

Las ventajas de un sistema de cultivo celular sobre el cultivo tradicional de plantas completas son:

- Los compuestos de interés pueden producirse bajo condiciones controladas independientes de cambios climáticos, estaciones del año o condiciones del suelo,
- Las células cultivadas están libres de bacterias, hongos, virus e insectos,
- Las células de cualquier planta pueden ser manipuladas para obtener sus metabolitos específicos,
- El control automatizado del crecimiento celular y la regulación de los procesos metabólicos pueden reducir los costos de labor y mejorar la productividad y
- En algunas ocasiones las sustancias orgánicas son excretadas al medio nutritivo de donde son fácilmente extraídas.

Una de las principales dificultades en el uso de cultivos *in vitro* de células vegetales para producir metabolitos secundarios a nivel industrial es la lentitud de crecimiento de éstas, por lo que el tiempo aumenta significativamente para la producción de biomasa. La biosíntesis de metabolitos secundarios tiene lugar cuando las células vegetales han dejado de crecer y reproducirse, esto es, en la fase estacionaria (Roca y Mroginski, 1993).

Las estrategias biotecnológicas utilizadas para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares vegetales están basadas en aquellas utilizadas en cultivos de bacterias y hongos. Algunas de éstas son las siguientes (Collin, 2001; Mulabagal y Tsay, 2004):

- Selección y mejora de líneas celulares altamente productoras,

- Variación del medio de cultivo (nutrientes, reguladores de crecimiento, factores físicos y químicos, adición de precursores)
- Uso de técnicas especializadas (elicitación, inmovilización, permeabilización, escalamiento, transformación genética, biotransformación de precursores, ingeniería metabólica de rutas biosintéticas).

Obtención de metabolitos secundarios a partir de cultivo de células en suspensión

El cultivo de células en suspensión está basado en la metodología utilizada en microorganismos. Consiste en un conjunto de células aisladas distribuidas en un medio de cultivo líquido en constante movimiento. Éste puede iniciarse al transferir un fragmento de callo friable al medio líquido. Al dividirse, las células se liberan del inóculo debido a la acción mecánica y posteriormente el cultivo estará compuesto por células aisladas. La capacidad de separación o friabilidad de las células en cultivo de células en suspensión se puede promover con una mayor concentración de auxinas que de citocininas (Loyola-Vargas y Vázquez-Flota, 2006).

Un callo se puede definir como una masa celular amorfa en activa división celular obtenida por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales son llevados a una desdiferenciación celular, y presentan una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando lugar a una masa amorfa de tejido. Desde el punto de vista biosintético, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, lo que significa que cada célula en cultivo mantiene la información genética completa y por lo tanto es capaz de producir una amplia gama de metabolitos secundarios encontrados en la planta madre. Para iniciar un cultivo de callo de una planta medicinal, se puede partir de cualquier explante y no necesariamente del órgano productor del metabolito de interés; éste se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca este desarrollo con una activa proliferación. Éstas células al entrar en una fase de desdiferenciación celular, son capaces de biosintetizar este metabolito, independientemente del explante utilizado para el cultivo. Si este callo derivado de un explante produce el compuesto de interés, se espera que cualquier otro lo hará. Este hecho puede implicar que todos los callos derivados de una planta tendrán finalmente las mismas características cuantitativas y cualitativas independientemente de los estados iniciales de los explantes (Berlin, 1988; Hurtado y Merino, 1987; Rao y Ravishankar, 2002).

Al iniciarse el cultivo de células en suspensión, el comportamiento que presentan las células en crecimiento es típicamente sigmoide (Figura 13). Durante la fase de *reposo* o *lag* el inóculo no

presenta ninguna señal de división celular, está adaptándose a las condiciones de cultivo para iniciar e incrementar la velocidad de la división celular durante la fase *exponencial* y *lineal*. La velocidad de división va disminuyendo gradualmente hasta dar inicio a la fase *estacionaria*, que es el momento en que se han agotado los nutrientes o alguno de ellos. Durante esta fase las células han alcanzado su máxima densidad celular, permaneciendo viables pero sin división (Hurtado y Merino, 1987).

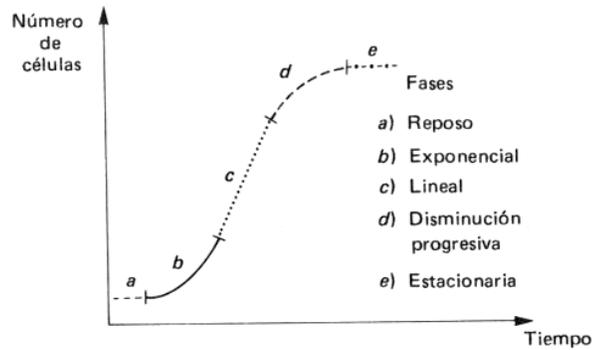


Figura 13. Modelo de una curva de crecimiento de un cultivo de células en suspensión relativo al número de células por unidad de volumen de cultivo en cuanto al tiempo de cultivo.

Al seleccionar una línea celular productora de metabolitos secundarios, ésta se mantiene en un cultivo en suspensión óptimo para así incrementar la biomasa y por consiguiente las concentraciones del metabolito. Estos cultivos pueden mantenerse por períodos largos en suspensión siendo éstos una fuente continua, confiable y estable tanto de células productoras como de metabolitos secundarios (Hurtado y Merino, 1987; Bajaj *et al.*, 1988, Heinsteins, 1985). Algunos ejemplos de metabolitos secundarios obtenidos *in vitro* se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Algunos metabolitos secundarios de plantas medicinales obtenidos *in vitro*.

<i>Especie vegetal</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Tipo de cultivo</i>	<i>Referencia</i>
<i>Atropa belladonna</i>	Atropina	Raíces transformadas	Kamada <i>et al.</i> , 1986
	Escopolamina, Hiosciamina	Raíces transformadas	Bensaddek <i>et al.</i> , 2001
<i>Camellia sinensis</i>	Catequina	Suspensión	Shibasaki-Kitakawa <i>et al.</i> , 2003
	Teamina	Suspensión	Orihara y Furuya, 1990
<i>Capsicum annuum</i>	Capsaicina	Suspensión	Johnson <i>et al.</i> , 1990
<i>Catharanthus roseus</i>	Catarantina, Akuammicina, Vindolina, Ajmalicina, Estrictosidina	Suspensión	Scout <i>et al.</i> , 1980
	Vindolina	Suspensión	Hernández-Domínguez <i>et al.</i> , 2004
<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Piretrinas	Callo	Rajasekaran <i>et al.</i> , 1991
<i>Cinchona ledgeriana</i>	Quinidina	Cultivo de raíz	Anderson <i>et al.</i> , 1982
	Quinina	Cultivo de raíz	Anderson <i>et al.</i> , 1982
	Quinolina	Suspensión	Robins <i>et al.</i> , 1986
<i>Coffea arabica</i>	Cafeína	Callo	Waller <i>et al.</i> , 1983
<i>Coleus blumei</i>	Ácido rosmarínico	Suspensión	Zenk <i>et al.</i> , 1977
<i>Coptis japonica</i>	Berberina	Callo	Furuya <i>et al.</i> , 1972
<i>Datura innoxia</i>	Hiosciamina,	Callo	Hiraoka <i>et al.</i> , 1973
<i>Digitalis lanata</i>	Escopolamina	Suspensión	Ohlsson <i>et al.</i> , 1983
	Digitoxina		
<i>D. lanata</i>	Digoxina	Suspensión	Ohlsson <i>et al.</i> , 1983
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Diosgenina	Suspensión	Tal <i>et al.</i> , 1983; Heble y Staba, 1980
	Escopolamina	Cultivo de raíz	Endo y Yamada, 1985
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Hiosciamina	Callo	Endo y Yamada, 1985; Yamada y Endo, 1984
<i>Ephedra spp.</i>	Efedrina	Suspensión	O'Dowd <i>et al.</i> , 1993
<i>Fabiana imbricada</i>	Acido oleanólico, Rutina, Ácido clorogénico y Escopoletina	Callo y suspensión	Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 2004
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkólida A	Suspensión	Carrier <i>et al.</i> , 1991
<i>Helianthus annuus</i>	α -tocoferol	Suspensión	Gala <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypericum perforatum</i>	Hipericina, Pseudohipericina	Ápices de brotes	Kornfeld <i>et al.</i> , 2007
<i>Linum usitatissimum</i>	Neolignano	Suspensión	Attoumbre <i>et al.</i> , 2006
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Siconina	Suspensión	Fujita <i>et al.</i> , 1981
<i>Morinda citrifolia</i>	Antraquinonas	Suspensión	Inoue <i>et al.</i> , 1981
<i>Mucuna pruriens</i>	L-DOPA	Callo	Brain, 1976
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina	Suspensión	Mantell <i>et al.</i> , 1983
<i>Papaver bracteatum</i>	Sanguinarina	Suspensión	Cline y Coscia, 1988
<i>P. somniferum</i>	Codeína, Morfina	Suspensión	Heinstein, 1985
<i>P. somniferum</i>	Morfina, Tebaína	Callo	Alkhimova <i>et al.</i> , 2001
<i>P. bracteatum</i>			
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Orientina, Isoorientina, Vitexina, Isovitexina	Callo	Antognoni <i>et al.</i> , 2007
<i>Pilocarpus pennatifolius</i>	Pilocarpina	Callo y suspensión	De Andrade <i>et al.</i> , 2005

Especie vegetal	Compuesto	Tipo de cultivo	Referencia
<i>Podophyllum hexandrum</i>	Podofilotoxina	Suspensión	Uden <i>et al.</i> , 1989
<i>Plumbago zeylanica</i>	Plumbagina	Raíces transformadas	Verma <i>et al.</i> , 2002
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Reserpina	Suspensión	Yamamoto y Yamada, 1986
<i>Solanum laciniatum</i>	Solasodina	Suspensión	Chandler y Dodds, 1983
<i>S. lyratum</i>	Solanina, Solanidina, Solasodina	Suspensión	Meng-Hsin <i>et al.</i> , 2007
<i>Swainsona galegifolia</i>	Swainsonina	Raíces y raíces transformadas	Ermayanti <i>et al.</i> , 1994
<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol	Callo y suspensión	Gibson <i>et al.</i> , 1993
<i>Theobroma cacao</i>	Cafeína, Teobromina, Teofilina	Callo y suspensión	Gurney <i>et al.</i> , 1992
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Diosgenina	Callo	Oncina <i>et al.</i> , 2000
<i>Uncaria tomentosa</i>	Ácido ursólico, Ácido oleanólico	Suspensión	Flores-Sánchez <i>et al.</i> , 2002
<i>Valeriana wallichii</i>	Valepotriatos	Raíces transformadas	Banerjee <i>et al.</i> , 1998

Actualmente se han realizado estudios sobre la regeneración *in vitro* de varias especies de la familia Apiaceae a partir de distintos tipos de explantes (Tabla 13). Mediante este método, se han logrado propagar especies con el mismo genotipo y fenotipo libres de patógenos de manera masiva y que están amenazadas por la sobrecolecta o porque su reproducción por semilla no es posible, como *Cnidium officinale* (Pant *et al.*, 1996).

También existen trabajos sobre la obtención de metabolitos secundarios de especies de la familia Apiaceae ejemplificados en la Tabla 14. Dichos estudios experimentales han demostrado la factibilidad de esta alternativa biotecnológica para conservar las poblaciones naturales al obtener el compuesto deseado *in vitro*. Sin embargo, no existen trabajos enfocados a la obtención *in vitro* de *Z-ligustílida* o alguna otra ftálida.

Tabla 13. Cultivos *in vitro* de especies de la familia Apiaceae.

<i>Especie</i>	<i>Explante</i>	<i>Condiciones de cultivo</i>	<i>Resultado de regeneración</i>	<i>Referencia</i>
<i>Anethum graveolens</i>	Yema axilar	MS + BA (0.5 mg/L) y AIB (0.1 mg/L)	Plántulas	Sharma <i>et al.</i> , 2004
<i>Angelica acutiloba</i>	Callo de brote apical	LS + 2,4-D (10^{-6} M) + Kn (10^{-6} M)	Embriones somáticos y plántulas	Miura <i>et al.</i> , 1988
<i>Angelica sinensis</i>	Embriones inmaduros	MS + 2,4-D (0.5-1 mg/L)	Embriones somáticos	Tsay y Huang, 1998
<i>Apium graveolens</i>	Pecíolo	MS + 2,4-D (0.5 mg/L) y Kn (0.6mg/L)	Embriones somáticos y plántulas	Williams y Collin, 1976(a)
		MS + AIA (0.5 mg/L) y Kn (0.6 mg/L)		Williams y Collin, 1976(b)
	Hipocótilo	MS + 2,4-D (10^{-5} M)	Embriones somáticos	Up-Dong <i>et al.</i> , 1999
<i>Bupleurum falcatum</i>	Callo de hipocótilo	MS + 2,4-D (9 μ M), BA (4.4 μ M) y Kn (4.6 μ M)	Embriones somáticos y plántulas	Bang <i>et al.</i> , 1999
<i>Bupleurum kaoui</i>	Segmentos nodales	MS + BA (0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L) + Kn (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/L)	Plántulas	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Centella asiatica</i>	Segmento nodal	MS + BA (22.2 μ M) y ANA (2.68 μ M)	Plántulas	Tiwari <i>et al.</i> , 2000
	Callo de pecíolo, lámina y entrenudo	MS + 2,4-D (4.52 μ M) o ANA (5.37 μ M) + Kn (2.32 μ M)	Embriones somáticos y plántulas	Martin, 2004
	Callo de hoja	MS + Kn (9.29 μ M) y 2,4-D 2.26 μ M)	Embriones somáticos y plántulas	Paramageetham <i>et al.</i> , 2004
	Broto apical	MS + BA (4 mg/L), ANA (1 mg/L) y Kn (1-4 mg/L) y AIB (0-3 mg/L) y ANA (0-1 mg/L)	Plántulas	Nath y Buragohain, 2003
<i>Cnidium officinale</i>	Broto apical	MS + BA (10^{-6} M) y MS + ANA (10^{-7} M) + BA (10^{-7} M)	Plántulas	Pant <i>et al.</i> , 1996
<i>Cuminum cyminum</i>	Callo de hipocótilo y cotiledones	MS + 2,4-D (4 μ M) + Kn (2 ó 4 μ M)	Plántulas	Tawfik y Noga, 2002
	Embriones	B5 + BA (0 y 0.1 mg/L) + ANA (0, 0.2, 0.4, 0.6 mg/L) + AIA (0, 0.2, 0.4 mg/L)	Plántulas	Ebrahimie <i>et al.</i> , 2007
<i>Daucus carota</i>	Broto apical	MS + AAB (10^{-4} M)	Embriones somáticos y plántulas	Nishiwaki <i>et al.</i> , 2000
<i>Eryngium foetidum</i>	Callo de hipocótilo	B5 + 2,4-D (1 μ M)	Embriones somáticos	Li y Kurata, 2005
	Pecíolo y nudo de inflorescencia	MS + ANA (0.5 μ M) y TDZ (0.9, 1.8, 4.5 y 9 μ M)	Plántulas	Mohamed-Yasseen, 2002
	Hoja, disco de tallo y raíz	MS + ANA (5.37-10.74 μ M) + Kn (2.32 o 4.65 μ M)	Plántulas	Martin, 2004
	Hojas	LS + 2,4-D (1 mg/L) y BA (1 mg/L), MS + 2,4-D (0.1 mg/L), BA (2 mg/L) y/o GA ₃ (1 mg/L) BA (0.1 mg/L)	Embriones somáticos y plántulas	Ignacimuthu <i>et al.</i> , 1999
<i>Foeniculum vulgare</i>	Callo de hipocótilo y tallo	MS + ANA (2 .6 μ M) y Kn (2.3 μ M)	Embriones somáticos	Bennici <i>et al.</i> , 2004

<i>Especie</i>	<i>Explante</i>	<i>Condiciones de cultivo</i>	<i>Resultado de regeneración</i>	<i>Referencia</i>
<i>Heracleum candicans</i>	Pecíolo	MS + 2,4-D (0.5 mg/L) + BA (0.5 mg/L)	Embriones somáticos	Wakhlou y Sharma, 1998
<i>Ligusticum chuanxiong</i>	Yema axilar	MS + BA (0.5 mg/L) + ANA (0.5 mg/L) y MS + AIA (1 mg/L) + ANA (0.5 mg/L)	Plántulas	Pen, 2002
<i>Ligusticum wallichii</i>	Protoplastos de hipocótilo	MS + 2,4-D (1 mg/L) + BA (0.5 mg/L) y MS + 2,4-D (0.5 mg/L) y BA (0.5 mg/L)	Callo y plántulas	Zhong-Yi y Hui-Min, 1986
<i>Petroselinum crispum</i>	Yema axilar	MS + BA (0, 2.5, 5 µM), ANA (0, 2.5, 5 µM), AIB (2.5 µM), Kn (0.5, 2.5, 5µM), Thidiazuron (0.1, 1µM)	Plántulas	Vandermoortele <i>et al.</i> , 1996
<i>Petroselinum hortense</i>	Callo de pecíolo	MS + AIA (1, 2.5, 5, 10 mg/L), MS + Kn (0.04 mg/L) y MS + sulfato de adenina (2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 mg/L)	Plántulas	Vasil y Hildebrandt, 1966
<i>Pimpinella tirupatiensis</i>	Hipocótilo	MS + TDZ (1 mg/L) + ANA (0.5 mg/L)	Embriones somáticos	Prakash <i>et al.</i> , 2001
<i>Thapsia garganica</i>	Callo de pecíolo y hoja	MS + ANA (0.5 mg/L) y BA (1.5 mg/L)	Plántulas	Makunga <i>et al.</i> , 2003
	Hojas	MS + ANA, AIA, 2,4-D y BA (0-2 mg/L)	Plántulas	Makunga <i>et al.</i> , 2005
	Pecíolo y hoja	MS + ANA (0.5 mg/L) y BA (1.5 mg/L)	Plántulas	Makunga <i>et al.</i> , 2006
	Hojas	B5 + 2,4-D (1 mg/L), ANA (1 mg/L) y BA (1 mg/L)	Embriones somáticos	Jager <i>et al.</i> , 1993
<i>Trachyspermum ammi</i>	Hipocótilo	MS + 2,4-D (9 µM) y Kn (2.3 µM)	Embriones somáticos y plántulas	Jasrai <i>et al.</i> , 1992

1 µM = 10⁻⁶ M (10⁻⁶ g), 1 mg = 10⁻³ g

Tabla 14. Metabolitos secundarios obtenidos *in vitro* de especies de la familia Apiaceae.

<i>Especie</i>	<i>Usos</i>	<i>Compuesto obtenido</i>	<i>Tipo de cultivo</i>	<i>Referencia</i>
<i>Ammi majus</i> <i>A. visnaga</i>	Vitiligo, psoriasis, micosis, eczemas atípicas, pitiriasis liquenoides, urticaria pigmentosa y alopecia.	Psoralenos Umbeliferona, isopimpinellina, (S)-marmesina, (R)-amirina, umbeliferona-[3'-metil-buta-1t.3-dien-1'-il]-éter y umbeliferona-[3'-hidroximetil-1t.-buten-1t.-buten-1'-il]éter Visnagina	Callo (LS) Células en suspensión de hipocótilo (B5) Células en suspensión (MS)	Ekiert, 1993 Hamerski <i>et al.</i> , 1990 Kaul y Staba, 1965
<i>Anethum graveolens</i>	Condimento, indigestión, cólicos y gases	Quercetina 3-O-D-glucurónida	Células en suspensión	Mohle <i>et al.</i> , 1985
<i>Angelica dahurica</i> var. <i>formosana</i> <i>A. sinensis</i>	Dolor de cabeza y psoriasis Estimulan la circulación, lumbago, constipación, úlceras, reumatismo, parálisis, amenorrea, sangrados uterinos	Imperatorina Compuestos fenólicos, ftálicas	Células en suspensión (MS) Callo (B5, KU, MS, NT)	Mulabagal y Tsay, 2004 Shi-Yu y Kuo-Chang, 1989
<i>Apium graveolens</i>	Condimento, alimento, carminativo, diurético, emenagogo, galactogogo, estimulante, tónico, analgésico, antiinflamatorio, diurético y vermífugo	Terpenoides y ftálicas	Células en suspensión (MS) Callo (MS)	Watts <i>et al.</i> , 1984; Watts <i>et al.</i> , 1985 Al-Abta <i>et al.</i> , 1979
<i>Bupleurum falcatum</i>	Antipirético, analgésico y antiinflamatorio	Saikosaponinas	Callo (LS)	Hiraoka, 1989
<i>Centella asiatica</i>	Lepra, padecimientos de la piel, antipirética, destoxicante, diurético, revitalizante y alimento en curris y ensaladas.	Saponinas triterpénicas Asiáticosidos Asiaticósido y madecacósido	Callo y células en suspensión (MS) Callo y células en suspensión (MS) Estolones y callo de pecíolo y hoja (MS)	Solet <i>et al.</i> , 1998 Nath y Buragohain, 2005 Aziz <i>et al.</i> , 2007
<i>Daucus carota</i>	Contra lombrices intestinales, trastornos estomacales, diarrea, tos, afecciones del pecho, hidropesía, vista cansada. Alimento.	Cianidin 3-O-latirósido, cianidin 3-O-(2''-O-β-D-xilopiranosil-6''-O-β-D-glucopiranosil-β-D-galactopiranosil)-ácilado con ácido 4-cumárico, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzóico o ácido sinápico Antocianinas	Células en suspensión Células en suspensión (SH y Nitsch & Nitsch)	Gläbgen <i>et al.</i> , 1992 Kinnersley y Dougall, 1980; Dougall <i>et al.</i> , 1980; Noé <i>et al.</i> , 1980; Yoon <i>et al.</i> , 1992

<i>Especie</i>	<i>Usos</i>	<i>Compuesto obtenido</i>	<i>Tipo de cultivo</i>	<i>Referencia</i>
<i>Glehnia littoralis</i>	Analgésico, antipirético, diaforético y expectorante	Furanocumarinas	Células en suspensión elicitados	Kitamura <i>et al.</i> , 1998
<i>Levisticum officinale</i>	Diaforética, emenagogo, expectorante, estomático y estimulante. Perfume, alimento, bebida.	Aceites esenciales, terpenoides y ftálicas	Raíces transformadas (SH, B5 y MS)	Santos <i>et al.</i> , 2005
<i>Petroselinum crispum</i>	Condimento, diurético, antihipertensivo, emenagogo	Marmesina, bergapteno, ftálicas y ftálicas glicosiladas	Cultivos elicitados	Hagemeier <i>et al.</i> , 2004
		β -elemeno, miristicina y apiol	Callo (B5)	Gbolade y Lockwood, 1990
<i>Pimpinella anisum</i>	Especia aromática, carminativo, espasmolítico y expectorante	α -pineno, β -pineno, β -mirceno, β -felandreno, γ -terpineno, 4-isopropenil-1-metilbenzeno, p-menta-1,3,8-trieno, β -elemeno, miristicina y apiol	Callo (B5)	Gbolade y Lockwood, 1991
		Aceites esenciales y fenilpropanoides	Callo (MS y B5)	Ernst, 1989
		Pseudoisogenol	Células en suspensión (MS)	Reichling <i>et al.</i> , 1995
<i>Thapsia garganica</i>	Enfermedades pulmonares, catarros y dolores reumáticos.	Tapsigarginas	Callo (MS)	Smitt <i>et al.</i> , 1996

JUSTIFICACIÓN

Ligusticum porteri es una planta de gran importancia ecológica, etnobotánica, medicinal, económica y cultural para los Tarahumaras de la Sierra Tarahumara en Chihuahua en México por el valor medicinal y religioso ceremonial que le dan a esta planta.

Ligusticum porteri se distribuye en los bosques de pino-encino desde las Montañas Rocallosas en Estados Unidos con su límite de distribución sur en la Sierra Madre Occidental en México. Por esta situación, las poblaciones tienen una distribución restringida, a veces aislada, reduciendo el flujo de intercambio genético entre éstas y haciéndolas más vulnerables a cambios en el ambiente. Aunado a la sobrecolecta para su comercialización, al sobrepastoreo, a la deforestación, en general a la destrucción de su hábitat, sus poblaciones están desapareciendo rápidamente. Su situación se agrava debido al gran desconocimiento que existe de la especie, no se cuenta con un procedimiento de propagación ni siquiera a través de la germinación de sus semillas ni de cultivo.

En México y Estados Unidos se venden productos hechos a base de tinturas, polvo y cápsulas de la raíz así como la raíz completa. Estos preparados tienen un amplio espectro de bioactividad como bactericida, fungicida, antiviral, antiespasmódico, insecticida, analgésico y antidepresivo por mencionar algunas. Estas propiedades se atribuyen a la presencia de Z-ligustilido que por presentar una baja toxicidad en su estado puro, es un producto muy interesante para su posible aplicación en la medicina moderna y tradicional. En este último caso se emplean los extractos crudos de la droga con un alto contenido de Z-ligustilido.

Actualmente no existe ninguna norma nacional ni internacional en cuanto al manejo y/o conservación de *L. porteri* por lo que este proyecto ofrece tratar de desarrollar una fuente alternativa del principio activo que pueda hacer frente a su demanda a corto plazo y que de esta manera disminuya la presión sobre las plantas de poblaciones naturales además de integrar la producción *in vitro* y *ex situ* con convenios entre la UNAM y las comunidades rurales para el beneficio de éstas y de las poblaciones naturales de *L. porteri*.

Es por esto que una alternativa biotecnológica como el cultivo de tejidos es una alternativa viable para explorar la germinación de *L. porteri* así como el potencial morfogénico de estructuras somáticas que hagan posible la formación de callo para evaluar la presencia de metabolitos secundarios de interés. Se pretende también que esta estrategia experimental sirva de base para poder ser aplicada a la conservación *ex situ* de esta especie. Debido a la falta de información, se compararon las respuestas morfogénicas y la biosíntesis *in vitro* con las de una especie cultivada, como *P. crispum*, de la misma familia y que también biosintetiza Z-ligustilida.

HIPÓTESIS

- Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones experimentales el callo de distintos cultivos *in vitro* de algunas plantas expresan la capacidad biosintética que permite la formación de metabolitos secundarios, es probable que *Ligusticum porteri* y *Petroselinum crispum* produzcan el compuesto Z-ligustílida a partir del cultivo de callo y/o de células en suspensión de varios explantes.

OBJETIVOS

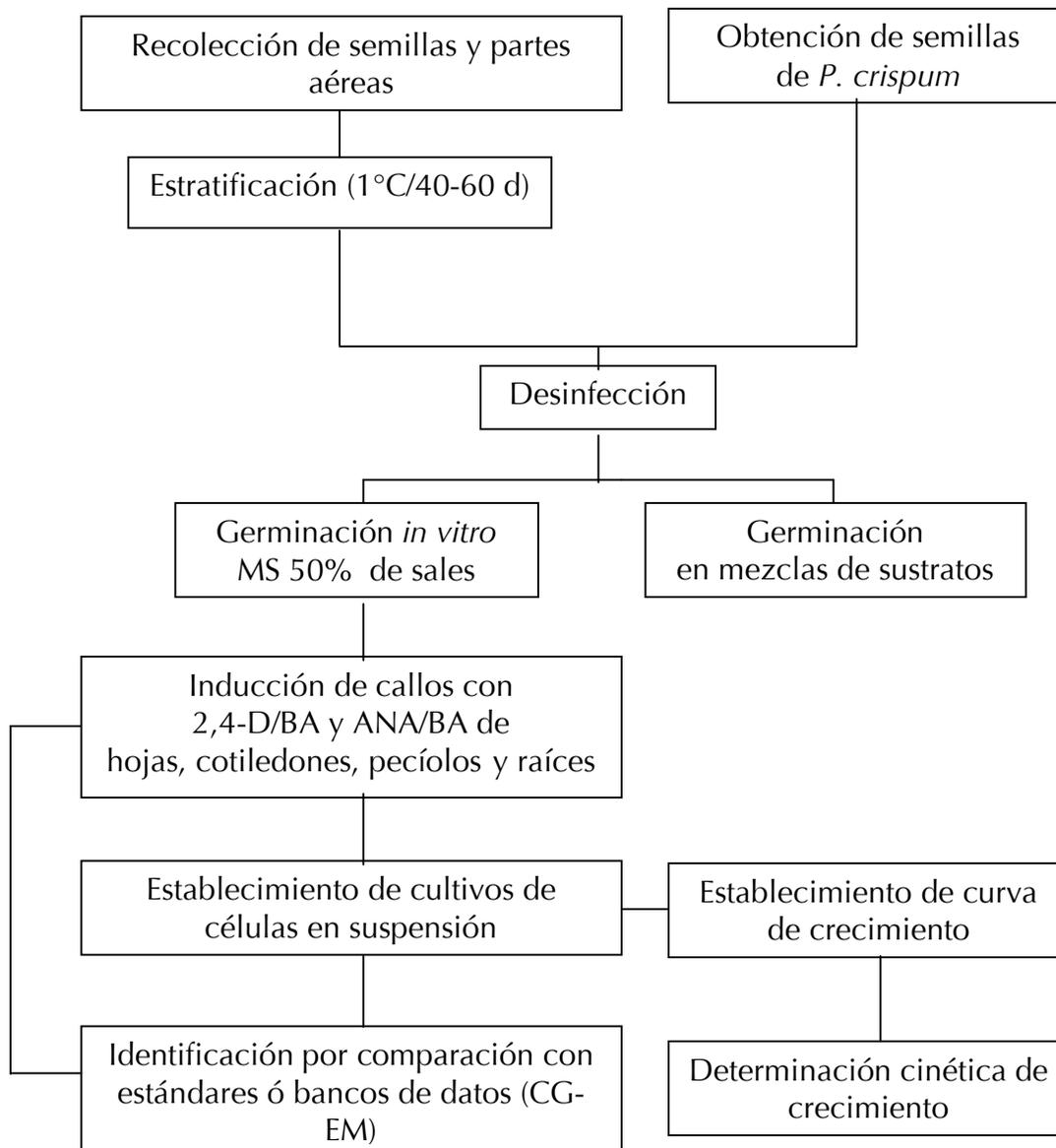
General:

1. Establecer condiciones *in vitro* para inducir la morfogénesis y la biosíntesis *in vitro* a partir de distintos explantes de *Ligusticum porteri* y *Petroselinum crispum*.

Particulares:

1. Determinar las condiciones para la germinación *in vitro* y en suelo de las semillas de *Ligusticum porteri* y *Petroselinum crispum*.
2. Establecer cultivos de callo y de células en suspensión de segmentos de tallo, raíz, cotiledón, hoja y pecíolo de ambas especies.
3. Evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en las combinaciones ANA/BA y 2,4-D/BA en la formación de callo y en cultivos en suspensión de ambas especies.
4. Establecer una curva de crecimiento a partir de cultivos de células en suspensión de todos los explantes de ambas especies.
5. Determinar la cinética de crecimiento de las células en suspensión de los explantes de ambas especies.
6. Determinar la presencia de Z-ligustílida en los distintos explantes estudiados de ambas especies utilizando técnicas cromatográficas.

METODOLOGÍA GENERAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las semillas de *L. porteri* (técnicamente mericarpos) fueron recolectadas en el Municipio de Guachochi en la localidad de Basigochi a 2433 m.s.n.m. (Latitud Norte 27° 12' 53", Longitud Oeste 107° 23' 22") en el Estado de Chihuahua en México del 8 al 22 de octubre del 2005 (Bye 34467).

Las partes aéreas de plantas de aproximadamente 3 años de edad se recolectaron en el Municipio de Guachochi en la localidad de Simuchichi a 2261 m.s.n.m (Latitud Norte 27° 14' 38" Longitud Oeste 107° 05' 42") en el Estado de Chihuahua, México el 18 octubre del 2006 (Bye 34820).

Las semillas de *P. crispum* se adquirieron en un mercado local en la Ciudad de México de la marca comercial "Semillas Vita" (Rancho Los Molinos S. P. R. de R. L. Morelos, México).

Desinfección de semillas

La germinación de semillas de *L. porteri* y *P. crispum* se realizó en condiciones asépticas. Las semillas de *L. porteri* se hidrataron previamente por 1 h en agua destilada y se escarificaron con pinzas. La desinfección superficial se realizó en agitación de la siguiente manera: (1) solución de detergente por 20 min, (2) solución de peróxido de hidrógeno (7% v/v) por 7 min, (3) solución de terramicina (200 mg/100 ml) por 10 minutos, (4) solución de cuprimicin (300 mg/100 ml) por 10 minutos, (5) solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico) 10% v/v por 10 min y (6) solución de PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, Inc.) (1 ml/49 ml) por 2 h. Después de cada solución, las semillas se enjuagaron dos veces con agua destilada excepto después de la solución de PPM.

Germinación in vitro

Para la germinación de ambas especies se utilizó el medio nutritivo de Murashige-Skoog (1962) al 50% de sales y 1.5% de sacarosa (MS-50). El pH del medio se ajustó a 5.7 y se solidificó con 4 g/L de phytigel. El medio se repartió (25 ml) en frascos de vidrio de 100 ml y fue esterilizado en

autoclave a 120°C y 1.5 Kg/cm² por 17 min. Se sembraron 4 semillas por frasco. Los cultivos se mantuvieron a 21°C en oscuridad hasta la germinación, después de esto, las plántulas se expusieron a un fotoperíodo de 16 h luz (fluorescente 1000 – 2000 luxes) y 8 h de oscuridad.

Germinación ex vitro

Se sembraron 30 semillas de *L. porteri* en charolas (30 x 30 cm) con diferentes mezclas de sustratos: (a) *Sphagnum* y suelo de Chihuahua (1:1), (b) agrolita, (c) hojarasca y agrolita (1:1) y (d) suelo de Chihuahua a una profundidad de 1.5 cm y se mantuvieron en un invernadero.

Análisis fisicoquímico de suelo

Se analizó una muestra de 180 g de suelo colectado en Chihuahua en un bosque de pino-encino en el Municipio de Guachochi en la localidad de Piedras Blancas en Chihuahua, México donde crece *L. porteri*. La muestra fue tamizada en una malla de 2 mm para obtener los siguientes datos fisicoquímicos: pH, contenido de P y cationes intercambiables para analizar la riqueza de minerales.

Inducción a callo

De plántulas de *L. porteri* y *P. crispum* de 3 a 5 meses de edad germinadas *in vitro*, se obtuvieron explantes de tallo (2 cm de longitud), raíz (primaria y secundaria), pecíolo (3-8 cm de longitud), cotiledones (separados) y hoja (lámina completa) y se cultivaron en medio de inducción MS-50 adicionado con 2,4-D (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L) con BA (0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L) y ANA (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/L) con BA (0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L) a 21°C durante un mínimo de 30 días. En cada frasco de cultivo se sembró un explante. Se hicieron 5 repeticiones por tratamiento.

Establecimiento de los cultivos de células en suspensión

Los explantes con callo se seccionaron en fragmentos de 5 mm³ y se transfirieron a medio MS-50 con la misma combinación hormonal de su medio de inducción. Se sembró un fragmento de callo

por frasco (100 ml) en 25 ml de cultivo. Se colocaron en una plataforma de agitación orbital a 90 r.p.m. y se incubaron en luz en las condiciones ya mencionadas. Se hicieron subcultivos cada 4 semanas.

Cinética de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento de los cultivos de células en suspensión, debido a la poca biomasa, se tomaron todos los explantes de callos de cultivos de raíz, hoja, cotiledón y pecíolo de *L. porteri* (2,4-D, 4 mg/L) y pecíolo, hoja, raíz (ANA/BA 4:1) y cotiledón (2,4-D/BA 4:1) de *P. crispum*. El material vegetal se repartió en 20 frascos de 100 ml con 25 ml de medio MS-50 líquido con la misma combinación de reguladores de procedencia. Los frascos se mantuvieron en una plataforma de agitación orbital a 90 r.p.m., se incubaron en luz en las condiciones ya mencionadas y se dejaron de 30 a 60 días para su establecimiento en medio líquido.

Se tomaron las lecturas cada 8 días. Por cada punto (20 en total) en la curva de crecimiento, se tomaron tres alícuotas de 1 ml cada una, considerándose tres repeticiones por punto. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 1.5 ml de volumen. Cada muestra se centrifugó en una centrífuga Eppendorf 5415D a 2 600 r.p.m. por 3 min y posteriormente se pesó el tubo en una balanza analítica para determinar el volumen del paquete celular. Las muestras fueron almacenadas a 1°C.

Se analizaron distintas etapas de todos los cultivos de ambas especies con un fotomicroscopio Axoskop C. Zeiss en campo claro (cc) y contraste de fases (cf). Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Anatomía e Histología del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

Obtención de los extractos de L. porteri y P. crispum

Para determinar la presencia o ausencia de Z-ligustíflida, se analizaron los siguientes extractos de ambas especies (Tabla 15):

Tabla 15. Procedencia del material vegetal analizado.

<i>L. porteri</i>	<i>P. crispum</i>
Partes aéreas (pecíolos y hojas) 3 años de edad (Chihuahua)	Partes aéreas (pecíolos y hojas) 6 meses de edad (invernadero)
Partes aéreas 8 meses de edad (invernadero)	Partes aéreas 3 meses de edad (<i>in vitro</i>)
Raíz 8 meses de edad (invernadero)	Raíces 3 meses de edad (<i>in vitro</i>)
Partes aéreas 3 meses de edad (<i>in vitro</i>)	Raíz 6 meses de edad (invernadero)
Raíces 3 meses de edad (<i>in vitro</i>)	Callo cotiledón (MS-50 ANA/BA 3:0.5)
Semillas (Chihuahua)	Callo hoja (MS-50 ANA/BA 4:1)
Callos raíz y cotiledón (MS-50 2,4-D/BA 2:1)	Callo tallo (MS-50 ANA/BA 2:1)
Callo pecíolo (MS-50 2,4-D/BA 4:0.5)	
Callo semillas (GA ₃ 2:0)	
Callo raíz (MS-50 ANA/BA 1:1)	
Callo hoja (MS-50 2,4-D/BA 4:1)	
Callo cotiledón (MS-50 2,4-D 0.5:0)	
Callo tallo (MS-50 2,4-D/BA 4:2)	
Callo tallo (MS-50 2,4-D/BA 0.1:3)	
Callo pecíolo (MS-50 2,4-D/BA 0.1:1)	
Callo raíz (MS-50 2,4-D/BA 0.1:1)	
Callo raíz (MS-50 2,4-D/BA 0.1:3)	
Callo raíz (MS-50 ANA/BA 4:2)	
Callo hoja (MS-50 2,4-D/BA 1:1)	
Callo pecíolo (MS-50 2,4-D/BA 1:1)	
Callo raíz (MS-50 BA 3:0)	
Callo hoja (MS-50 ANA/BA 4:2)	
Callo cotiledón (MS-50 2,4-D/BA 0.1:0.5)	
Callo pecíolo (MS-50 2,4-D/BA 0.1:3)	
Callo raíz (MS-50 ANA/BA 3:1)	
Callo raíz (MS-50 ANA/BA 1:1)	
Callo pecíolo (MS-50 ANA/BA 4:1)	
Callo cotiledón (MS-50 2,4-D/BA 1:1)	
Callo tallo (MS-50 2,4D/BA 0.1:3)	
Callo pecíolo (MS-50 2,4-D/BA 0.1:1)	
Callo raíz (MS-50 ANA/BA 4:2)	
Callo pecíolo (MS-50 2,4-D/BA 0.1:3)	

Los extractos preparados por maceración con CH₂Cl₂-MeOH 1:1 se analizaron por CCF utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice y como sistema de elución, mezclas compuestas de hexano, acetato de etilo, tolueno, ácido acético glacial y cloroformo en diversas proporciones. Para revelar las placas se utilizó como reactivo visualizador una solución de sulfato cérico. En todos los casos las placas se observaron previamente con luz UV y se utilizó una solución estándar de Z-ligustilida para detectar la presencia o ausencia en sus extractos.

Cromatografía en columna abierta

El extracto de partes aéreas (10 g) se preabsorbió en 31 g de gel de sílice (Merck 60). Se empacó una columna de vidrio con 250 g de gel de sílice (tamaño de la partícula 0.063-0.200 mm Merck 60) como fase estacionaria y se eluyó con mezclas de hexano y acetato de etilo, como fase móvil, aumentando gradualmente la polaridad. Se colectaron alícuotas de 50 ml, se destilaron a 60°C en un rotaevaporador a presión reducida y se analizaron por CCF.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Edificio A de la Facultad de Química de la UNAM.

Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Para la caracterización de los componentes presentes en las muestras a partir del análisis de los espectros de masas en su modalidad impacto electrónico se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N) con inyector split (relación split 1/50) acoplado a un espectrómetro de masas (LECO Pegasus 4D) con un analizador másico TOF (tiempo de vuelo) a baja resolución. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida semipolar DB-5MS (5% fenil 95% metilpolisiloxanos) de 10 m de longitud x 0.18 mm de diámetro interno x 0.18 µm de grosor de película. Se empleó helio como gas acarreador a flujo constante de 1 ml/min. La temperatura del inyector fue de 300°C. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250°C y la de la fuente de ionización de 200°C. Los análisis se realizaron a 70 eV, utilizando el modo de barrido total del espectro de 45 a 800 m/z para la identificación de iones para la caracterización. Las muestras se compararon con la biblioteca de espectros de masas NIST (NIST Mass Spectral Search ver. 2.0) en conjunto con datos de la literatura y con estándares de referencia.

Este trabajo fue realizado en la Sección de Espectrometría de Masas de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el Edificio B de la Facultad de Química de la UNAM.

Pruebas preliminares de Ligusticum porteri

Prueba de viabilidad de semillas

La determinación de la viabilidad de los embriones se evaluó con la técnica de tinción con tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio, TTZ) de acuerdo a Schmidt (2000) (Apéndice I). Se utilizaron 10 semillas por cada lote de muestras. A cada semilla se le hizo una perforación (1-2 mm) con pinzas para permitir que el TTZ penetrara la semilla. Las semillas se mantuvieron en oscuridad a 21 °C por 24 h. Después de transcurrido este tiempo se analizaron las semillas bajo el microscopio estereoscópico.

Se hicieron 5 lotes de semillas de acuerdo al tiempo de horas frío (estratificación) a diferentes temperaturas:

1. Semillas de 7 años de edad mantenidas a -10°C
2. Semillas de 8 meses de edad mantenidas a 10°C por 7 meses
3. Semillas de 8 meses de edad mantenidas a 10°C por 2.5 meses
4. Semillas de 8 meses de edad mantenidas a 10°C por 2 meses
5. Semillas de 8 meses de edad mantenidas a 10°C por 1 mes

Con la técnica del TTZ se puede evaluar la actividad bioquímica de la semilla determinando si ésta es viable o no. El principio del TTZ, desarrollado por Lakon (1949), indica la actividad del grupo de las deshidrogenasas, las cuales son responsables de los procesos reductores en los tejidos vivos. En la penetración en las células vivas, el TTZ es reducido a formazán, un compuesto rojizo, estable y no soluble. La reacción ocurre dentro de o cerca de las células vivas que están liberando hidrógeno en el proceso de la respiración. Los tejidos sanos producen un color rojo normal. Tales tejidos resisten la velocidad de penetración de TTZ. La proporción de liberación de hidrógeno en tejidos sanos es lenta comparado con aquella en tejidos parcialmente debilitados. Los tejidos vivos débiles producen un color anormal. Tales tejidos han perdido algo de la resistencia inicial a la penetración de TTZ. La respiración se acelera y el formazán se produce rápidamente. Durante las fases tempranas de deterioro, estos tejidos se ponen rojo oscuro más rápidamente que los tejidos sanos, saludables. Los tejidos muertos no se tiñen y permanecen normalmente blancos (tejido viejo) debido a la pérdida de respiración que previene la producción del formazán por los tejidos embrionarios (Roberts, 1972).

Germinación en mezclas de sustratos

Debido a la falta de información sobre la germinación de las semillas de *L. porteri*, se ensayaron diferentes mezclas de sustratos en distintas proporciones, temperaturas de incubación, luz, lotes de semillas y contenedores.

1. Se colocaron 100 g de semillas sin previa hidratación y sin estratificación en una bolsa de organza y se colocaron en un recipiente con suelo de Chihuahua por un mes a 25°C para estimular la germinación (Orozco, *com. pers.*).
2. Se ensayaron dos mezclas de sustrato de 500 g, una con *Sphagnum*, tierra negra y agrolita (1:1:1) y otra con *Sphagnum* y agrolita (1:1). Se esterilizó el material en autoclave (40 min a 1.5 Kg/cm² a 121°C) y en 80 frascos de vidrio con 25 g de la mezcla se sembraron 2 semillas desinfectadas por frasco. Se mantuvieron a 21°C en un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.
3. En charolas de plástico (30 x 30 cm) se colocaron 500 g de las mezclas mencionadas y mezclas de tierra negra y tierra de hoja (1:1) sin desinfectar, se sembraron 20 semillas desinfectadas por charola. Las semillas se incubaron a temperatura ambiente en invernadero y se regaron cada 7 días.
4. Adicionalmente, se utilizó suelo recolectado en el Municipio de Guachochi en la localidad de Piedras Blancas en Chihuahua en donde habían poblaciones de *L. porteri*. Se hicieron tres tratamientos: (1) suelo y semillas sin desinfectar; (2) suelo sin desinfectar y semillas desinfectadas y (3) suelo y semillas desinfectadas. En los dos primeros tratamientos se sembraron 20 frascos con 3 semillas cada uno y en el último se sembraron 40 frascos con 3 semillas cada uno. Se mantuvieron a 21°C en un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad hasta su germinación.

Desinfección de explantes

Se ensayaron varios métodos de desinfección conforme se fueron generando resultados. En la Tabla 16 se muestran los diferentes tratamientos utilizados para la desinfección de los distintos explantes. Las concentraciones utilizadas de cada antibiótico y fungicida de cada tratamiento fueron las siguientes: Benomilo 1 g/500 ml, Gentamicina 20 mg/1 ml (ampolleta), Amoxicilina 500 mg/500 ml (cápsula), Terramicina 200 mg/100 ml, Cuprimicin 300 mg/100 ml, PPM 3 ml/L y Tecto 60

1g/500 ml a menos que se indique otra concentración. La solución de agua oxigenada fue de 10% (v/v) y la de hipoclorito de sodio de 10 ml/20 ml a menos que se indique otra concentración.

Tabla 16. Distintos tratamientos de desinfección de explantes y semillas.

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>	<i>14</i>
AD 10-15 min SD 5 min	AD 10-15 min SD 5 min	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Bn (50mg/100ml*15min) con y sin enjuague en ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 1 h ESC
AO 10% 7 y 3.5 min	AO 10% 7 y 3.5 min	MS 50%	T60 (1g/100ml*15min) con y sin enjuague en ADE	MS 50% Bn 15 min, Gm 30min y Am (100mg/100ml*30min)	MS 50% PPM, Bn, Gm y Am	MS 50% PPM	MS 50% Gm y Am	MS 50% Bn y T60	MS 50% Gm, Am, Bn y T60	MS 50% Gm, Am y PPM	MS 50% Bn, T60 y PPM	MS 50% Gm, Am, Bn, T60 y PPM	SD 20 min
Terr 10 min	Terr 10 min		MS 50%	MS 50% T60 (1g/100ml*15min), Gm 30min y Am (100mg/100ml*30min)									AO 10% 7 min
Cp 10 min	Cp 10 min												Terr (200 mg/100 ml* min)
Cl 10% 10 y 5 min PPM 2 h	Cl 10% 10 y 5 min PPM 3 y 20 h												Cp (300 mg/100 ml* min)
MS 50% PPM (1ml/L)	MS 50%												Cl 10% 10 min PPM (1 ml/49 ml*2 l sin enjuague)

Abreviaturas:

ADE: agua destilada esterilizada, **AD:** agua destilada, **AC:** agua corriente, **SD:** solución de detergente, **AO:** agua oxigenada, **Terr:** terramicina, **Bn:** benomilo, **T60:** tecto 60, **Cp:** cuprimicin, **Am:** amoxicilina, **Gm:** gentamicina, **Cl:** solución de hipoclorito de sodio, **PPM:** plant preservative mixture, **ESC:** escarificación.

Tabla 16. Distintos tratamientos de desinfección de explantes y semillas.

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>	<i>14</i>
AD 10-15 min SD 5 min	AD 10-15 min SD 5 min	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Bn (50mg/100ml*15min) con y sin enjuague en ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 5 min Cl 1 min ADE	AC 1 h ESC
AO 10% 7 y 3.5 min	AO 10% 7 y 3.5 min	MS 50%	T60 (1g/100ml*15min) con y sin enjuague en ADE	MS 50% Bn 15 min, Gm 30min y Am (100mg/100ml*30min)	MS 50% PPM, Bn, Gm y Am	MS 50% PPM	MS 50% Gm y Am	MS 50% Bn y T60	MS 50% Gm, Am, Bn y T60	MS 50% Gm, Am y PPM	MS 50% Bn, T60 y PPM	MS 50% Gm, Am, Bn, T60 y PPM	SD 20 min
Terr 10 min	Terr 10 min		MS 50%	MS 50% T60 (1g/100ml*15min), Gm 30min y Am (100mg/100ml*30min)									AO 10% 7 min
Cp 10 min	Cp 10 min												Terr (200 mg/100 ml ^s min)
Cl 10% 10 y 5 min PPM 2 h	Cl 10% 10 y 5 min PPM 3 y 20 h												Cp (300 mg/100 ml ^s min)
MS 50% PPM (1ml/L)	MS 50%												Cl 10% 10 min PPM (1 ml/49 ml*2 l sin enjuague)

Abreviaturas:

ADE: agua destilada esterilizada, **AD:** agua destilada, **AC:** agua corriente, **SD:** solución de detergente, **AO:** agua oxigenada, **Terr:** terramicina, **Bn:** benomilo, **T60:** tecto 60, **Cp:** cuprimicin, **Am:** amoxicilina, **Gm:** gentamicina, **Cl:** solución de hipoclorito de sodio, **PPM:** plant preservative mixture, **ESC:** escarificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Material biológico

Una muestra de aproximadamente 1000 semillas de *L. porteri* se sometió a estratificación a 1°C por 40 días para inducir la germinación, de acuerdo a Robinson (1954) y los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de *L. porteri*. El resto de las semillas permanecieron en estratificación.

En la gran mayoría de las especies no tropicales, la dormancia fisiológica de sus semillas es interrumpida cuando éstas son sometidas a temperaturas que van desde 1 a 10°C. En la naturaleza esto ocurre para prevenir la germinación de las semillas hasta que haya pasado el invierno. La temperatura baja actúa reduciendo la tasa de reacciones enzimáticas que tienen lugar en las semillas, retardando así algunos de los procesos metabólicos de la germinación (Bewley y Black, 1994). En el caso de las semillas de *L. porteri*, al caer al suelo en otoño, pasan el invierno cubiertas de nieve aproximadamente hasta primavera, explicando así la necesidad de estratificar sus semillas para lograr su germinación *ex situ*.

Esta información concuerda con los resultados obtenidos por Vandeloos y cols. (2007), quienes estratificaron las semillas de *Chaerophyllum temulum* (Apiaceae) a 5°C por 20 semanas, logrando el 80% de germinación, aún en semillas tratadas posteriormente con temperaturas más altas (23°C) y con GA₃ (10, 100, 1000 mg/L). Llegando a la conclusión de que GA₃ no sustituye el tiempo frío necesario para la germinación de las semillas de esta especie.

Desinfección de semillas

Una fuerte limitante para el desarrollo de la investigación fue el hecho de que los distintos lotes de semillas presentaron contaminación por microorganismos tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. Por ello, para resolver esta situación se desarrolló un tratamiento de desinfección (Tabla 16), de los cuales el método 14 fue el más efectivo, lo que hizo posible la obtención de plántulas a través de la germinación aséptica de las semillas. La diferencia sustancial fue la inclusión de PPM (1 ml/ 49 ml de agua destilada) en el procedimiento de esterilización superficial.

El PPM es un biocida y fungicida de amplio espectro utilizado para el cultivo de tejidos vegetales ya que previene la germinación de esporas y en concentraciones mayores elimina contaminantes endógenos de explantes. El PPM tiene como blanco enzimas esenciales en el ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones (www.ppm4plant-tc.com).

Naill y Roberts (2005) lograron obtener suspensiones celulares de *Taxus cuspidata* libres de patógenos con la adición de PPM (0.2% v/v) al medio de cultivo (MS) sin mostrar efectos negativos sobre el crecimiento o viabilidad de éstas, contrastando con la penicilina y estreptomycin, ésta última disminuyendo el crecimiento celular y ambas, en combinación, mostrando el mismo resultado. Li y cols. (2000) lograron la germinación aséptica de semillas de *Scutellaria baicalensis* en medio MS adicionado con PPM (4 ml/L).

La inclusión del PPM en el tratamiento de desinfección eliminó toda contaminación microbiana en el establecimiento de las plántulas de *P. crispum*, no obstante, para *L. porteri*, una especie silvestre cuyas semillas fueron recolectadas de sus poblaciones naturales, sus semillas presentaron 17.5% de contaminación, principalmente fúngica. Este fue uno de los resultados que mostró una gran diferencia entre ambas especies y principalmente entre especies silvestres y domesticadas.

En el proceso de la desinfección superficial de las semillas de *L. porteri*, al ser sumergidas en agua corriente, el 20% de ellas flotaban en la superficie y éstas al ser vistas bajo el microscopio estereoscópico, presentaron en su interior larvas de color blanco a amarillento de aproximadamente 3.5 mm de longitud pertenecientes al grupo Hymenoptera y la familia Chalcididae (García, 2008) (Figura 14). Esta familia de insectos parasitan semillas de manzanas y otras frutas (Peterson, 1962).

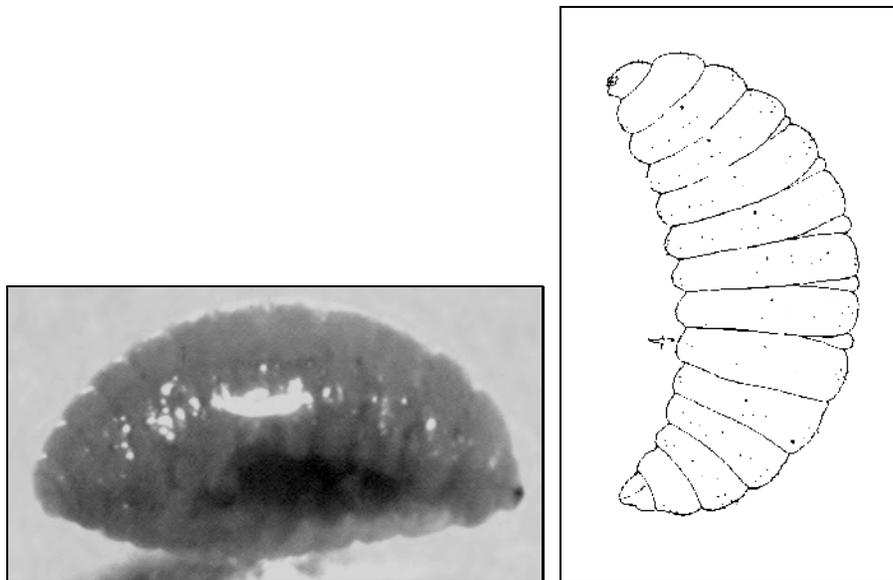


Figura 14. Larva presente en las semillas de *L. porteri*.

White (1988) reporta que las larvas de *Euleia heraclei* (grupo Diptera, familia Tephritidae) se alimentan de las hojas de *L. scoticum* y la larva de este insecto ha sido asociada a un gran número de especies de la familia Apiaceae como *Ammi*, *Angelica*, *Apium*, *Berula*, *Bupleurum*, *Conium*, *Daucus*, *Heracleum*, *Levisticum*, *Petroselinum*, *Pimpinella* y *Tordylium* entre otros.

Robinson (1954) y Flemion (1949) mencionan a *Lygus oblineatus* (grupo Heteroptera, familia Miridae) como el causante de que las semillas de eneldo, zanahoria, apio, cilantro, hinojo, perejil y pastinaca carezcan de embrión, reduciendo en un rango del 33 al 85% la viabilidad de estas semillas. Sin embargo, el grupo Hymenoptera no había sido reportado como parásitos de especies de la familia Apiaceae ni específicamente de *L. porteri*, por lo que se suma a la problemática en la conservación de esta especie al disminuir el número de semillas viables.

Germinación in vitro

Por definición, la germinación comienza con la absorción de agua por la semilla (imbibición) y termina con la elongación del eje embrionario, generalmente la radícula. El signo visible de que la germinación está completa es generalmente la penetración de la radícula a las estructuras que rodean al embrión (Bewley y Black, 1994; Bentsink y Koornneef, 2002). La emergencia de la radícula fue el parámetro que se tomó en cuenta para determinar si las semillas habían germinado o no.

Las semillas de *P. crispum* germinaron entre la tercera y quinta semana de incubación de manera sincrónica, mientras que las de *L. porteri* germinaron a partir de la tercera semana de incubación de manera asincrónica (Tabla 4). A diferencia de las semillas de *L. porteri*, las de *P. crispum* no necesitaron estratificación, ni escarificación y no presentaron contaminación bacteriana o fúngica después de la desinfección de semillas.

Una semilla puede permanecer viable o viva pero ser incapaz de germinar o crecer por varias razones. Éstas pueden ser por condiciones *internas* o *externas*. Una situación interna puede ser que el embrión no ha alcanzado la madurez morfológica para germinar. La germinación de semillas de plantas silvestres a menudo está limitada internamente de una u otra forma, pero las semillas de muchas plantas domesticadas están limitadas únicamente por la falta de humedad y/o falta de calor. A partir de estas dos situaciones se pueden diferenciar la *quiescencia* que es el estado de una semilla cuando su incapacidad para germinar solo se debe a que no se dan las condiciones externas adecuadas, como el caso de *P. crispum*, y la *latencia* que es el estado de una semilla cuando su incapacidad para germinar se debe a condiciones internas, aunque las condiciones externas (temperatura, humedad y atmósfera) sean adecuadas, como el caso de *L. porteri* (Salisbury y Ross, 1992). Esta fue otra de las diferencias notables

entre *L. porteri* y *P. crispum*, la germinación diferencial bajo las mismas condiciones de incubación entre ambas especies (Tabla 4).

Las plántulas de *L. porteri* tuvieron, en general, un crecimiento muy lento en comparación con las plántulas de *P. crispum* que tuvieron un crecimiento más rápido, es decir, después de una semana de germinación, emergió una hoja color verde claro y dos semanas después emergieron más pecíolos con hojas, ambos verde claro. De las plántulas de *L. porteri* que lograron germinar, la hoja emergió después de los tres meses a partir de la germinación. Las hojas y pecíolos, en la mayoría de las ocasiones se tornaron rojizos, lo que es común en plantas adultas en su hábitat natural. El 30% de las plántulas que germinaron, murieron después de dos semanas, se tornaron café oscuro o pajizo, posiblemente por las condiciones de luz y temperatura en las que fueron incubadas.

Las raíces de *L. porteri* tuvieron una elongación muy escasa (1-5 cm) y no hubo desarrollo de raíces secundarias. El color de las raíces fue de color café muy claro. En plántulas de dos meses de edad se distinguió el olor característico de la raíz. Si el micrópilo de las semillas no estaba en contacto con el medio, la radícula emergía sin tropismo negativo y moría en poco tiempo, a menos que se invirtiera su posición, aunque no siempre con éxito.

Las raíces de *P. crispum* emergieron sin importar la posición del micrópilo y desarrollaron raíces hialinas muy largas y delgadas e incluso raíces secundarias. En general, las plántulas se desarrollaron de manera normal comparadas con las plántulas germinadas *ex vitro*, las cuales también presentaban una raíz principal y secundarias de color amarillo muy claro, sin embargo sus raíces presentaban un engrosamiento no observado en plántulas germinadas *in vitro*.

Las plántulas de *P. crispum* tuvieron un mejor crecimiento y desarrollo en las condiciones ensayadas, tanto *in vitro* como *ex vitro*. Lo cual concuerda con los atributos (Tabla 4) descritos para especies cultivadas. *L. porteri* demostró ser una especie de alta especificidad para las condiciones de su hábitat.

Germinación ex vitro

Las semillas de ambas especies que fueron sembradas en tierra de hoja y tierra negra (1:1) y suelo de Chihuahua, germinaron más rápido, aproximadamente en menos de dos semanas, que las plántulas germinadas *in vitro*, con un 80% de germinación y 90% de sobrevivencia para *L. porteri* y 100% en ambos casos para *P. crispum*. Las plántulas de *L. porteri* tuvieron un desarrollo más regular, es decir, las raíces se elongaron más en comparación con las germinadas *in vitro*, se observó el mismo color café muy claro, un engrosamiento, hubo desarrollo de raíces secundarias y se distinguió el olor característico de

éstas. Las hojas y pecíolos no se tornaron rojizos, se elongaron más en comparación con las plántulas germinadas *in vitro*.

Análisis fisicoquímico de suelo

En una malla de 2mm se tamizó una muestra de suelo colectado en Chihuahua, obteniendo 181 g. El resultado del análisis fisicoquímico se ilustra en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados del análisis de suelo de Chihuahua.

pH agua 1:2.5	pH KCl 1:2.5	P mg/kg	Cationes intercambiables cmol/kg			
			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺
6.09	5.30	30.9	37.18	4.82	5.65	0.13
6.05	5.31	33.4	39.17	4.72	5.84	0.18
X = 6.07	5.31	32.15	38.18	4.77	5.75	0.16

De acuerdo a este análisis, las cantidades de Ca²⁺ >20, de Mg²⁺ >6.5 y K⁺ >1.5 son indicadoras de un suelo muy rico, por lo que esos datos indican un suelo muy fértil, de regiones frías con alta precipitación y lenta descomposición de la materia orgánica. Por lo que podrían no ser las condiciones del suelo las que están limitando la germinación, el crecimiento y establecimiento de las plántulas de *L. porteri* en su hábitat natural.

Inducción a callo

Debido a la baja sobrevivencia de las plántulas de *L. porteri* germinadas *in vitro*, el número de explantes a cultivar fue muy escaso y por ello fue un reto difícil explorar la respuesta a diferentes reguladores de crecimiento. El 80% de los explantes cultivados en medio de inducción MS-50, derivaron en un callo pajizo, compacto, poco friable, pequeño y de lento crecimiento en un período aproximado de 2 a 3 meses de inducción. Se observó un crecimiento limitado, que en algunos casos se debió a una oxidación basal, en contacto con el medio de cultivo, que progresó al resto del tejido. Se observó que al aumentar las concentraciones de ambas auxinas, el 90% de los explantes de *L. porteri* se oxidaron y murieron, lo cual contrastó con el 90% de los explantes de *P. crispum* que dieron lugar a un callo verde, hialino, altamente friable, de gran volumen y de rápido crecimiento sin importar la concentración de auxinas.

Después de 30 a 40 días de inducción; de los explantes de *L. porteri* y *P. crispum* que dieron lugar a callo, éstos fueron seccionados en piezas de 5 mm² y transferidos a 25 ml de medio MS-100 líquido en agitación a 90 r.p.m., con la misma concentración de reguladores. Después de dos semanas, el 90% de los explantes de *L. porteri* se oxidaron y murieron o presentaron contaminación fúngica.

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos de inducción a callo de los explantes de *L. porteri* con los reguladores de crecimiento 2,4-D, ANA y BA.

Tabla 18. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción a callo de explantes de plántulas germinadas *in vitro* de *L. porteri*. Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los cultivos.

<i>Regulador de crecimiento</i>	BA 0 mg/L	BA 0.5 mg/L	BA 1 mg/L	BA 2 mg/L	BA 3 mg/L
2,4-D 0 mg/L	R, C, P	R	R	R	R
2,4-D 0.1 mg/L	P	C, H, P, T	H, P, R, T	P, H, R	C, H, P, R, T
2,4-D 0.5 mg/L	C, P, R	-	-	-	-
2,4-D 1 mg/L	R	-	C, H, P, R	-	-
2,4-D 2 mg/L	-	-	C, H, R	-	-
2,4-D 3 mg/L	-	-	C, H, P	-	-
2,4-D 4 mg/L	C, H, P, R,	H, P, R, T	C, H, P, R	T	-
ANA 0 mg/L	R, C, P	R	R	R	R
ANA 0.1 mg/L	-	T, C	H, T	T	T, H
ANA 1 mg/L	-	-	C, P, H, R	-	-
ANA 0.5 mg/L	P	-	H	-	--
ANA 2 mg/L	-	-	H, R	-	-
ANA 3 mg/L	-	-	C, R, P	-	-
ANA 4 mg/L	C, P, R H	-	C, H, P, R	H, R, T	-

C: cotiledón, H: Hoja, P: Pecíolo, T: Tallo, R: Raíz
(-): sin explorar o sin respuesta

Al término de 30 días de inducción, los cultivos que presentaron los mejores resultados para *L. porteri*, es decir que dieron lugar a la formación de callo en todos los explantes, fueron las combinaciones de 2,4-D 1, 2, 3, 4 mg/L con BA 1 mg/L (Figura 15A-D), sin embargo, muchos de estos explantes no sobrevivieron la transferencia a medio MS líquido, debido a que sufrieron contaminación fúngica, no obstante que derivaron de plántulas germinadas en condiciones asépticas.

Los callos de raíces de todos los tratamientos, siempre dieron origen a un pecíolo con hoja, sin importar si la raíz dio lugar a callo o no. Esto se debió a que el corte de la raíz incluía al tallo, el cual es una zona comprimida entre el pecíolo y la raíz en esta especie, y que posiblemente una parte de él quedó incluida en el explante considerado como “raíz”. Los cotiledones y los pecíolos dieron lugar a un callo de poco tamaño, de color pajizo, compacto y poco friable.

En términos de formación de callo con las combinaciones de ANA/BA y 2,4-D/BA se tuvo una inducción homogénea, frecuente y abundante, es decir, los 5 tipos de explantes estudiados dieron lugar a

callo (Gráfica 1). En la Figura 15 se ilustran algunas respuestas morfológicas de los cinco explantes estudiados de *L. porteri*.



Figura 15. . Algunas respuestas morfológicas de los explantes de *L. porteri* con distintas combinaciones de 2,4-D/BA y ANA/BA. A. Cotiledón ANA/BA (3:1), B. Raíz y tallo ANA/BA (3:1), C. Hoja ANA-BA (3:1), D. Tallo 2,4-D/BA (0.1:1), E. Hoja 2,4-D/BA (4:1), F. Raíz y tallo 2,4-D/BA (1:1), G. Tallo 2,4-D/BA (4:2), H. Cotiledón 2,4-D (0.5:0), I. Pecíolo ANA (4:0), J. Pecíolos 2,4-D/BA (0.1:1), K. Pecíolo 2,4-D/BA (3:1), L. Cotiledón 2,4-D/BA (0.1:0.5), M. Hoja ANA/BA (0.1:3). Barra: 1.5 cm.

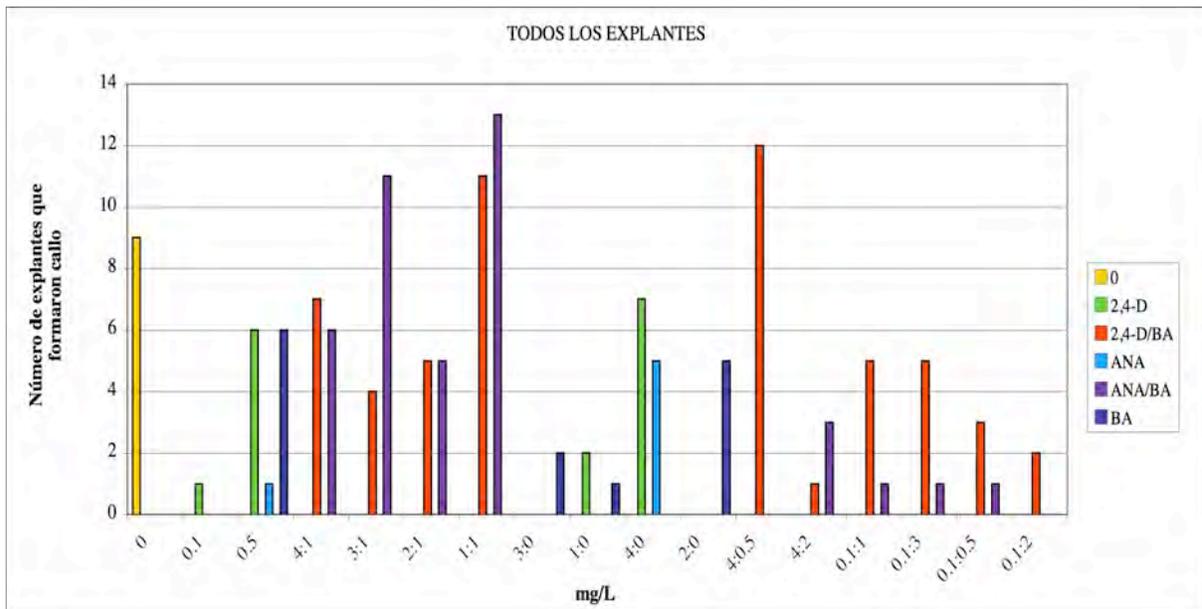
Los callos de *L. porteri* fueron escasos (2–5 cm²), de poca biomasa, de color amarillo pajizo a café oscuro, en pocos casos fue verde (Figura 15J), poco friables, compactos, de apariencia granulada y de lento crecimiento. Los explantes de raíz que incluían el tallo, dieron lugar a la formación de una hoja (Figura 15F), lo que también demuestra que el tallo tiene la capacidad de regeneración, aún cuando la raíz haya desarrollado callo.

En la Gráfica 1 se muestran las respuestas morfológicas de todos los explantes de *L. porteri* demostrando cuantos explantes tuvieron respuesta a la inducción de callo. El único tratamiento donde se presentó callo en los 5 tipos de explantes fue 2,4-D/BA (0.1:3). Sin embargo, los tratamientos con 2,4-D/BA (4:1), 2,4-D/BA (1:1) y 2,4-D (4 mg/L) y las combinaciones de ANA/BA (1:1), ANA/BA (4:1) también presentaron la formación de callo.

Es notable que distintas concentraciones de 2,4-D, desde 0.1 mg/L hasta 4 mg/L, en combinación con BA (1 mg/L) tuvieron un efecto en la formación de callo a pesar de que se hizo una amplia exploración en cuanto a combinaciones de reguladores de crecimiento (35 en total; 7 de 2,4-D, 6 de ANA y 5 de BA), lo que sugirió que esta especie se mostró recalcitrante a otras combinaciones.

La combinación 2,4-D/BA es la más utilizada para la inducción de callo, en concentraciones altas de auxina y bajas de citocinina. Éstas interaccionan al regular la división celular, donde la auxina ejerce su efecto en la replicación de ADN mientras que la citocinina lo ejerce sobre algunos eventos que llevan a la mitosis (George, 1993; George y Sherrington, 1984). Las altas concentraciones de 2,4-D son recomendadas para el inicio de la formación de callo ya que suprimen la morfogénesis y dan como resultado la rápida proliferación de éste y las bajas concentraciones de citocininas para mantener su crecimiento (Hurtado y Merino, 1987).

También fue notorio que los tratamientos con los explantes de raíz, a pesar de que se formó callo, los explantes conservaron en gran medida su integridad morfológica (Figura 15B, C, E, F, J, L, M). Lo que parece indicar que los tratamientos inductores de callo fueron efectivos para ciertas poblaciones celulares en determinadas condiciones y en un tiempo pero no para otras que mantuvieron la condición original del explante (Figura 15C).



Gráfica 1. Formación de callo en medio de inducción MS-50 a partir de los distintos explantes estudiados de *L. porteri*. Respuesta a los tres meses de inducción de los cultivos.

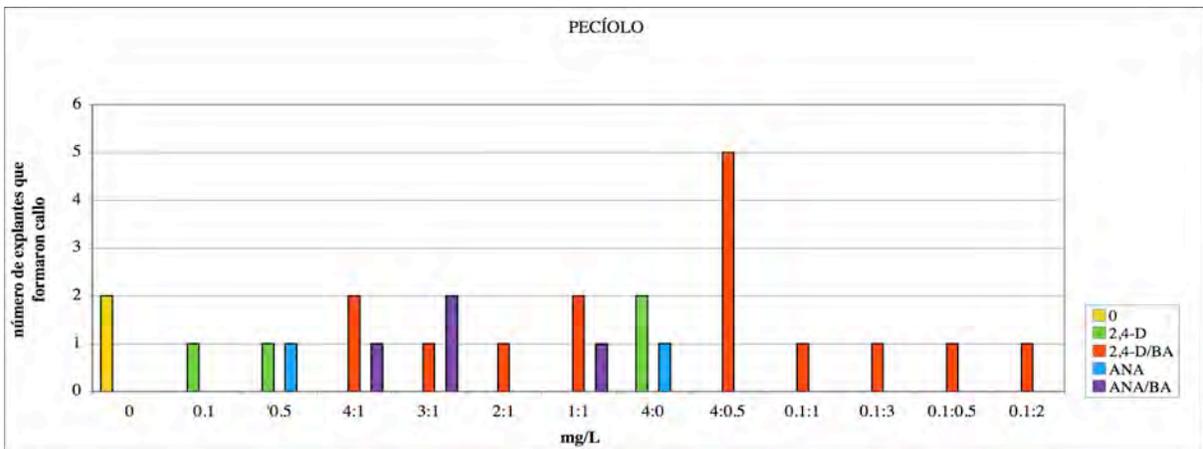
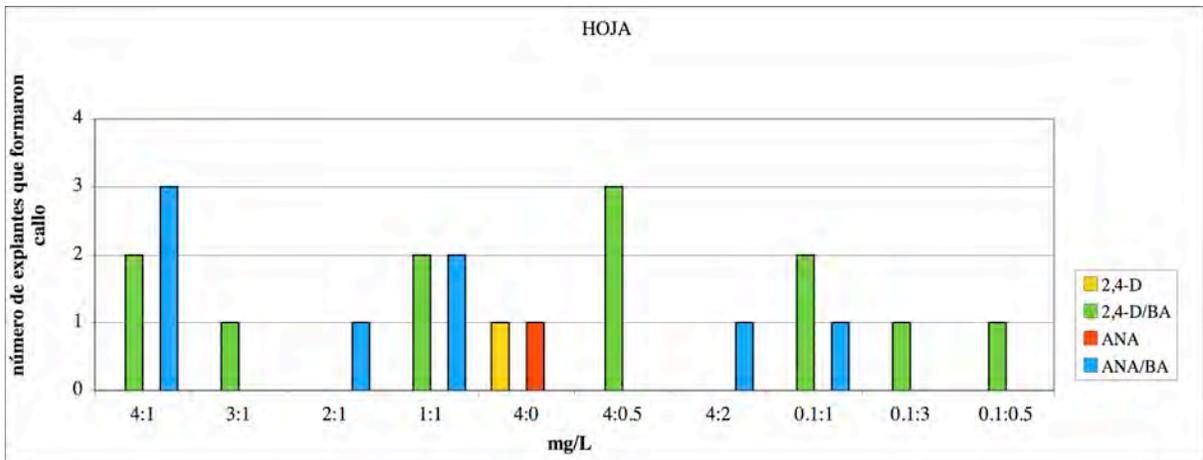
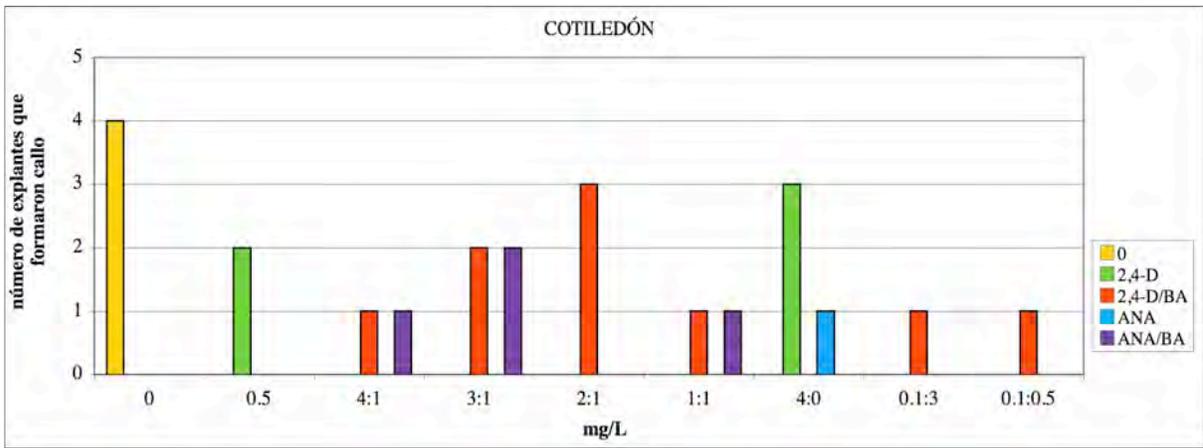
Así mismo, en la Gráfica 2 se muestran los resultados para cada explante, indicando cual de ellos tuvo mayor respuesta morfológica (callo) en cada combinación de regulador de crecimiento. Para la hoja, los mejores tratamientos, en cuanto al número de explantes que formaron callo, fueron ANA-BA (4:1) y 2,4-D/BA (4:0.5); para el cotiledón fue 2,4-D (4 mg/L) y 2,4-D/BA (2:1), aunque en el control se presentó la formación de callo, sugiriendo que esta estructura fue independiente de la adición de reguladores de crecimiento para la formación de callo.

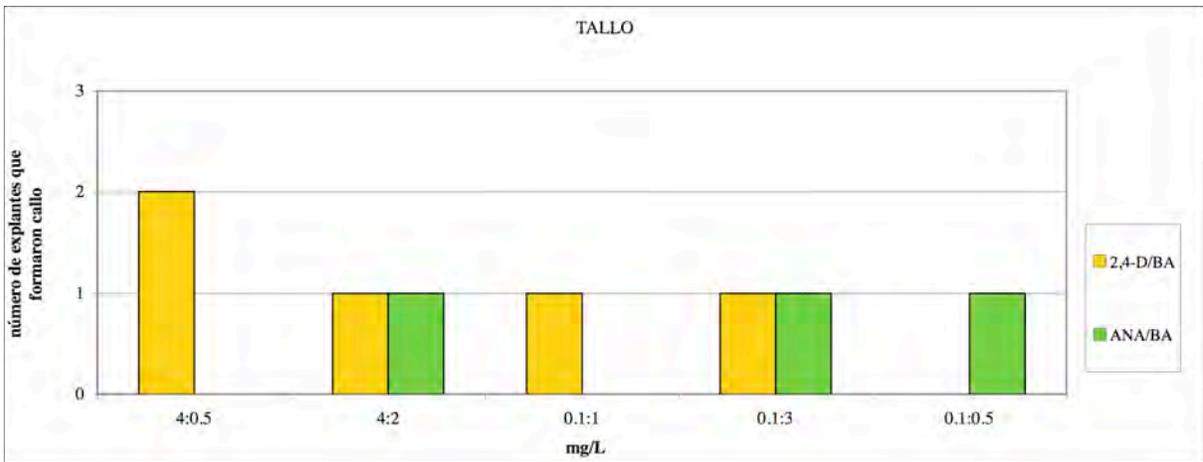
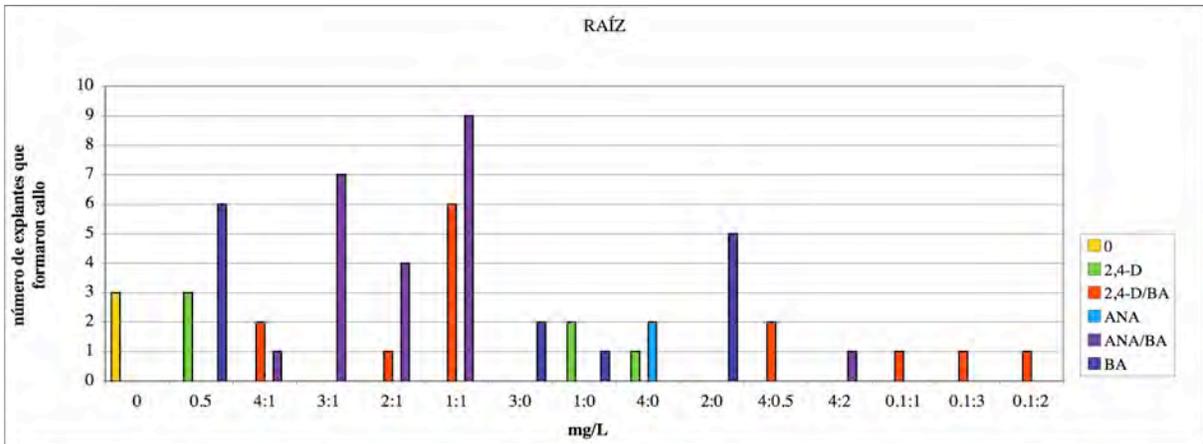
La combinación en la que el pecíolo tuvo una mejor respuesta fue 2,4-D/BA (4:0.5) y para la raíz fue ANA/BA (1:1) seguido de ANA/BA (3:1). El tallo fue el explante que menor respuesta a inducción mostró, formando callo en sólo 5 combinaciones, siendo 2,4-D/BA (4:0.5) donde se presentó el mayor número de callos.

Sin embargo, los únicos explantes que no fueron dependientes de la presencia de reguladores de crecimiento fueron cotiledón, pecíolo y raíz, ya que hubo formación de callo en los tratamientos control. Esto evidencia el potencial de estas estructuras para la manipulación *in vitro* sin la necesidad de adicionar reguladores de crecimiento al medio de cultivo.

El explante de raíz fue el que mayor número de respuestas a callo presentó. Esto indica que la raíz de *L. porteri* tiene un alto potencial regenerativo, posiblemente debido a la estructura napiforme de este órgano que le permite el almacenamiento de sustancias de reserva y la sobrevivencia en situaciones ambientales desfavorables, así como a la posible presencia de áreas meristemáticas y meristemas axilares del tallo, ya que este es muy compacto y muy difícil de delimitar de la raíz.

Estos resultados hacen evidente que la fisiología de cada órgano aún de un mismo individuo es diferente. Además, el cultivo de tejidos permitió generar información valiosa de esta especie sobre su comportamiento *in vitro* a la inducción a callo y a distintos tratamientos de reguladores de crecimiento, ya que desafortunadamente, no existen estudios de morfogénesis de especies del género *Ligusticum* con los cuales se puedan comparar estos resultados.





Gráfica 2. Respuestas morfológicas de cotiledón, hoja, pecíolo, raíz y tallo de *L. porteri* en medio de inducción MS-50. Resultados a los 3 meses de inducción de los cultivos.

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos de los explantes inducidos de *P. crispum*. En general ambas auxinas en combinación con BA (1 mg/L) dieron lugar a callo en los 5 tipos de explantes estudiados (Figura 14A-M). Estos explantes al ser transferidos a medio MS líquido sobrevivieron, proliferaron rápidamente, en menos de dos semanas, de manera abundante y presentaron una contaminación fúngica muy escasa.

Tabla 19. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción a callo de explantes de plántulas germinadas *in vitro* de *P. crispum*. Resultados a los 3 meses del inicio de la inducción de los cultivos.

Regulador de crecimiento	BA 0 mg/L	BA 0.5 mg/L	BA 1 mg/L	BA 2 mg/L	BA 3 mg/L
2,4-D 0 mg/L	C, P, R	R, T	C, H, P, R	H, P, R, T	R, T, H, P
2,4-D 0.1 mg/L	C, H, P, R	C, H, P, R, T	C, P, R, T	C, H, P, R, T	C, H, R, T, P
2,4-D 0.5 mg/L	C, H, P, R	-	-	-	-
2,4-D 1 mg/L	-	-	C, H, P, R, T	-	-
2,4-D 2 mg/L	C, H, P, R	-	C, H, P, R	-	-
2,4-D 3 mg/L	C, H, P, R	C, H, P, R	C, H, P, R, T	-	-
2,4-D 4 mg/L	C, H, P, R	C, H, P, R	C, H, P, R	C, H, P, R, T	-
ANA 0 mg/L	P, R	R, T	C, H, R, P	H, P, R, T	R, T, H, P
ANA 0.1 mg/L	C, H, R, P	C, H, P, R, T	C, H, R, P, T	C, H, R, P, T	C, H, T, P, R
ANA 0.5 mg/L	C, H, P, R	-	-	-	-
ANA 1 mg/L	C, H, T, P, R	-	C, H, P, R	-	-
ANA 2 mg/L	-	-	C, H, P, R, T	-	-
ANA 3 mg/L	C, H, P, R, T	C, H, P, R	C, H, P, R, T	-	-
ANA 4 mg/L	C, H, P, R, T	C, H, P, R	C, H, P, R, T	C, H, P, R, T	-

C: cotiledón, H: Hoja, P: Pecíolo, T: Tallo, R: Raíz
(-): sin explorar o sin respuesta

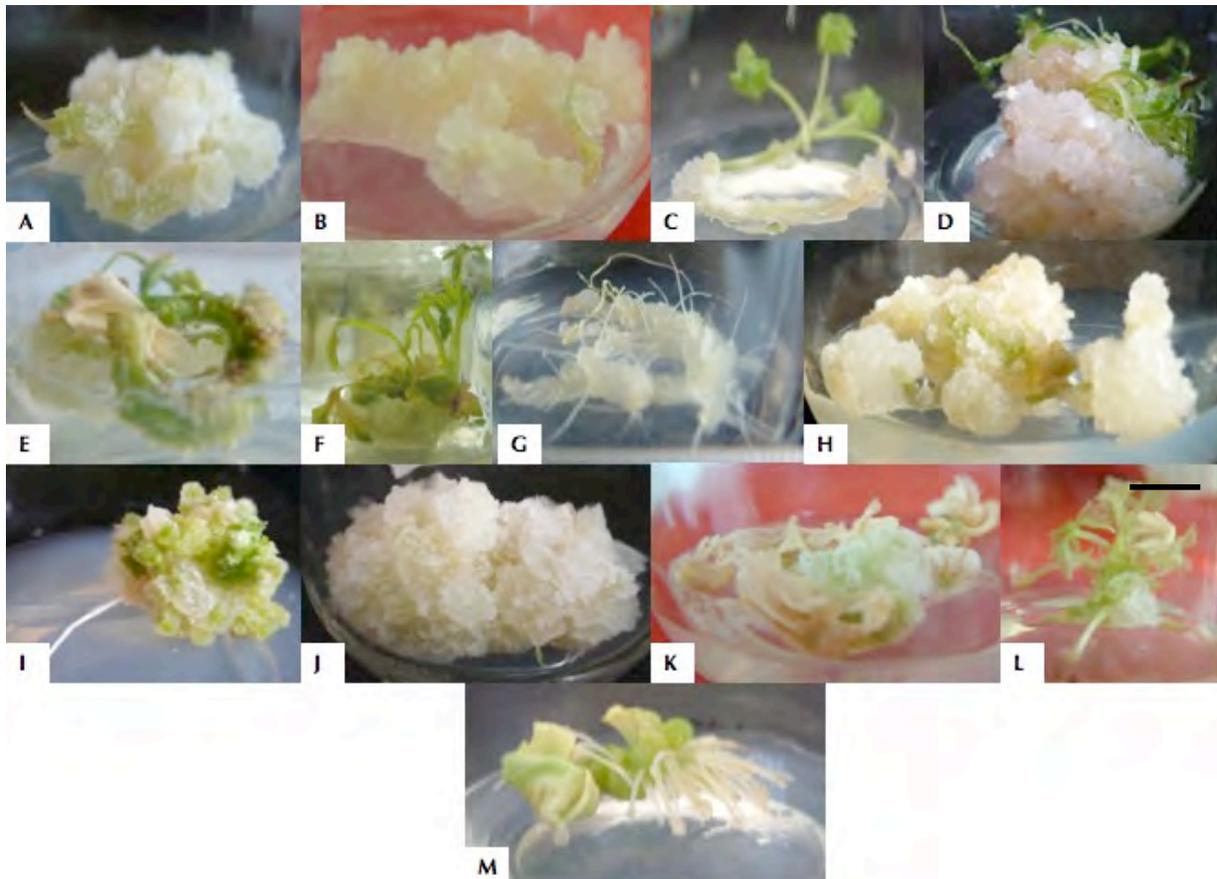
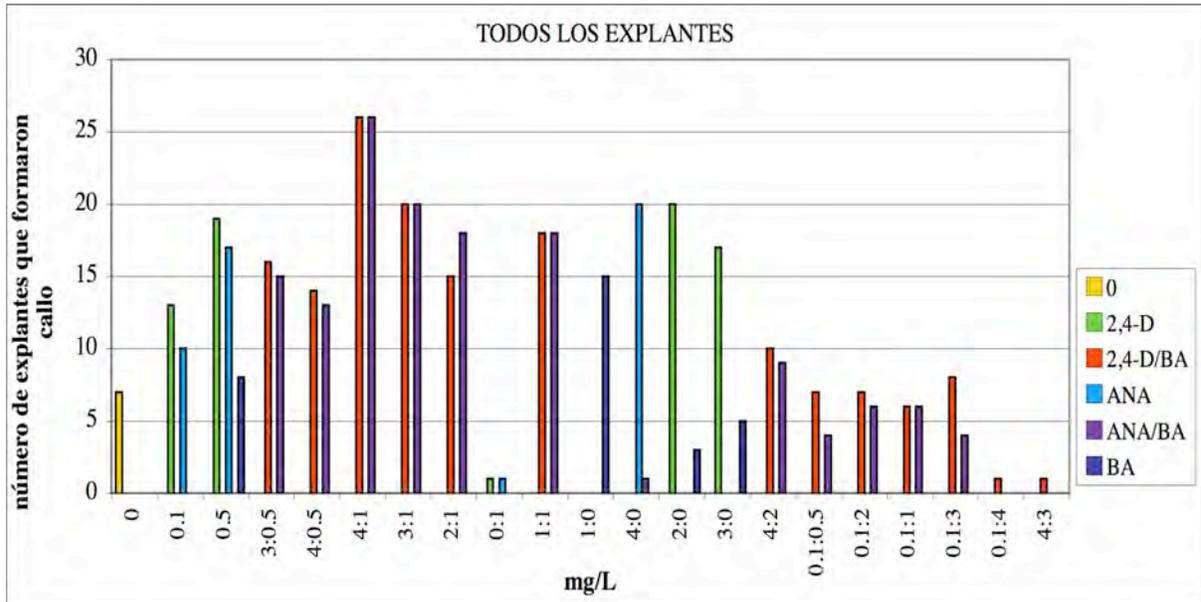


Figura 16. Algunas respuestas morfológicas de los explantes de *P. crispum* con diferentes combinaciones de 2,4-D/BA y ANA/BA. A. Hoja ANA/BA (4:1), B. Raíz 2,4-D/BA (1:1), C. Raíz y tallo ANA (4:0), D. Pecíolo (ANA/BA 3:0.5), E. Cotiledón ANA/BA (4:0.5), F. Hoja ANA/BA (0.1:0.5), G. Raíz ANA/BA (4:1), H. Pecíolo 2,4-D/BA (0.1:1), I. Cotiledón 2,4-D (2:0), J. Hoja BA (1:0), K. Hoja 2,4-D/BA (2:1), L. Tallo ANA/BA (2:1), M. Hoja ANA (4:0). Barra: 1.5 cm.

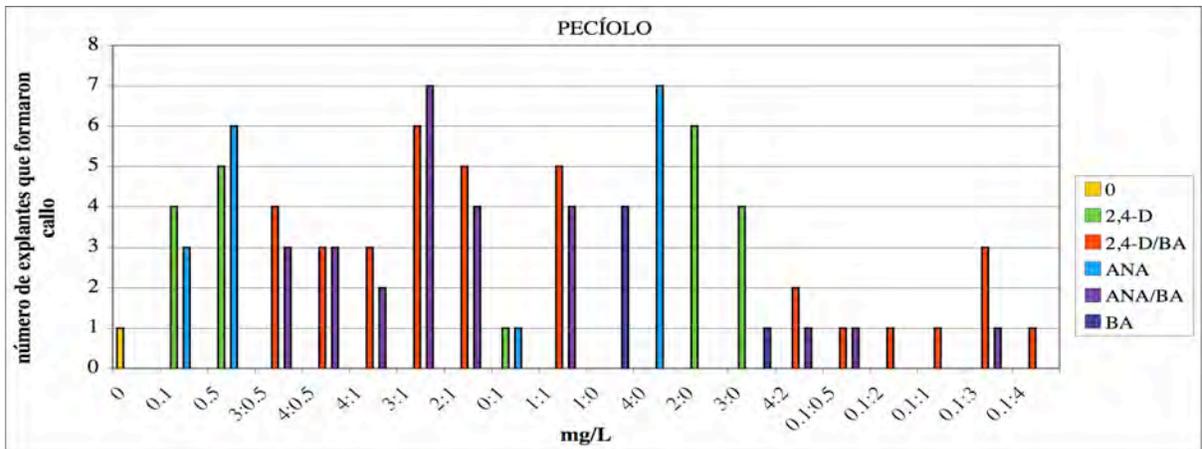
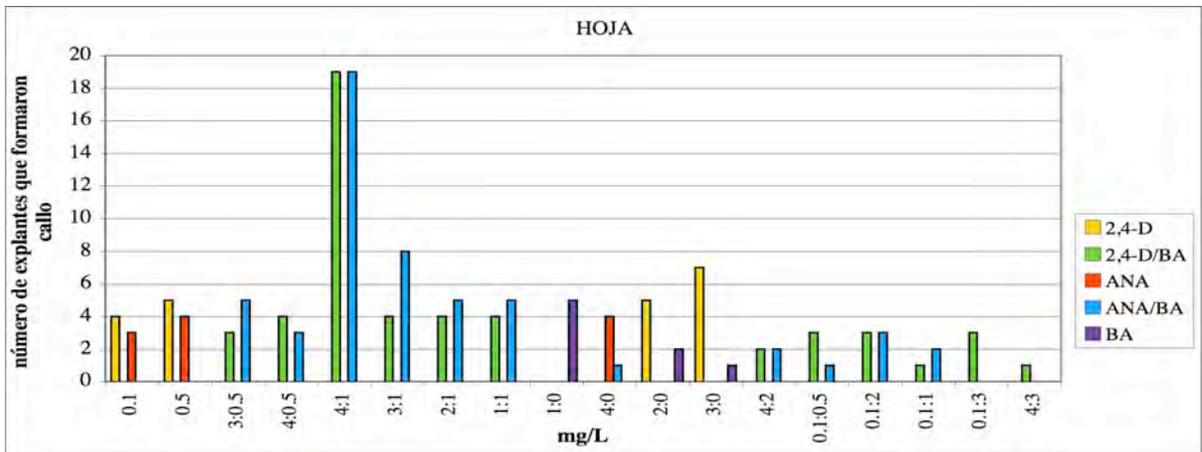
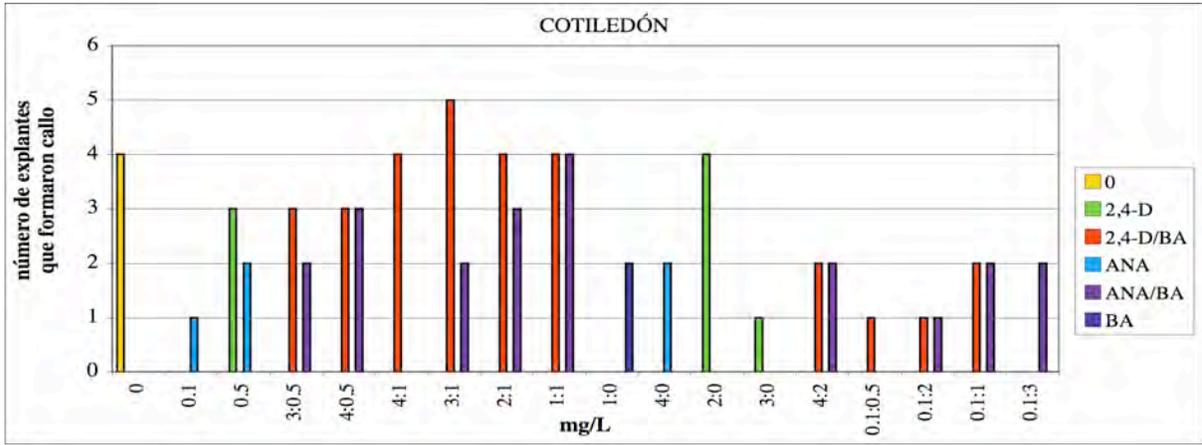


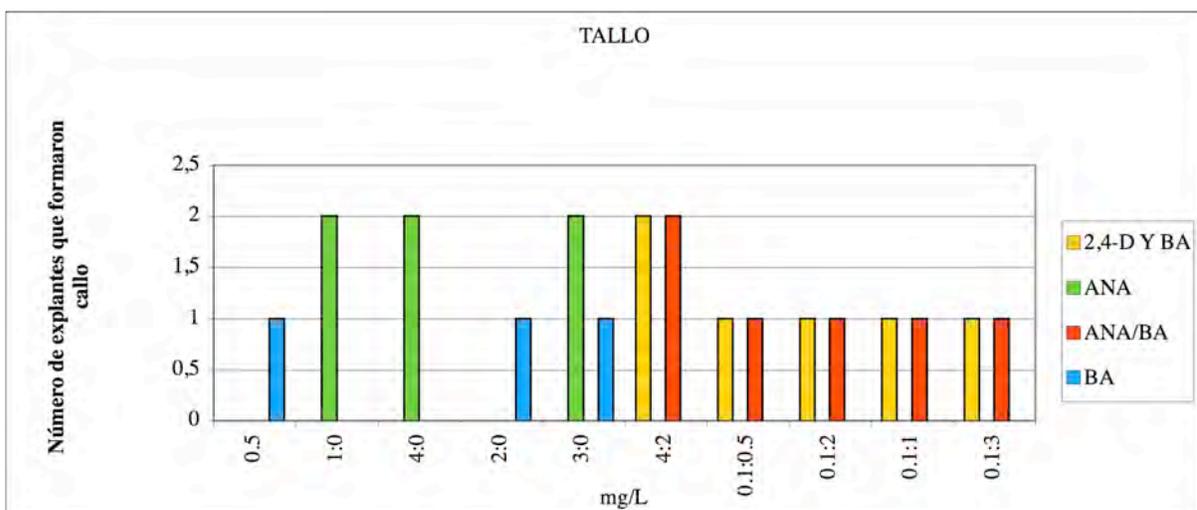
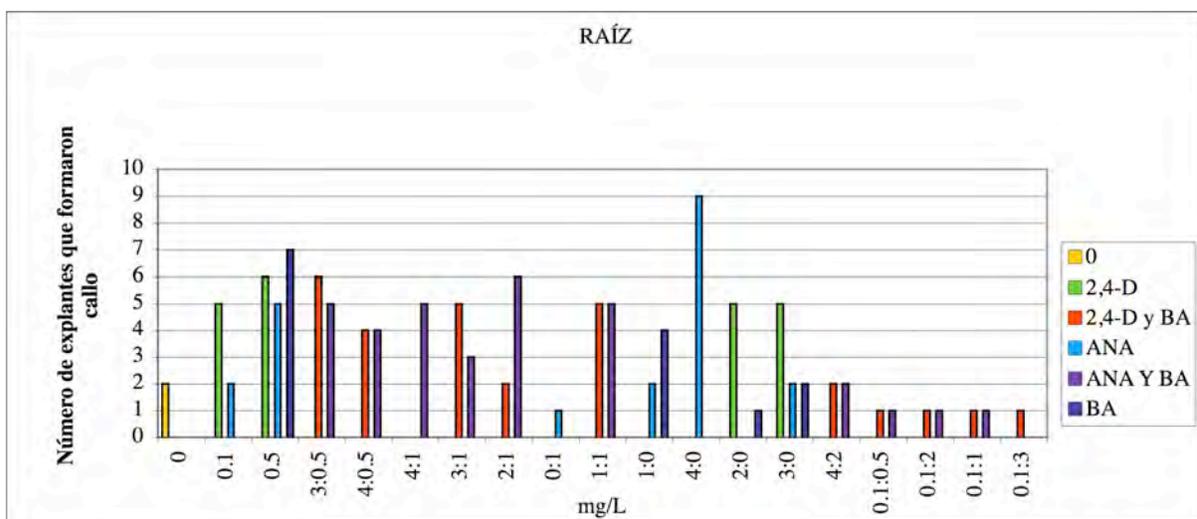
Gráfica 3. Formación de callo en medio de inducción MS-50 a partir de los distintos explantes estudiados de *P. crispum*. Respuestas a los 3 meses de inducción de los cultivos.

En contraste con *L. porteri*, las respuestas de inducción a callo de los explantes de *P. crispum* tuvieron un comportamiento más homogéneo, es decir los cinco explantes dieron lugar a la formación de callo en todos los tratamientos explorados incluyendo los controles. Sin embargo, la combinación de reguladores donde hubo mayor frecuencia de respuestas morfogénicas fue con ANA y BA (4:1) y 2,4-D/BA (4:1) (Gráfica 3).

Los explantes de *P. crispum* dieron lugar a un callo abundante, altamente friable, de color hialino y verde claro brillante, de rápido crecimiento y de aspecto húmedo. En los explantes de hoja y raíz con combinaciones de auxinas altas como ANA (3 mg/L y 4 mg/L) o bajas como ANA/BA (0.1:3), hubo la formación de muchas raíces secundarias (Figura 16G) hialinas, delgadas y largas. Los explantes de raíz que probablemente contenían alguna fracción de tallo, también dieron lugar a la formación de muchas hojas verdes con pecíolos verdes o hialinos. Esto sugiere también, que estas dos estructuras son propicias para la regeneración de plantas completas.

En el caso de *P. crispum*, también se observó que en la mayoría de los explantes, éstos conservaron su identidad morfológica. Sólo algunas zonas lograron la formación de callo (Figura 16K, M). Por ello, estos resultados morfogénicos son muy importantes, pues los tratamientos en que ocurrieron evidenciaron que estas condiciones fueron inductoras de estructuras organizadas y que se desarrollaron vía organogénesis indirecta, y en algunos casos directa. No obstante que no se logró la regeneración de plantas completas, éstos son los primeros y únicos resultados sobre la morfogénesis *in vitro* de *P. crispum*.





Gráfica 4. Respuestas morfológicas de cotiledón, hoja, pecíolo, raíz y tallo de *P. crispum* en medio de inducción MS-50. Resultados a los tres meses de inducción de los cultivos.

Los mejores tratamientos en cuanto al número de explantes que formaron callo fueron: para la hoja, los mejores tratamientos con igual número de explantes que formaron callo fueron 2,4-D/BA y ANA/BA (4:1); para el cotiledón fue 2,4-D/BA (3:1) seguido de 2,4-D/BA y ANA/BA (1:1), 2,4-D (2 mg/L) y 2,4-D/BA (4:1); para el pecíolo fue ANA (4 mg/L) y ANA/BA (3:1), siguiendo 2,4-D/BA (3:1) y ANA (0.5 mg/L) y para la raíz fueron ANA/BA (2:1), 2,4-D/BA (3:0.5) y ANA (4 mg/L), siguiendo 2,4-D (0.1 y 0.5 mg/L), ANA (0.5 mg/L), BA (0.5 mg/L), 2,4-D/BA (1:1 y 3:1) y ANA/BA (4:1) y para el tallo las combinaciones con mayor número de formación de callo fueron 2,4-D/BA y ANA/BA (4:2) (Gráfica 4).

Estos resultados sugieren que el cotiledón, el pecíolo y la raíz tienen comportamientos y frecuencias de respuestas a callo similares, contrastando con la hoja y tallo, donde se observó una baja respuesta a la formación de callo.

Cultivo de células en suspensión

Los ensayos para explorar el establecimiento de cultivos de células en suspensión de *L. porteri*, se iniciaron a partir de callo de los 5 explantes que observaron activo crecimiento (división celular) y mayor biomasa. Se disectaron fragmentos de 5 mm³ y se sembró un fragmento en cada frasco de cultivo (100ml) con 25 ml de medio de cultivo líquido MS-50 con la misma formulación de reguladores de crecimiento de su procedencia en medio sólido.

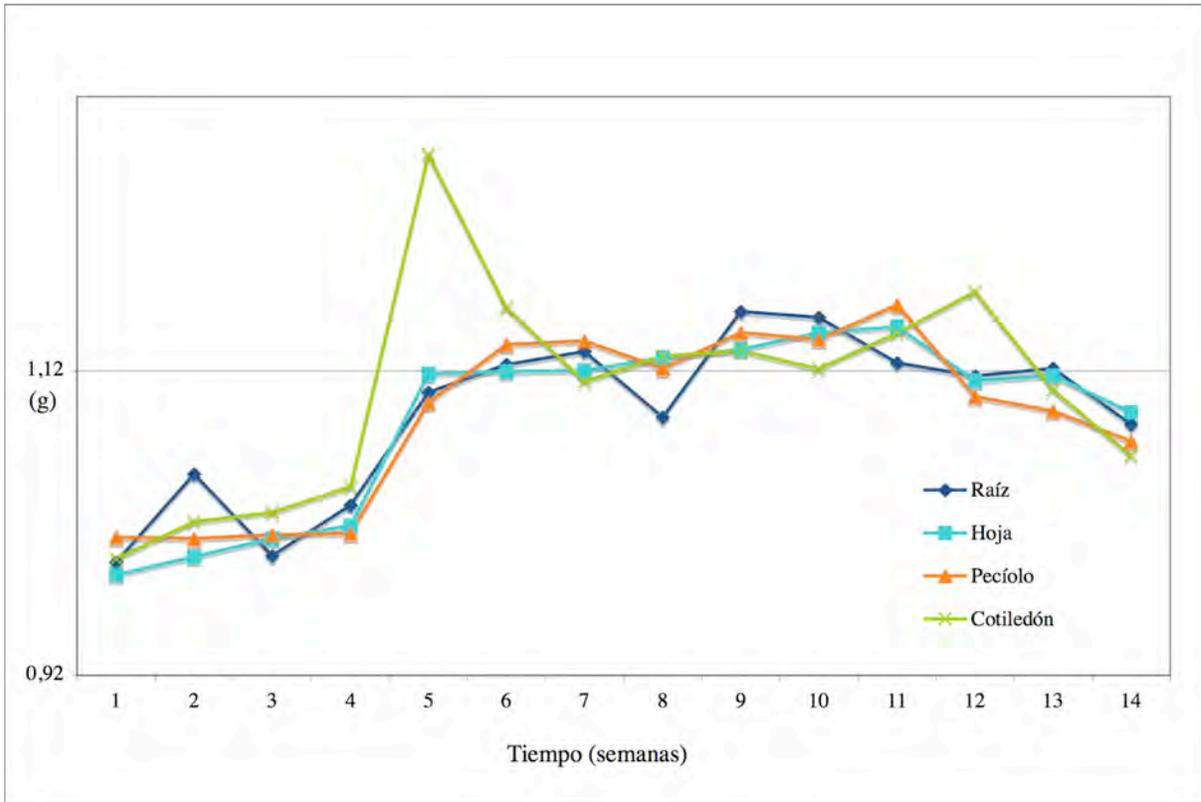
Los cultivos de los explantes de *L. porteri* que presentaron mayor proliferación en medio MS-50 líquido, fueron con 2,4-D (4 mg/L), aunque fue lenta, de 2 a 3 meses, éstos cultivos se han mantenido asépticos y con un crecimiento constante desde hace 15 meses. Todos estos cultivos tuvieron un color café oscuro, con células totalmente disgregadas y en algunos casos, como los cultivos de raíz, con agregados celulares, y de rápido crecimiento. El fragmento inicial de todos los callos de *L. porteri* no se disgregó y por el contrario, adquirió una condición compacta. El medio de cultivo adquirió un color café oscuro en el caso del cultivo de raíz, al ser expuesto al flujo de aire, posiblemente por la oxidación de los metabolitos secundarios presentes en ella.

Los cultivos de los explantes de *P. crispum* que mostraron una proliferación abundante tuvieron la combinación de ANA (4 mg/L) con BA (1 mg/L) y para el cotiledón con la combinación de 2,4-D con BA en las mismas concentraciones. Estos cultivos tuvieron un color amarillo claro con células totalmente disgregadas y el medio de cultivo se mantuvo incoloro.

Cinética de crecimiento

La curva de crecimiento de *L. porteri* tuvo un comportamiento sigmoide (Gráfica 5). La fase *lag* o de *reposo*, tuvo una duración de 4 semanas en todos los explantes (Figura 15A-D). En esta fase, el inóculo no presenta ninguna señal de división celular, ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones nutricionales (Hurtado y Merino, 1987; Street, 1977; Dodds y Roberts, 1982), al estado líquido y a la agitación del medio de cultivo. Las células de los cuatro explantes, en esta fase, tuvieron una morfología alargada en su mayoría, y algunas redondas. Se observaron agregados celulares de 1-2 mm de diámetro, algunas células aisladas con una pared celular delgada. En la Figura 15B y C, se observa

el citoplasma que adoptó la morfología de la célula llenándola por completo. Esta morfología pudo deberse a la agitación mecánica del cultivo en la plataforma de agitación orbital.



Gráfica 5. Cinética de crecimiento de los explantes de raíz, hoja, pecíolo y cotiledón de *L. porteri*.

En la cuarta semana, tuvo lugar la fase *exponencial*, y entre la cuarta y la quinta semana de cultivo, tuvo lugar la fase *lineal*, en las cuales hubo un incremento en la división celular y la turbidez del medio de cultivo en todos los casos (Figura 17F-H). En el cultivo de cotiledón se registró una lectura de biomasa de 1.26 g, dato visiblemente superior al resto de los explantes. En esta fase se observaron agregados celulares pero de mayor diámetro (5-8 mm). Algunas células aisladas fueron alargadas y otras redondas a semiesféricas. Por contraste de fases se pudo observar un citoplasma comprimido y una gran cantidad de contenidos celulares de aspecto granular.

Entre la quinta y sexta semana se observó una disminución progresiva de biomasa y a partir de la sexta semana hasta la onceava, tuvo lugar la fase *estacionaria*. Esta fase tuvo una duración de 5 semanas y la biomasa en todos los casos se mantuvo en aproximadamente 1.12 g. En esta fase las células han

cesado de crecer y dividirse, posiblemente por el agotamiento de alguno de los nutrientes en el medio (Street, 1977; Dodds y Roberts, 1982) o la acumulación de sustancias de desecho en el medio de cultivo que pueden ser tóxicas para las células. Las células han alcanzado su máxima densidad celular y permanecen viables. A partir de la doceava semana y hasta la catorceava semana, disminuyó drásticamente la biomasa y se mantuvo la turbidez del medio de cultivo. Se observaron células alargadas, con el citoplasma comprimido con gran cantidad de contenidos celulares de aspecto granular (Figura 17I-K) y en algunos casos se logró observar el núcleo (Figura 17L). Es posible que los contenidos celulares hayan sido metabolitos secundarios o algunos aceites característicos de esta especie.



Figura 17. Fotomicrografías de los cultivos en células en suspensión de callos de *L. porteri*. A. Cotiledón x1000 cc, B. Hoja x2000 cc, C. Pecíolo x100 cc, D. Raíz x100 cc, E. Cotiledón x100 cc, F. Hoja x200 cc, G. Pecíolo x400 cf, H. Raíz x200 cc, I. Cotiledón x400 cf, J. Hoja x400 cf, K. Pecíolo x400 cf, L. Raíz x1000 cf. n: núcleo. cc: citoplasma contraído.

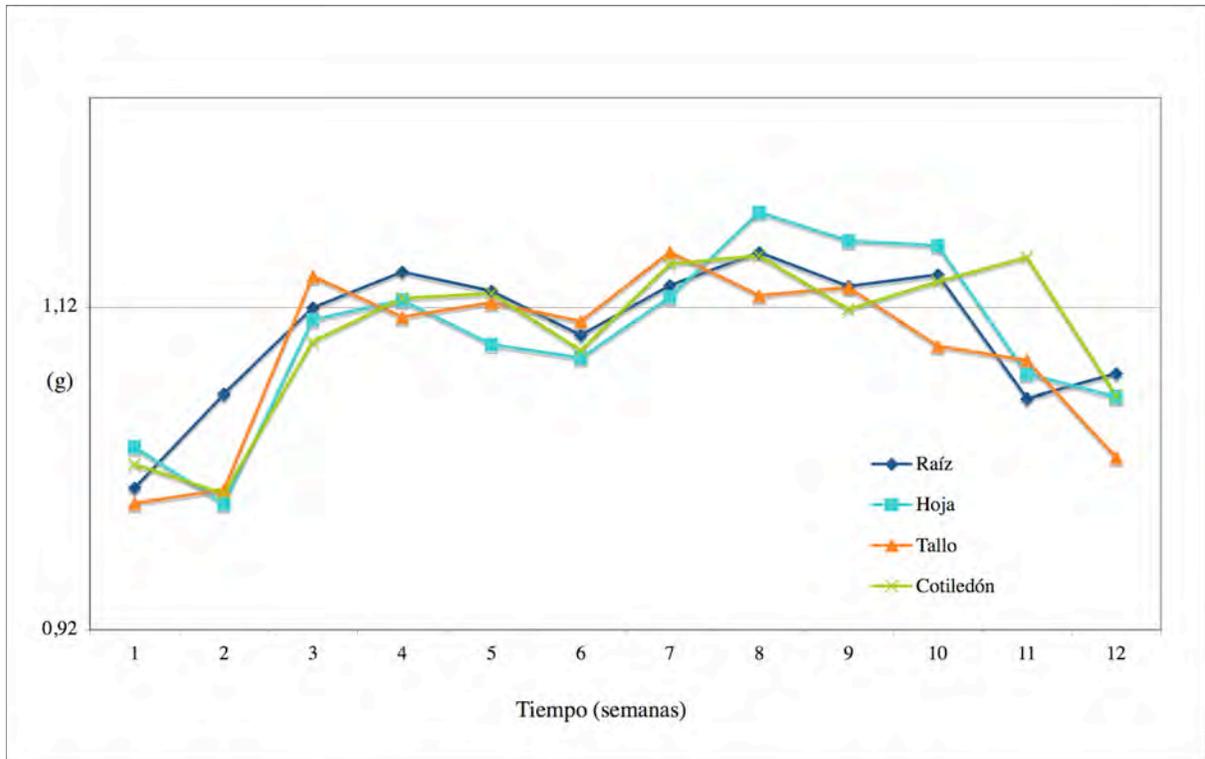
Es interesante notar que los cultivos de raíz sufrieron una rápida oxidación al estar en contacto con el aire, se tornaron a un color café muy oscuro. Es posible que alguno de los metabolitos secundarios, como las ftáldas que se oxidan rápidamente por el aire, hayan sido una de las causas de este proceso.

La curva de crecimiento de los explantes de *P. crispum* también presentó un comportamiento sigmoide (Gráfica 6). La fase *lag* tuvo lugar en las primeras dos semanas de cultivo, con una ligera

disminución en la biomasa, excepto en la raíz, donde no hubo fase lag ni disminución en la biomasa. En el caso de *P. crispum*, las fases *lineal* y *exponencial* ocurrieron al mismo tiempo, entre la segunda y la tercera semana. En esta etapa se observaron células aisladas de morfología alargada y algunos agregados celulares de morfología semiesférica (Figura 16A-D). A partir de la tercera semana y hasta la quinta, la fase *estacionaria* no fue constante como en el caso de *L. porteri*, sino que comenzó a disminuir la biomasa de la quinta a la sexta semana de cultivo en todos los casos. Se observaron células aisladas de morfología alargada con contenidos celulares de aspecto granular, con el citoplasma contraído y con una pared celular delgada (Figura 18E-H).

Después de la sexta semana y hasta la octava semana, volvió a incrementar la biomasa, pudiéndose considerar como una segunda fase exponencial, excepto en el caso del tallo. Esto pudo deberse a que en el mismo cultivo habían distintas poblaciones celulares con distinto estado fisiológico y por consiguiente con distintos tiempos de división celular, por lo tanto algunas poblaciones celulares no se reprodujeron en la primera etapa exponencial y lo hicieron en la segunda etapa exponencial.

A partir de la octava semana y hasta la décima, la fase exponencial, tampoco se mantuvo y en los cuatro casos, la turbidez y la biomasa celulares disminuyeron considerablemente hasta llegar a la doceava semana, donde la lectura final fue la misma que la del inóculo inicial, en la primera semana (1.06 g). En esta fase, se observaron células de morfología muy alargada, característica de cultivos viejos, con el citoplasma contraído y contenidos celulares de aspecto granular (Figura 18I-L). Entre la tercera y décima semana, el valor aproximado de biomasa fue de 1.12 g, al igual que en los cultivos de *L. porteri*.



Gráfica 6. Cinética de crecimiento de los explantes de hoja, raíz, tallo y cotiledón de *P. crispum*.



Figura 18. Fotomicrografías de los cultivos de células en suspensión de callos de *P. crispum*. A. Cotiledón x100 cc, B. Hoja x200 cc, C. Raíz x200 cc, D. Tallo x200 cc, E. Cotiledón x400 cf, F. Hoja x400 cf, G. Raíz x200 cf, H. Tallo x400 cf, I. Cotiledón x400 cf, J. Hoja x400 cc, K. Raíz x400 cf, L. Tallo x200 cf. cn: contenido celular, cc: citoplasma contraído.

Es posible que las condiciones de cultivo ensayadas de los explantes de *P. crispum* no hayan sido adecuadas para éstos, ya que hubieron repetidos descensos en la cuantificación de biomasa y la fase estacionaria no fue lineal. Esto pudo deberse a varios factores como el frasco utilizado, la falta de intercambio gaseoso en la atmósfera del frasco, el rápido agotamiento de alguno o varios de los nutrientes o incluso el estado fisiológico del inóculo inicial.

Obtención de extractos

El material vegetal procedente de plantas adultas de *L. porteri*: partes aéreas (126 g), semillas (9.81 g), raíz (1.52 g) y raíz de *P. crispum* (4.30 g) se dejaron secar una semana a temperatura ambiente, se molieron hasta obtener un polvo fino y se pesó en una balanza analítica.

Este material se extrajo durante siete días con una mezcla de CH₂-Cl₂-MeOH 1:1 en un matraz de 2 L (con 1800 ml de disolvente), para las partes aéreas, y 500 ml (con 250 ml de disolvente) en el resto de los casos, en oscuridad para evitar la descomposición de las ftálicas por efecto de la luz o el aire. Posteriormente los extractos resultantes se concentraron por destilación en un rotaevaporador a una temperatura de 60°C al vacío. Al cabo de estos experimentos se obtuvieron 11.3719 g de extracto de hojas, 3 g de extracto de semillas, 0.17 g de raíz de *L. porteri* y 0.38 g de raíz de *P. crispum*.

Los extractos se analizaron mediante CCF para determinar la presencia o ausencia de Z-ligustílida. El compuesto no se detectó en el extracto de semillas ni en el de partes aéreas (Figura 19A-B). De manera conjunta se utilizó una referencia pura de diligustílida para determinar su presencia o ausencia observándose que el mismo compuesto está presente en la raíz pero no en semillas y partes aéreas (Tabla 20). La fase móvil se hizo de acuerdo al trabajo de Zschocke y cols. (1998). Adicionalmente se prepararon extractos de partes aéreas y raíz de *L. porteri* y *P. crispum* cultivadas en invernadero como una placa de CCF de referencia (Figura 20).

Tabla 20. Resultados de presencia o ausencia de Z-ligustílida de acuerdo al análisis por CCF. Material biológico obtenido de plantas adultas silvestres.

Parte de la planta	Presencia de Z-ligustílida
<i>Semillas</i>	No
<i>Partes aéreas</i>	No
<i>Raíz</i>	Sí

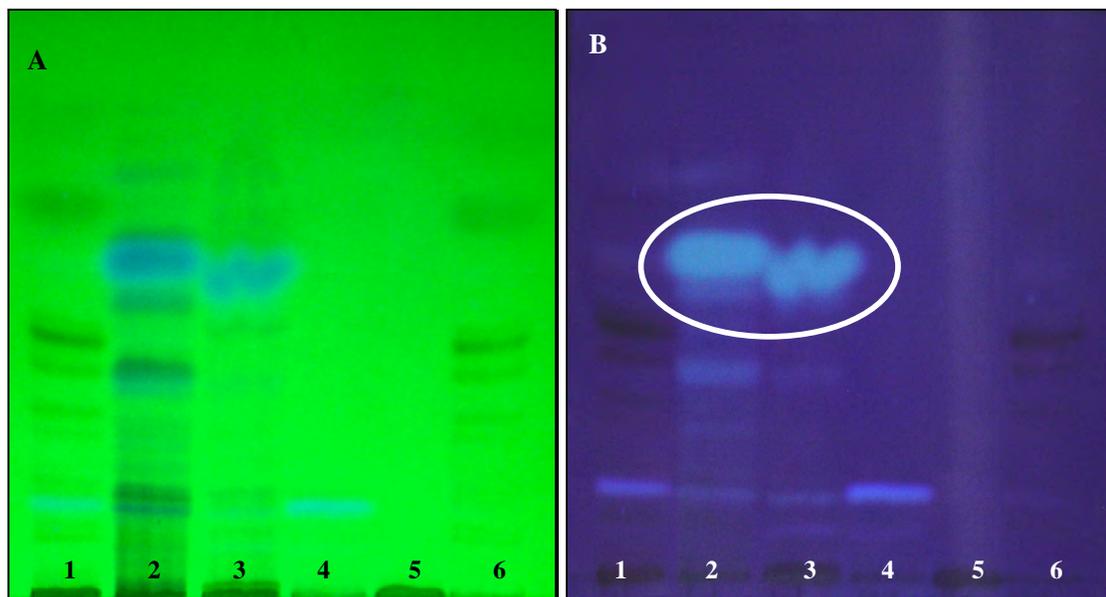


Figura 19. Análisis por CCF de los extractos obtenidos de partes aéreas y raíces de plantas adultas de *L. porteri* y *P. crispum*. La fase móvil utilizada fue Tolueno-AcOEt-Ácido acético glacial 90:10:1.
 A. CCF vista a 365+254 nm. B. CCF vista a 254 nm (UV). A-B. Carril 1: extracto de hojas, Carril 2: extracto de raíz, Carril 3: extracto de semillas, Carril 4: fase de CH_2Cl_2 del extracto de hojas, Carril 5: fase acuosa del extracto de hojas, Carril 6: fase hexánica del extracto de hojas.

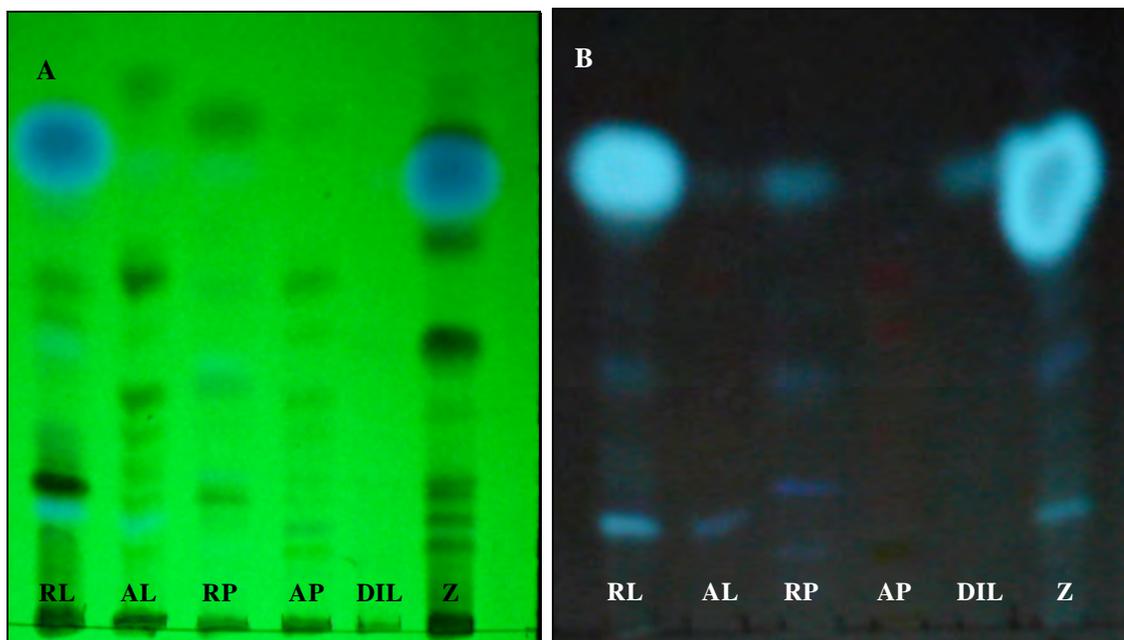


Figura 20. Análisis por CCF de los extractos de *L. porteri* y *P. crispum* de plantas cultivadas en invernadero. Resultados a los 8 y 6 meses de edad, respectivamente. La fase móvil utilizada fue Tolueno-AcOEt-Ác. acético glacial 90:10:1. A. CCF vista a 254 nm + 365 nm B. CCF vista con 254 nm.
 RL: raíz de *L. porteri*, AL: partes aéreas de *L. porteri*, RP: raíz de *P. crispum*, AP: partes aéreas de *P. crispum*, DIL: Diligustílida, Z: Z-ligustílida.

A partir de los extractos obtenidos de raíz y partes aéreas de plántulas germinadas *in vitro* de *L. porteri* y *P. crispum* de tres meses, se hizo una placa comparativa en CCF para establecer si la presencia o ausencia de *Z*-ligustílida es dependiente de la edad de la planta y/o su estado fisiológico. En la Figura 21 se muestra que en plántulas de tres meses de edad si está presente la *Z*-ligustílida en el extracto de raíces (RLJ).

Este material se extrajo durante siete días en frascos viales de vidrio de 15 ml con una mezcla de CH₂-Cl₂-MeOH 1:1 (10 ml) en oscuridad. Posteriormente los extractos resultantes se concentraron por destilación en un rotaevaporador a una temperatura de 60°C al vacío. Al cabo de estos experimentos se obtuvieron: 1.6974 g del extracto de partes aéreas de *P. crispum*; 0.3809 g del extracto de raíz de *P. crispum*; 0.2658 g de extracto de partes aéreas de *L. porteri* y 0.1717 g de extracto de raíz de *L. porteri*. Estos 4 extractos se obtuvieron de plantas germinadas en invernadero.

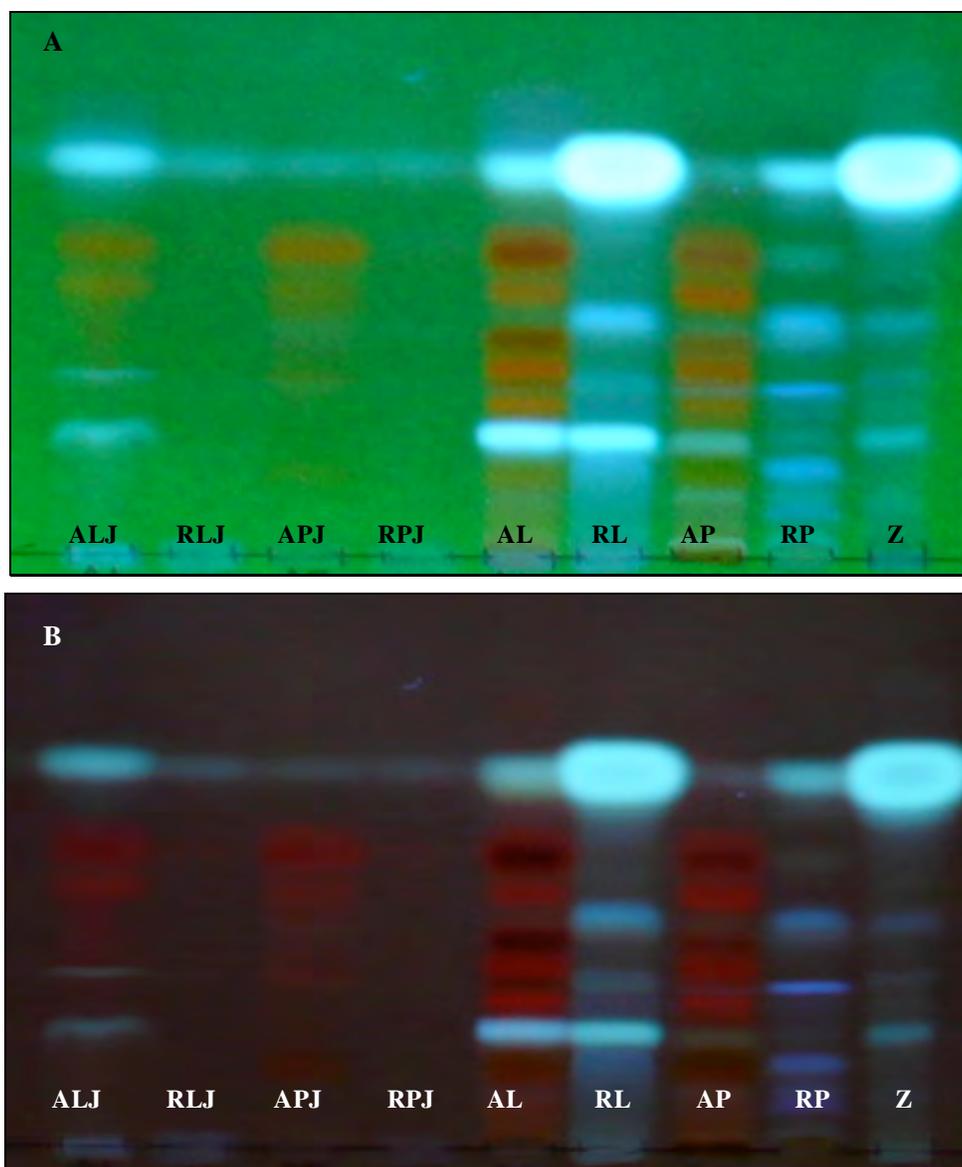


Figura 21. Análisis de los extractos de plántulas germinadas *in vitro* y plantas germinadas en invernadero de *L. porteri* y *P. crispum*. A. CCF vista a 254 + 365 nm. B. CCF vista a 254 nm.
ALJ: partes aéreas de *L. porteri* jóvenes; **RLJ:** raíz de *L. porteri* jóvenes; **APJ:** partes aéreas de *P. crispum* jóvenes; **RPJ:** raíz de *P. crispum* jóvenes; **AL:** partes aéreas de *L. porteri*; **RL:** raíz de *L. porteri*; **AP:** partes aéreas de *P. crispum*; **RP:** raíz de *P. crispum*; **Z:** Z-ligustílida.

El análisis por CCF de los 24 callos obtenidos a partir de distintos explantes de *L. porteri* reveló que la Z-ligustílida no estuvo presente en ellos. Sin embargo, en algunos de ellos se encontró la presencia de 4-vinilguayacol. Es posible que las condiciones *in vitro* y el estado fisiológico del callo no hayan sido los adecuados para inducir la biosíntesis de Z-ligustílida. Stahl-Biskup y Wichtmann (1991) mencionan que la ausencia de ftálicas en *Levisticum officinale* se debe a que la raíz de esta planta necesita tener

ductos resiníferos desarrollados para su producción, y debido a la falta de diferenciación de los callos, no se exprese la biosíntesis de *Z*-ligustílida.

Adicional a este reporte, es posible suponer que algún factor ambiental pudiera tener efecto en la estimulación de la biosíntesis de *Z*-ligustílida. En la Figura 22 se muestra el análisis por CCF de algunos extractos de callos de *L. porteri*.

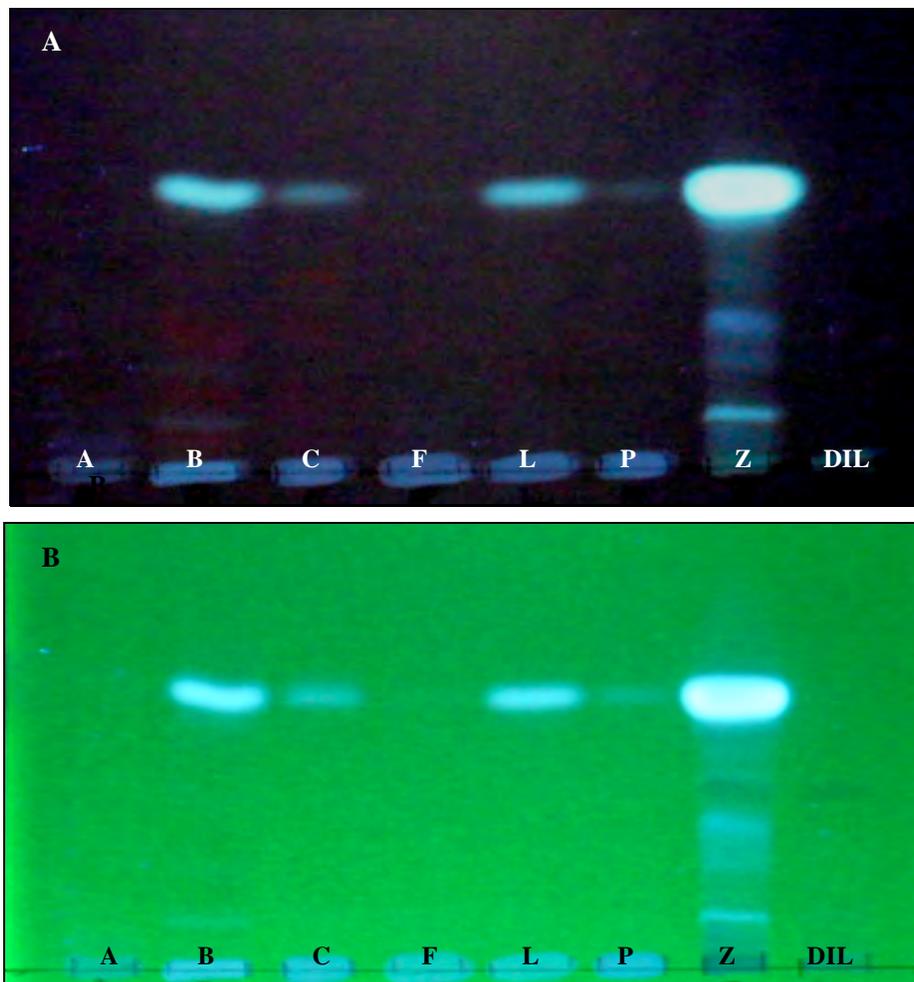


Figura 22. Análisis por CCF de extractos de callo de *L. porteri*.

A. CCF vista a 254 nm. B. CCF vista a 254 + 365 nm.

A: Tallo. B: Tallo. C: Pecíolo. F: Raíz. L: Pecíolo. P: Cotiledón. Z: *Z*-ligustílida. Dil: Diligustílida.

Cromatografía en columna abierta

En la literatura no existen estudios fitoquímicos sobre las partes aéreas de *L. porteri* o alguna otra especie del mismo género, por lo que es de gran interés determinar la presencia o ausencia de *Z*-ligustilida o alguna otra ftálida en esta parte de la planta.

De la separación del extracto de partes aéreas recolectadas en campo, se obtuvieron 219 alícuotas (Tabla 21) y un total de 30 fracciones que se verificaron en CCF. Se analizaron las siguientes fracciones por CG-EM: 1, 36, 40 (sólida y aguas madres), 56, 106, 131, 148 y 172.

Tabla 21. Fraccionamiento del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.

<i>Eluyente</i>	<i>Proporción (100%)</i>	<i>Alícuotas recolectadas</i>	<i>Fracciones combinadas</i>
Hexano	100	1-26	1
			2
			3
			4
			5
			6
Hexano – AcOEt	90:10	27-65	7-35
			36-39
			40-53
			54-55
			56-73
Hexano – AcOEt	80:20	66-95	74-81
			82-94
			95-105
Hexano – AcOEt	70:30	96-134	106-130
Hexano – AcOEt	60:40	135-149	131-147
Hexano – AcOEt	50:50	150-172	148-160
			161-171
			172-182
			183-190
			191-199
			200-208
Hexano – AcOEt	75:25	173-185	209-210
			211-212
			213-216
			217
			218
AcOEt	100	186-218	219
MeOH	100	219	219

Análisis de los extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Se analizaron los extractos de callos de raíz (32 mg, 2,4-D/BA, 3:1), callo de cotiledón (28 mg, 2,4-D/BA, 3:1), callo de semillas (7 mg, GA₃, 10 mg/L), callo de hoja (228.5 mg, 2,4-D/BA, 4:1), callo de

raíz (50.2 mg, ANA/BA, 1:1), callo de pecíolo (270.5 mg, 2,4-D/BA 4:0.5), callo de tallo (49 mg, 2,4-D/BA 0.1:3), callo de pecíolo (136 mg, 2,4-D/BA 0.1:1), callo de raíz (53 mg, ANA/BA 4:2), callo de pecíolo (52 mg, 2,4-D/BA 0.1:3), el extracto de semillas, partes aéreas y raíz de *L. porteri* y el extracto de raíz de *P. crispum* por CG-EM.

En la Tabla 22 se muestran los componentes encontrados en los callos de *L. porteri*, en la Tabla 23 los componentes encontrados en el extracto de semillas de *L. porteri*, en la Tabla 24 los componentes encontrados en las fracciones de las partes aéreas de *L. porteri*, en la Tabla 25 los componentes encontrados en la raíz de *L. porteri* y en la Tabla 26 los componentes encontrados en la raíz de *P. crispum*. Todos éstos fueron analizados por CG-EM y en el Apéndice II se incluyen los cromatogramas.

Tabla 22. Componentes de los extractos de callos de *L. porteri*.

	<i>Componente</i>	<i>T.R. (seg.)</i>	<i>%</i>	<i>No. Espectro</i>
<i>Raíz</i>	Z-2-Heptenal	197.84	16.08	1
	4-Vinilguayacol	390.44	3.90	2
	β-Hidroxipropiovanillona	497.04	2.12	3
	Ácido n-hexadecanóico	614.49	55.87	4
	Octadecanoato de metilo	652.94	0.82	5
	2,3-dihidroxi-hexadecanoato de propilo	753.24	13.91	6
<i>Semillas</i>	Benzotiazol	357.44	0.74	7
	(3-Hidroxi-2,4,4-trimetil-pentil) 2-metilpropanoato	410.69	8.52	8
	Hexadecanol	583.54	8.00	9
	Ácido n-hexadecanóico	612.74	45.88	10
	Octadecanoato de metilo	653.14	2.64	11
	Ácido 9-hexadecanóico	661.74	34.19	12
<i>Cotiledón</i>	4-Metoxicinamato	708.09	100	13
<i>Hoja</i>	Cefalotaxina	123.25	11.48	14
	Acetovanillona	324.25	2.65	15
	Ácido 2-(2-etilhexoxicarbonil) benzóico	636.45	22.50	16
	Neurosporaxantina	814.55	3.15	17
<i>Raíz</i>	5-Metil-2-furancarboxialdehído	107.14	8.57	18
	5-Hidroximetil-2-furancarboxialdehído	226.84	85.04	19
	7-Acetiloxi-15,16-epoxi-,metil éster- ácido kauran-18-óico	286.04	0.43	20
	Acetovanillona	324.94	3.17	21
	Ácido n-hexadecanóico	484.04	2.10	22
	4,4a,5,6,7,8-Hexahidro-1-metoxi-2(3H)-naftalenona	500.54	0.65	23
	4-Vinilguayacol	292.25	46.92	24
<i>Pecíolo</i>	Ácido n-hexadecanóico	523.85	45.38	25
	Escalol	619.85	7.69	26
	5-Acetoximetil-pirrolidona	162.34	3.10	27
<i>Tallo</i>	Timol	192.84	0.06	28
	(<i>E, E</i>)-2,4-decadienal	193.64	3.65	29
	4-Vinilguayacol	199.04	1.90	30
	Apiol	279.04	0.53	31
	3-Butilideneftálica	292.74	0.82	32
	Metil 3,5-dioxo-2,6,7,8-tetrahidro-1H-pirrolizina-2-carboxilato	295.15	1.10	33
	2-(2-Metilprop-2-enil)-ciclohex-2-en-1-ona	305.84	1.86	34
	2-Metoxiprop-2-enilbenceno	306.34	7.84	35
	Ácido n-hexadecanóico	353.24	10.65	36
	14,15-epoxi-3,11-dihidroxi-bufa-20,22-dienólida	358.24	0.18	37
	Falcarinol	369.34	11.56	38

	<i>Componente</i>	<i>T.R. (seg.)</i>	<i>%</i>	<i>No. Espectro</i>
	(11 <i>E</i> , 13 <i>Z</i>)-octadeca-1,11,13-trieno	387.04	9.25	39
	Dodeca-5,7-diín-1,12-diol	400.44	39.39	40
	Ácido 6-etenil-2,4,5,6,7,7a-hexahidro-7a-hidroxi-3,6-dimetil-metilen-2-Oxo-5-benzofuranacético	415.34	3.77	41
	Ácido 2-(2-etilhexoxicarbonil) benzóico	456.44	2.75	42
	Estigmasterol	582.24	0.39	43
<i>Pecíolo</i>	22,23-Dihidro-estigmasterol	598.04	1.21	44
	(<i>E</i> , <i>E</i>)-2,4-heptadienal	103.44	0.41	45
	4-Vinilguayacol	198.94	0.17	46
	(<i>E</i> , <i>E</i>)-2,4-decadienal	200.44	4.82	47
	2-Hidroxi-3-metilbenzaldehído	236.84	0.29	48
	Apiol	279.34	21.05	49
	3-Butilideneftálida	292.54	0.99	50
	Hexadecanal	300.34	0.29	51
	2-(2-metilprop-2-enil)-ciclohex-2-en-1-ona	305.84	0.74	52
	Alcohol metil-cinámico	306.24	1.29	53
	Eicosano	318.54	0.43	54
	<i>trans</i> -Fitol	326.54	3.50	55
	Metil tridecanoato	345.24	0.95	56
	Ácido nonanóico	355.14	8.54	57
	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	355.74	5.35	58
	Palmitato de isopropilo	364.94	1.98	59
	Falcarinol	369.24	3.01	60
	<i>trans</i> -9-Hexadecen-1-ol	377.44	2.14	61
	Fitol	382.14	0.08	62
	Ácido 9-octadecinóico	389.34	11.43	63
	9,12,15-Octadecatrienal	390.24	1.17	64
	Ácido octadecanóico	393.54	3.47	65
	Dodeca-5,7-diín-1,12-diol	400.54	7.67	66
	1,3-Dihidroxiopropan-2-il-hexadecanoato	453.94	6.44	67
	Estigmasterol	582.74	10.64	68
<i>Raíz</i>	22,23-Dihidro-estigmasterol	600.74	3.06	69
	4-Hidroxi-3-metilacetofenona	199.24	8.81	70
	(<i>E</i> , <i>E</i>)-2,4-decadienal	200.74	5.40	71
	(5-Etenil-1-oxido-1-azoniobiciclo[2.2.2]oct-7-il)-(6-metoxi-1-oxido-quinolin-4-il)metanol	237.54	0.91	72
	Dihexil-bencen-1,2-dicarboxilato	352.54	13.45	73
	Falcarinol	369.34	0.10	74
	1, <i>E</i> -11, <i>Z</i> -13-octadecatrieno	386.74	20.60	75
	Dodeca-5,7-diín-1,12,diol	400.24	9.39	76
	Ácido 2-(2-etilhexoxicarbonil) benzóico	456.34	3.88	77
	β-Sitosterol	598.14	8.41	78
<i>Pecíolo</i>	(<i>E</i> , <i>E</i>)-2,4-decadienal	200.64	0.88	79
	Apiol	279.04	5.60	80
	3-Butilideneftálida	292.64	0.26	81
	Alcohol metil-cinámico	306.44	9.62	82
	<i>trans</i> -9-Hexadecen-1-ol	336.64	0.03	83
	Metil tridecanoato	345.44	0.27	84
	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	353.94	11.65	85
	9- <i>endo</i> -hidroxi-9- <i>exo</i> -vinilbiciclo(4,2,1)-nona-2,4-dieno	358.24	0.61	86
	Falcarinol	369.44	12.91	87
	<i>trans</i> -9-Hexadecen-1-ol	377.64	1.30	88
	Metil-(9 <i>Z</i> , 12 <i>Z</i>)-octadeca-9,12-dienoato	379.04	0.24	89
	7-Hidroxi-3-metil-2,3-dihidroinden-1-ona	383.54	0.38	90
	9,12-Octadecadienal	387.94	13.60	91
	Ácido octadecanóico	392.54	0.41	92
	Dodeca-5,7-diín-1,12,diol	400.74	27.01	93
	1,3-Dihidroxiopropan-2-il-hexadecanoato	453.74	1.25	94
	Estigmasterol	582.54	4.57	95
	22,23-Dihidro-estigmasterol	598.94	9.33	96

En los extractos de callos se detectaron fenilpropanoides como el 4-vinilguayacol, terpenoides como el α -espatulenol, ácidos grasos como el estigmasterol, aldehídos como el Z-2-heptenal, poliacetilenos como el falcarinol, el alcaloide cefalotaxina y el carotenoide neurosporaxantina. En los callos de tallo y pecíolo se detectó la presencia de la ftálida 3-butilideneftálida en los callos de pecíolo y tallo, ambos inducidos con la combinación 2,-4D/BA (0.1:3), pero no la Z-ligustílida. Aunque la diferenciación fisiológica y estructural de los callos fue nula, la biosíntesis de las ftálidas sí se expresó, y el hecho de que Z-ligustílida no se haya biosintetizado pudo deberse a la cantidad de muestra analizada o a la falta de algún inductor, ya que este compuesto se almacenan y se produce en canales o ductos resiníferos presentes en toda la planta. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Smitt y cols. (1996) en cuyos trabajos con callos, células en suspensión, elicitación de cotiledones y raíces y transformación de raíces de *Thapsia garganica* no lograron obtener ni inducir la biosíntesis *in vitro* de tapsigargas, sugiriendo que es necesaria la diferenciación celular para su producción.

La 3-butilideneftálida tiene actividad acaricida contra larvas de *Dermatophagoides farinae* (6.77 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y adultos de *D. pteronyssinus* (6.46 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Kwon y Ahn, 2002) e insecticida contra larvas de *Drosophila melanogaster* (0.94 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) con una $\text{DL}_{50} = 0.84 \mu\text{g}/\text{adulto}$, siendo la ftálida más activa en comparación a Z-ligustílida y las furanocumarinas xantotoxina e isopimpinlina (Miyazawa *et al.*, 2004). Estos resultados hacen a 3-butilideneftálida un compuesto insecticida de origen natural, biodegradable, no tóxico y que actúa a bajas concentraciones.

Al-Abta y cols. (1979) obtuvieron a partir de callos diferenciados, con estructuras embrionarias en las fases globular y acorazonada, y de plantas intactas de *Apium graveolens* var. Lathom Blanching las ftálidas 3-isobutilidene-3a,4,5,6-tetrahidroftálida y 3-isobutilidene-3a,4-dihidroftálida identificadas por CG-EM. Este cultivo fue obtenido en medio MS sólido adicionado con 2,4-D (5 mg/L) y transferido a medio MS líquido sin reguladores de crecimiento, donde en este último se lograron obtener cantidades similares de las ftálidas a las de la planta intacta en la fase embrionaria de torpedo. Concluyeron que en esta etapa embrionaria y en etapas más avanzadas, los tejidos podrían tener una mayor capacidad para acumular o aumentar la capacidad bioquímica dada la diferenciación de tipos celulares específicos.

Watts y cols. (1984) obtuvieron a partir de células en suspensión de *Apium graveolens* cultivadas en medio MS líquido adicionado con 2,4-D (0.5 mg/L) y Kn (0.6 mg/L), las ftálidas 3-n-butilftálida y sedanenólida. Observaron que al sustituir 2,4-D con 3,5-D, en cultivos iluminados y agregados se lograba una mayor síntesis de estos compuestos al igual que algunos terpenoides como el limoneno.

Una de las hipótesis es que la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares no diferenciados puede lograrse modificando el patrón de crecimiento de éstos, por lo que Watts y cols. (1985) compararon la relación entre la diferenciación celular, la producción de metabolitos secundarios y el color verde de los cultivos en suspensión de *Apium graveolens*. Reportaron que la producción de las mismas ftálidas disminuyó cuando aumentaba la agregación celular y el color verde pero aumentaba la

del limoneno. A pesar de la agregación y el color verde, no observaron la formación de cloroplastos o diferenciación celular explicando el resultado por la transferencia del cultivo de 2,4-D a 3,5-D.

Tabla 23. Componentes del extracto de semillas de *L. porteri*.

<i>Componente</i>	<i>T.R. (seg.)</i>	<i>%</i>	<i>No. Espectro</i>
β -Cariofileno	420.05	34.59	97
Germacreno D	443.65	65.40	98

Tabla 24. Componentes de las fracciones del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.

<i>Fracción</i>	<i>Componente</i>	<i>T.R. (seg.)</i>	<i>%</i>	<i>No. Espectro</i>	
1	Timol	221.34	13.79	99	
	α -Copaeno	254.74	0.93	100	
	α -Bourboneno	256.64	0.96	101	
	Germacreno D	271.14	19.94	102	
	β -Bisaboleno	275.24	33.80	103	
	α -Calacoreno	282.24	5.94	104	
	Cadala-1(10),3,8-trieno	300.74	2.04	105	
36	3-(4,8,12-trimetiltridecil) furano	335.14	22.56	106	
	Miristicina	460.64	12.76	107	
	Apiol	496.34	87.23	108	
	40 (sólido)	Elemicina	282.84	32.16	109
		3-Hidroxi-7,8-dihidro- α -ionol	284.24	7.819	110
		α -Espatuleno	288.24	48.88	111
		α -Cadinol	298.74	7.67	112
		6-Isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol	303.84	1.83	113
		2-Butenal-2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)	324.74	1.42	114
		5,7,8-Trimetil-dihidrocumarina	330.14	0.20	115
40 (aguas madres)		α -Asarona	281.94	1.42	116
		α -Espatuleno	289.64	7.73	117
		Apiol	293.64	57.23	118
	<i>E</i> -Butilideneftálica	302.14	6.35	119	
	(7 <i>R</i> *8 <i>R</i>)-biciclo(5,3,1)undec-1-en-8-ol,7-metil-4-(1-metiletilideno)	303.64	22.46	120	
	5,7,8-Trimetil-dihidrocumarina	329.84	1.61	121	
	56	Timol	144.05	53.48	122
		Dihidroactinidiólida	246.65	2.38	123
		2,5-Octadecadiinoato de metilo	260.05	31.99	124
		Fitona	296.85	12.13	125
106	5-(2-Hidroxiopropan-2-il)-2-metilciclohex-2-en-1,4-diol	106.45	0.99	126	
	2-Metil-5-hexen-3-ol	207.45	11.03	127	
	6-Metil-ciclohex-2-en-1-ol	261.65	3.14	128	
	6-Metoxi-4-(2-metoxipropan-2-il)-1-metil-ciclohexen	434.25	82.15	129	
	4,5-Dimetil-5-(2-metilprop-1-enil)-oxolan-2-ona	453.65	1.64	130	
	Oplopanona	538.45	1.024	131	
131	Escoparona	326.05	100	132	
148	α -Espatuleno	281.64	60.02	133	
	Fitol	302.24	39.97	134	

Tabla 25. Componentes del extracto de raíz de *L. porteri*.

<i>Componente</i>	<i>T.R. (seg.)</i>	<i>%</i>	<i>No. Espectro</i>
<i>p</i> -Cimeno	112.64	0.32	135
Sabineno	114.64	0.12	136
<i>E</i> -2-nonenal	154.04	1.47	137
4-Vinilguayacol	199.64	0.43	138
Anhídrido ftálico	201.34	7.47	139
4,7-Dihidroisobenzofuran-1,3-diona	211.34	22.02	140
Ácido 3-hidroxi-4-metoximandélico	224.24	0.16	141
2-Hidroxi-6-metil-benzaldehído	238.44	0.26	142
Carveol	257.84	1.61	143
Apiol	279.44	0.41	144
1,4-Benzenedicarboxaldehído	287.64	0.09	145
Cedran-8,13-diol	292.14	0.60	146
3-Butilideneftálica	293.94	20.85	147
<i>trans</i> -Bisaboleno	295.14	1.47	148
2-Metoxiprop-2-enilbenceno	305.74	3.58	149
Alcohol metil-cinámico	307.64	3.29	150
5,7,8-Trimetildihidrocumarina	310.14	6.73	151
3-Etilidenisobenzofuranona	315.14	0.61	152
β -Copaeno	315.14	0.97	153
Alcohol metil-cinámico	321.54	1.26	154
4-Hidroxi-2-metil-3-fenil-ciclopent-2-en-1-ona	322.04	0.23	155
Ácido ferúlico	341.24	1.67	156
7-Nitrotetralin-1-ona	341.74	0.65	157
Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	355.04	8.10	158
1, <i>E</i> -11, <i>Z</i> -13-octadecatrieno	388.64	3.69	159
(7 <i>Z</i> , 10 <i>Z</i> , 13 <i>Z</i>)-hexadeca-7,10,13-trienal	390.14	0.27	160
Bufofogenina	396.94	3.39	161
Ácido 9-octadeciínóico	400.64	1.86	162
Dodeca-5,7-diín-1,12,diol	401.04	5.88	163
Estigmasterol	582.74	0.38	164

Tabla 26. Componentes del extracto de raíz de *P. crispum*.

<i>Componente</i>	<i>T.R. (seg.)</i>	<i>%</i>	<i>No. Espectro</i>
4-Vinilguayacol	292.04	1.16	165
Vanillina	328.24	0.002	166
<i>cis</i> -Bisaboleno	365.04	4.42	167
β -Sesquifelandreno	379.04	9.38	168
Elemicina	388.04	1.78	169
3- <i>n</i> -Butilftálica	423.64	0.72	170
Apiol	429.54	3.23	171
Apiol	434.44	23.51	172
Alcohol metil-cinámico	449.64	3.57	173
Coniferol	452.24	0.99	174
Psoraleno	478.94	2.62	175
Ácido dodecanóico	521.64	0.01	176
Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	526.34	0.77	177
Falcarinol	545.74	17.56	178
3,6,7-Trimetoxi-isobenzofuran-13(H)-ona	553.84	4.99	179
Ácido octadecanóico	581.74	0.42	180
1,3-Dihidroxiopropan-2-il-hexadecanoato	667.44	1.79	181
Ácido tetracosanóico	727.34	2.74	182
Escualeno	735.24	0.81	183
Estigmasterol	818.44	11.65	184
β -Sitosterol	829.94	7.78	185

El timol, el apiol, el α -espatulenol y la 5,7,8-trimetil-dihidrocumarina fueron los compuestos que se identificaron en distintas fracciones de las partes aéreas de *L. porteri*, por lo que se puede decir que éstas tienen una alta concentración de ellos. Estos compuestos, a su vez, tienen una distribución muy amplia en la familia Apiaceae así como en otras familias, al igual que el copaeno, el cariofileno, el germacreno D y el α -cadinol (Tabla 27). Éstos, son componentes típicos de los aceites esenciales con actividades biológicas muy amplias como biocidas, analgésicos, antiinflamatorios, antiespasmódicos, entre otras (Sedy y Koschier, 2003; Alali y Al-Lafi, 2003; Beer *et al.*, 2007).

El resto de compuestos incluyen ácidos grasos, aldehídos, monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides, que también son compuestos característicos de aceites esenciales de algunas familias botánicas y la mayoría de ellos no han sido reportados para alguna especie de *Ligusticum* o alguna especie de la familia Apiaceae. La estructura de algunos de ellos se muestra en la Figura 23.

Los compuestos identificados en los extractos de callos son muy distintos a los hallados en las partes aéreas de una planta adulta, excepto el 4-vinilguayacol. Aunque el estado fisiológico tiene consecuencias en cuanto a la biosíntesis de productos del metabolismo secundario, este compuesto es la evidencia de que sí se está expresando la ruta biosintética de este compuesto, a pesar de la nula diferenciación de los callos.

El 4-vinilguayacol es un fenilpropanoide, los cuales tienen funciones de defensa en plantas y tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Dixon *et al.*, 2002). También tienen potencial biotecnológico para la industria alimenticia como saborizantes (Tsujiyama y Ueno, 2008).

El apiol y el 4-vinilguayacol se identificaron en la raíz de *L. porteri* y *P. crispum*. El apiol es un fenilpropanoide identificado principalmente en especies de la familia Apiaceae. Tiene actividad fitotóxica contra *Lemna paucicostata* ($I_{50} = 80 \mu\text{M}$) (Meepagala *et al.*, 2005) y antifúngica contra *Aspergillus parasiticus* ($IC_{50} = 0.24 \mu\text{M}$) (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2007).

En el extracto de raíz de *P. crispum* se identificaron compuestos que ya habían sido reportados como componentes de partes aéreas como el psoraleno (Beber *et al.*, 1994), el β -felandreno (Karting *et al.*, 1972) y de la raíz como el apiol (Lamarti *et al.*, 1991) y el falcarinol (Nitz *et al.*, 1990). Sin embargo, se detectaron dos ftálicas que no habían sido previamente reportadas, el 3-*n*-butilftálica y una ftálica desconocida, la 3,6,7-trimetoxi-isobenzofuran-13(H)-ona (Figura 19).

La variación en los contenidos de aceites esenciales entre especies cultivadas y silvestres pertenecientes a la misma familia es muy notable. Aún siendo la misma especie, estas diferencias son visibles, como en el trabajo de Staniszewska y cols. (2005) donde analizaron el aceite esencial de *Daucus carota* sp. *carota*, una especie silvestre y *Daucus carota* sp. *sativus*, una especie cultivada. Encontraron una variación en los monoterpenoides y sesquiterpenoides de ambas plantas. En la especie silvestre hubo mayor presencia de monoterpenoides, pero no se detectaron los sesquiterpenos carotol, daucol y dauceno, componentes típicos en la composición química del aceite esencial obtenido de la especie cultivada. Por

el contrario, en el aceite esencial de la especie cultivada se identificaron altas concentraciones de sesquiterpenoides, siendo el carotol el componente mayoritario, y una baja concentración en monoterpenoides.

Se observó una variación similar en la composición química de la raíz de *L. porteri* y *P. crispum*. Aunque se evidenció la presencia de compuestos en común como el apiol, el bisaboleno y el 4-vinilguayacol, en la raíz de *L. porteri* se identificaron 30 componentes distintos a diferencia de los 21 componentes encontrados en la raíz de *P. crispum*. Aunque estas dos especies no pertenezcan al mismo género, es evidente que *L. porteri* posee una composición química más compleja y numerosa de metabolitos secundarios. Es posible que por el hecho de ser una especie silvestre y estar adaptada a un solo hábitat, el cual es altamente específico, la composición química sea tan grande. Estos compuestos tienen actividad biológica contra diversos microorganismos y herbívoros, los cuales forman parte de su entorno, por lo que éstos podría decirse que, forman parte de su sistema de defensa.

La composición química del extracto de raíz de *P. crispum* fue menos compleja y numerosa, ya que esta especie cultivada presenta un proceso de domesticación, que no ha tenido *L. porteri*. *P. crispum* está adaptada a un hábitat más uniforme, benigno y controlado. Es probable que la composición química de *L. porteri* cambie al volverse una especie cultivada, aunque la presencia de algunos compuestos en una especie y su ausencia en la otra especie, la presencia de ftálicas sigue siendo un factor común entre ellas que no ha sido alterado en ambas especies.

Este es el primer trabajo que estudia la composición química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *L. porteri* y el potencial biotecnológico de esta especie, por lo que hacen que *L. porteri* cobre un alto valor no sólo ecológico, sino cultural, social y económico.

Tabla 27. Distribución de algunos compuestos identificados en *L. porteri* en el género *Ligusticum*, la familia *Apiaceae* y otras familias botánicas.

<i>Componente</i>	<i>Ligusticum</i>	<i>Apiaceae</i>	<i>Otras familias</i>	<i>Referencia</i>
Z-2-heptenal	-	-	Asteraceae, Fabaceae, Orchidaceae, Magnoliaceae, Pedaliaceae, Lamiaceae, Aquifoliaceae, Oleaceae, Araliaceae, Rosaceae, Liliaceae, Anacardiaceae	Flamini <i>et al.</i> , 2003; Han <i>et al.</i> , 2006; Yuan <i>et al.</i> , 2006; Han <i>et al.</i> , 2006; Chen y Wang, 2005; Flamini <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2002; Campeol <i>et al.</i> , 2003; Meng <i>et al.</i> , 2001; Lee <i>et al.</i> , 2000; Umano <i>et al.</i> , 1999; Kurucu <i>et al.</i> , 1993; Takeoka <i>et al.</i> , 1990
4-Vinilguayacol	<i>L. porteri</i> , <i>L. chuanxiong</i>	<i>Coriandrum sativum</i> , <i>C. sativum</i> var. <i>microcarpum</i> , <i>Angelica sinensis</i> , <i>A. gigas</i> , <i>A. acutiloba</i> , <i>A. pubescens</i> , <i>A. dahurica</i> , <i>Lomatium foeniculaceum</i> spp. <i>fimbriatum</i> , <i>L. nevadense</i> , <i>Cnidium officinale</i> , <i>Ferula asafoetida</i> , <i>Glehnia littoralis</i>	Solanaceae, Lamiaceae, Tiliaceae, Rutaceae, Ranunculaceae, Elaeagnaceae, Liliaceae, Aquifoliaceae, Liliaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Elaeagnaceae	Cégiéla-Carlioz <i>et al.</i> , 2005; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2005; Senatore <i>et al.</i> , 2007; Bi <i>et al.</i> , 2007; Kumazawa <i>et al.</i> , 2007; Zeng <i>et al.</i> , 2007; Lu, 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2006; Lu <i>et al.</i> , 2007; Lozano <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2006; Kim <i>et al.</i> , 2006; Choi <i>et al.</i> , 2002; Takeoka, 2007; Kameoka <i>et al.</i> , 1991; Li <i>et al.</i> , 2007; Rosselli <i>et al.</i> , 2007; Cho <i>et al.</i> , 2007; Senatore <i>et al.</i> , 2007; Bi <i>et al.</i> , 2007; Dev <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Lu <i>et al.</i> , 2007; Pyun y Shin, 2006; Huang <i>et al.</i> , 2006; Senatore <i>et al.</i> , 2007; Barra <i>et al.</i> , 2006; Senatore <i>et al.</i> , 2005; Zeng <i>et al.</i> , 2007; Umano <i>et al.</i> , 1999; Lu, 2007; Telci <i>et al.</i> , 2006
β-Hidroxipropiovanillona	-	-	Rubiaceae, Pinaceae	Potterat y Hamburger, 2007; Andersson y Lundgren, 1988; Pawlus <i>et al.</i> , 2005; Karonen <i>et al.</i> , 2004
2,3-dihidroxi-hexadecanoato de propilo	-	-	Theaceae	Cao <i>et al.</i> , 2007
Benzotiazol	-	-	Fabaceae, Liliaceae, Vitaceae, Polypodiaceae, Arecaceae, Aquifoliaceae, Rosaceae, Theaceae	Lane <i>et al.</i> , 2004; Pyun y Shin, 2006; Karagiannis <i>et al.</i> , 2000; Okuno <i>et al.</i> , 1993; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Yang <i>et al.</i> , 2002; Lee <i>et al.</i> , 2000; Watanabe <i>et al.</i> , 1988; Cao <i>et al.</i> , 2007
Hexadecanol	-	-	Ephedraceae, Araceae, Liliaceae, Araliaceae, Rosaceae, Asteraceae, Fabaceae, Theaceae, Apocynaceae, Rhamnaceae	Kobaisy <i>et al.</i> , 2005; Radusiene <i>et al.</i> , 2007; Pyun y Shin, 2006; Tsukasa y Okutu, 1993; Kovzacevic y Ristic, 2007; Judzentiene, 2007; Tava <i>et al.</i> , 2007; Cao <i>et al.</i> , 2007; Lopes <i>et al.</i> , 2005; Ghannadi <i>et al.</i> , 2003

<i>Compuesto</i>	<i>Ligusticum</i>	<i>Apiaceae</i>	<i>Otras familias</i>	<i>Referencia</i>
Octadecanoato de metilo	-	-	Lamiaceae, Musaceae, Simaroubaceae, Cactaceae	Gören <i>et al.</i> , 2003; Meechaona <i>et al.</i> , 2007; Tzakou <i>et al.</i> , 2006; Zhao <i>et al.</i> , 2003
Ácido 9-hexadecanóico	-	-	Lamiaceae, Plumbaginaceae	Gören <i>et al.</i> , 2003; Wei <i>et al.</i> , 2007
4-Metoxicinamato	-	-	Rutaceae	Ivanova <i>et al.</i> , 2004
β-Cariofileno	<i>L. chuanxiong</i> , <i>L. scoticum</i> , <i>L. mutellina</i>	<i>Apium graveolens</i> , <i>Lomatium dasycarpum</i> , <i>L. lucidum</i> , <i>L. macrocarpum</i> , <i>L. utriculatum</i> , <i>L. grayi</i> , <i>L. nevadense</i> , <i>L. dissectum</i> var. <i>dissectum</i> , <i>L. dissectum</i> var. <i>multifidum</i> , <i>L. grayi</i> var. <i>grayi</i> , <i>L. grayi</i> var. <i>depauperatum</i> , <i>L. grayi</i> , <i>L. foeniculaceum</i> spp. <i>fimbriatu</i> , <i>L. rigidum</i> , <i>Meum athamanticum</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Pimpinella rupicola</i> , <i>P. anagodendron</i> , <i>P. acuminata</i> , <i>P. aurea</i> , <i>P. corymbosa</i> , <i>P. peregrina</i> , <i>P. puberula</i> , <i>P. cappadocica</i> var. <i>cappadocica</i> , <i>P. flabellifolia</i> , <i>Angelica archangelica</i> , <i>A. glauca</i> , <i>Anethum graveolens</i> , <i>Rhabdosciadium strausii</i> , <i>R. oligocarpum</i> , <i>R. petiolare</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Tordylium trachycarpum</i> , <i>T. hasselquistiae</i> , <i>Ferulago angulata</i> , <i>Prangos turcica</i> , <i>Carum nigrum</i> , <i>Diplotaenia cachrydifolia</i> , <i>Daucus gigidium</i> spp. <i>gigidium</i> , <i>D. carota</i> ssp. <i>carota</i> , <i>D. carota</i> ssp. <i>sativus</i> , <i>Ferula szowitsiana</i> , <i>Artemisia squamata</i> , <i>Kardenia dubia</i> , <i>Oenanthe crocata</i> , <i>Heraclium candolleianum</i> , <i>Seseli rigidum</i> var. <i>rigidum</i> , <i>S. buchtormense</i> , <i>Kitagawia baicalensis</i> , <i>Eryngium foetidum</i>	Rutaceae, Caryophyllaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Araceae, Fabaceae, Zingiberaceae, Myrtaceae, Clusiaceae, Pinaceae, Bursereaceae, Convolvulaceae, Pittosporaceae, Lauraceae, Cupressaceae, Boraginaceae, Valerianaceae, Piperaceae, Ebenaceae, Liliaceae, Arecaceae, Aquifoliaceae, Geraniaceae, Nymphaeaceae, Ranunculaceae, Oleaceae, Anacardiaceae, Lardizabalaceae, Apocynaceae, Rhamnaceae	Fehr, 1981; Asuming <i>et al.</i> , 2005; Tesso <i>et al.</i> , 2006; MacLeod <i>et al.</i> , 1985; Karting <i>et al.</i> , 1972; Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2004; Wang <i>et al.</i> , 2006; Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 2005; Nivinskiene <i>et al.</i> , 2007; Tapa <i>et al.</i> , 2005; Dev <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2006; Jirovetz <i>et al.</i> , 2003; Tabanca <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2006; Yayli <i>et al.</i> , 2006; Guo <i>et al.</i> , 2006; Peng y Yang, 2005; Deng <i>et al.</i> , 2004; Ogunwande <i>et al.</i> , 2006; Guo <i>et al.</i> , 2004; Sabulal <i>et al.</i> , 2006; Fakhari <i>et al.</i> , 2005; Wenqiang <i>et al.</i> , 2007; Rosselli <i>et al.</i> , 2007; Senatore <i>et al.</i> , 2007; Dev <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Dahia <i>et al.</i> , 2007; Wu <i>et al.</i> , 2006; Chowdhury <i>et al.</i> , 2006; Mojab <i>et al.</i> , 2007; He <i>et al.</i> , 2007; Tian <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2008; Karim <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2007; Matasyoh <i>et al.</i> , 2007; Ashnagar <i>et al.</i> , 2007; Kurkuoglu <i>et al.</i> , 2007; Brophy <i>et al.</i> , 2007; Loizzo <i>et al.</i> , 2007; Reza <i>et al.</i> , 2007; Fellah <i>et al.</i> , 2006; Yu y Guo, 2007; Chowdhury <i>et al.</i> , 2005; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Baser <i>et al.</i> , 2006; Dermirci <i>et al.</i> , 2006; Sylvestre <i>et al.</i> , 2007; Marie <i>et al.</i> , 2007; John <i>et al.</i> , 2007; Tabanca <i>et al.</i> , 2007; Kovacevic <i>et al.</i> , 2007; Nogueira <i>et al.</i> , 2008; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; de Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Pavlovic <i>et al.</i> , 2007; Melkani <i>et al.</i> , 2006; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006; Bazgir <i>et al.</i> , 2005; Bertoli <i>et al.</i> , 2004; Pino <i>et al.</i> , 2004; Orav <i>et al.</i> , 2003; Díaz-Maroto <i>et al.</i> , 2002; Hethelyi y Galambosi, 2002; Rao <i>et al.</i> , 2000; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Brandt y Schultze, 1995; Radusiene <i>et al.</i> , 2007; Flamini <i>et al.</i> , 2007; Ren <i>et al.</i> , 2002; Viswanathan <i>et al.</i> , 2002; Pyun y Shin, 2006; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Araujo <i>et al.</i> , 2007; Barra <i>et al.</i> , 2006; Habibi <i>et al.</i> , 2006; Javidnia <i>et al.</i> , 2006; Myazawa <i>et al.</i> , 2005; Bairamian <i>et al.</i> , 2004; Beauchamp <i>et al.</i> , 2004; Zeng <i>et al.</i> , 2007; Campeol <i>et al.</i> , 2003; Kurucu <i>et al.</i> , 1993; Kawata <i>et al.</i> , 2007; Tkachev <i>et al.</i> , 2005; Bonsignore <i>et al.</i> , 2004; John <i>et al.</i> , 2007; Savikin-Fodulovic <i>et al.</i> , 2006; Tkachev <i>et al.</i> , 2006; Letchamo <i>et al.</i> , 2005(c); Staniszewska <i>et al.</i> , 2005; Cardozo <i>et al.</i> , 2004; Lopes <i>et al.</i> , 2005; Ghannadi <i>et al.</i> , 2003

Compuesto	Ligusticum	Apiaceae	Otras familias	Referencia
Timol	-	<i>Hydrocotyle maritima</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Glaucosciadium cordifolium</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Meum athamanticum</i> , <i>Lomatium grayi</i> , <i>Apium graveolens</i> var. <i>secalium</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Ferulago angulata</i> , <i>Prangos turcica</i> , <i>Carum nigrum</i> , <i>Coriandrum sativum</i> , <i>Pituranthos scoparius</i> , <i>Daucus gingidium</i> sp. <i>gingidium</i>	Lamiaceae, Asteraceae, Ephedraceae, Salvadoraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Rutaceae, Cupressaceae, Euphorbiaceae, Valerianaceae, Fabaceae, Arecaceae, Geraniaceae, Liliaceae	Hudaib y Aburjai, 2007; Bendahou <i>et al.</i> , 2008; Asakawa <i>et al.</i> , 1982; Baser <i>et al.</i> , 2000; Simon y Quinn, 1988; MacLeod <i>et al.</i> , 1985; Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2004; Dev <i>et al.</i> , 2007; Saleh <i>et al.</i> , 1985; Guo <i>et al.</i> , 2006; Kobaisy <i>et al.</i> , 2005; Touafek <i>et al.</i> , 2004; Alali y Al-Lafi, 2003; Rosselli <i>et al.</i> , 2007; Senatore <i>et al.</i> , 2007; Dev <i>et al.</i> , 2007; Mojab <i>et al.</i> , 2007; Suárez <i>et al.</i> , 2007; Tian <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2008; Kurkcuoglu <i>et al.</i> , 2007; Reza <i>et al.</i> , 2007; Vagionas <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Dermirci <i>et al.</i> , 2006; Tabanca <i>et al.</i> , 2007; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; Simionatto <i>et al.</i> , 2007; Pavlovic <i>et al.</i> , 2007; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006; Lo Cantore <i>et al.</i> , 2004; Bertoli <i>et al.</i> , 2004; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Flamini <i>et al.</i> , 2007; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Barra <i>et al.</i> , 2006; Javidnia <i>et al.</i> , 2006; Umamo <i>et al.</i> , 1999
α-Copaeno	-	<i>Angelica glauca</i> , <i>A. archangelica</i> , <i>Cnidium officinale</i> , <i>Lomatium macrocarpum</i> , <i>L. utriculatum</i> , <i>L. nevadense</i> , <i>L. grayi</i> var. <i>depauperatum</i> , <i>L. foeniculaceum</i> spp. <i>fimbriatu</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Pimpinella junoniae</i> , <i>P. rupicola</i> , <i>P. anagodendron</i> , <i>P. acuminata</i> , <i>P. aurea</i> , <i>P. corymbosa</i> , <i>P. peregrina</i> , <i>P. puberula</i> , <i>P. cappadocica</i> var. <i>cappadocica</i> , <i>P. isaurica</i> , <i>Rhabdosciadium strausii</i> , <i>R. oligocarpum</i> , <i>R. petiolare</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Tordylium trachycarpum</i> , <i>T. hasselquistiae</i> , <i>Ferulago angulata</i> , <i>Prangos uloptera</i> , <i>P. turcica</i> , <i>Diplotaenia cachrydifolia</i> , <i>Daucus gingidium</i> spp. <i>gingidium</i> , <i>Ferula szowitsiana</i> , <i>Arteria squamata</i> , <i>Heraclium candolleianum</i> , <i>Seseli peucedanoides</i> , <i>S. rigidum</i> var. <i>rigidum</i> , <i>S. buchtormense</i> , <i>Eryngium bourgatii</i> , <i>Peucedanum zenkeri</i>	Rutaceae, Araceae, Fabaceae, Asteraceae, Lauraceae, Solanaceae, Zingiberaceae, Myrtaceae, Piperaceae, Magnoliaceae, Lamiaceae, Burseraceae, Clusiaceae, Pinaceae, Convolvulaceae, Pittosporaceae, Anacardiaceae, Cupressaceae, Vitaceae, Euphorbiaceae, Boraginaceae, Valerianaceae, Liliaceae, Arecaceae, Aquifoliaceae, Oleaceae, Lardizabalaceae Apocynaceae	Kaul <i>et al.</i> , 1996; Choi <i>et al.</i> , 2002; Asuming <i>et al.</i> , 2005; MacLeod <i>et al.</i> , 1985; Karting <i>et al.</i> , 1972; Wang <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2006; Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 2003; Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 2005; Nivinskiene <i>et al.</i> , 2007; Dev <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2006; Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2006; Deng <i>et al.</i> , 2004; Ogunwande <i>et al.</i> , 2006; Guo <i>et al.</i> , 2004, Sanhaji <i>et al.</i> , 2006; Huang <i>et al.</i> , 2006; Sabulal <i>et al.</i> , 2006; Fakhari <i>et al.</i> , 2005; Wenqiang <i>et al.</i> , 2007; Cardeal <i>et al.</i> , 2006; Deng <i>et al.</i> , 2003; Li <i>et al.</i> , 2007; Rosselli <i>et al.</i> , 2007; Dev <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Dahia <i>et al.</i> , 2007; Mojab <i>et al.</i> , 2007; Suárez <i>et al.</i> , 2007; Jalali-Heravi <i>et al.</i> , 2007; Tian <i>et al.</i> , 2006; Karim <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008; Khin <i>et al.</i> , 2007; Brophy <i>et al.</i> , 2007; Loizzo <i>et al.</i> , 2007; Reza <i>et al.</i> , 2007; Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2007; Vagionas <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Baser <i>et al.</i> , 2006; Dermirci <i>et al.</i> , 2006; Sylvestre <i>et al.</i> , 2007; Marie <i>et al.</i> , 2007; John <i>et al.</i> , 2007; Gardeli <i>et al.</i> , 2008; Kovacevic <i>et al.</i> , 2007; Nogueira <i>et al.</i> , 2008; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; Ruberto <i>et al.</i> , 2008; Simionatto <i>et al.</i> , 2007; de Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Pavlovic <i>et al.</i> , 2007; Melkani <i>et al.</i> , 2006; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Bazgir <i>et al.</i> , 2005; Raina <i>et al.</i> , 2004; Bertoli <i>et al.</i> , 2004; Díaz-Maroto <i>et al.</i> , 2002; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Flamini <i>et al.</i> , 2007; Pino <i>et al.</i> , 2006; Pyun y Shin, 2006; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Huang <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2006; Araujo <i>et al.</i> , 2007; Habibi <i>et al.</i> , 2006; Javidnia <i>et al.</i> , 2006; Campeol <i>et al.</i> , 2003; Kawata <i>et al.</i> , 2007; John <i>et al.</i> , 2007; Bulatovic <i>et al.</i> , 2006; Savikin-Fodulovic <i>et al.</i> ,

Compuesto	Ligusticum	Apiaceae	Otras familias	Referencia
α-Bourboneno	-	<i>Angelica glauca</i> , <i>Pimpinella aurea</i> , <i>P. corymbosa</i> , <i>P. peregrina</i> , <i>P. puberula</i> , <i>Lomatium nevadense</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Tordylium trachycarpum</i> , <i>T. hasselquistiae</i> , <i>Prangos turcica</i> , <i>Rhabdosciadium microcalycinum</i> , <i>Smyrniium perfoliatum</i>	Piperaceae, Clusiaceae, Lamiaceae, Rutaceae	2006; Tkachev <i>et al.</i> , 2006; Lopes <i>et al.</i> , 2005; Menut <i>et al.</i> , 1995 Kaul <i>et al.</i> , 1996; Tabanca <i>et al.</i> , 2005; Cardeal <i>et al.</i> , 2006; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Jalali-Heravi <i>et al.</i> , 2007; Karim <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2007; Kurkcuoglu <i>et al.</i> , 2007; Brophy <i>et al.</i> , 2007; Fellah <i>et al.</i> , 2006; Yu y Guo, 2007; Chowdhury <i>et al.</i> , 2005; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Baser <i>et al.</i> , 2006; Dermirci <i>et al.</i> , 2006; Molleken <i>et al.</i> , 1998(a)
Germacreno D	<i>L. chuanxiong</i> , <i>L. mutellina</i>	<i>Angelica glauca</i> , <i>A. archangelica</i> , <i>A. glauca</i> , <i>Cnidium officinale</i> , <i>Meum athamanticum</i> , <i>Lomatium lucidum</i> , <i>L. macrocarpum</i> , <i>L. utriculatum</i> , <i>L. grayi</i> , <i>L. nevadense</i> , <i>L. grayi</i> var. <i>grayi</i> , <i>L. grayi</i> var. <i>depauperatum</i> , <i>L. grayi</i> , <i>L. foeniculaceum</i> spp. <i>fimbriatu</i> , <i>L. rigidum</i> , <i>Eryngium bourgatii</i> , <i>Pimpinella rupicola</i> , <i>P. anagodendron</i> , <i>P. aurea</i> , <i>P. corymbosa</i> , <i>P. peregrina</i> , <i>P. puberula</i> , <i>P. anisetum</i> , <i>P. cappadocica</i> var. <i>cappadocica</i> , <i>P. isaurica</i> , <i>Ferulago carduchorum</i> , <i>Rhabdosciadium strausii</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Tordylium trachycarpum</i> , <i>T. hasselquistiae</i> , <i>Ferulago angulata</i> , <i>F. carduchorum</i> , <i>Prangos uloptera</i> , <i>P. turcica</i> , <i>Rhabdosciadium oligocarpum</i> , <i>R. petiolare</i> , <i>Carum nigrum</i> , <i>Diplotaenia cachrydifolia</i> , <i>Anethum graveolens</i> , <i>Apium graveolens</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Daucus gingidium</i> spp. <i>gingidium</i> , <i>D. carota</i> , <i>D. carota</i> spp. <i>carota</i> , <i>D. carota</i> spp. <i>sativus</i> , <i>Ferula szowitsiana</i> , <i>Artemisia squamata</i> , <i>Kadenia dubia</i> , <i>Seseli peucedanoides</i> , <i>S. rigidum</i> var. <i>rigidum</i> , <i>S. buchtormense</i> , <i>Chaerophyllum prescottii</i> , <i>Kitagawia baicalensis</i> , <i>Peucedanum zenkeri</i>	Rutaceae, Caryophyllaceae, Araceae, Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Piperaceae, Clusiaceae, Oleaceae, Pinaceae, Bursiferaceae, Convolvulaceae, Pittosporaceae, Anacardiaceae, Cupressaceae, Vitaceae, Boraginaceae, Valerianaceae, Lauraceae, Arecaceae, Geraniaceae, Apocynaceae, Rhamnaceae	Kaul <i>et al.</i> , 1996; Choi <i>et al.</i> , 2002; Asuming <i>et al.</i> , 2005; Wang <i>et al.</i> , 2006; Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 2005; Nivinskiene <i>et al.</i> , 2007; Tapa <i>et al.</i> , 2005; Dev <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2006; Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2006; Yayli <i>et al.</i> , 2006; Samiee <i>et al.</i> , 2006; Deng <i>et al.</i> , 2004; Ogunwande <i>et al.</i> , 2006; Guo <i>et al.</i> , 2004; Fakhari <i>et al.</i> , 2005; Touafek <i>et al.</i> , 2004; Cardeal <i>et al.</i> , 2006; Dev <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Dahia <i>et al.</i> , 2007; Chowdhury <i>et al.</i> , 2006; Jalali-Heravi <i>et al.</i> , 2007; Karim <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2007; Matasyoh <i>et al.</i> , 2007; Yu y Fu, 2007; Brophy <i>et al.</i> , 2007; Loizzo <i>et al.</i> , 2007; Reza <i>et al.</i> , 2007; Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2007; Fellah <i>et al.</i> , 2006; Yu y Guo, 2007; Vagionas <i>et al.</i> , 2007; Chowdhury <i>et al.</i> , 2005; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Nik y Mirza, 2006; Baser <i>et al.</i> , 2006; Zriria <i>et al.</i> , 2007; Dermirci <i>et al.</i> , 2006; Sylvestre <i>et al.</i> , 2007; Marie <i>et al.</i> , 2007; John <i>et al.</i> , 2007; Gardeli <i>et al.</i> , 2008; Tabanca <i>et al.</i> , 2007; Nogueira <i>et al.</i> , 2008; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; Ruberto <i>et al.</i> , 2008; de Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Pavlovic <i>et al.</i> , 2007; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006; Bazgir <i>et al.</i> , 2005; Pino <i>et al.</i> , 2004; Orav <i>et al.</i> , 2003; Vermin <i>et al.</i> , 1999; Brandt y Schultze, 1995; Radusiene <i>et al.</i> , 2007; Flamini <i>et al.</i> , 2007; Barra <i>et al.</i> , 2006; Pino <i>et al.</i> , 2006; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Andrade <i>et al.</i> , 2006; Rossi <i>et al.</i> , 2007; Habibi <i>et al.</i> , 2006; Javidnia <i>et al.</i> , 2006; Samiee <i>et al.</i> , 2006; Beauchamp <i>et al.</i> , 2004; Tkachev <i>et al.</i> , 2005; Bulatovic <i>et al.</i> , 2006; Savikin-Fodulovic <i>et al.</i> , 2006; Tkachev <i>et al.</i> , 2006; Letchamo <i>et al.</i> , 2005(a); Letchamo <i>et al.</i> , 2005(b); Staniszewska <i>et al.</i> , 2005; Lopes <i>et al.</i> , 2005; Ghannadi <i>et al.</i> , 2003; Menut <i>et al.</i> , 1995

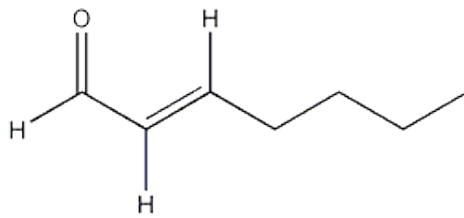
<i>Compuesto</i>	<i>Ligusticum</i>	<i>Apiaceae</i>	<i>Otras familias</i>	<i>Referencia</i>
β-Bisaboleno	<i>L. mutellina</i>	<i>Angelica glauca</i> , <i>Pimpinella aurea</i> , <i>P. corymbosa</i> , <i>P. peregrina</i> , <i>P. puberula</i> , <i>Rhabdosciadium strausii</i> , <i>Lomatium nevadense</i> , <i>L. dissectum</i> var. <i>dissectum</i> , <i>L. dissectum</i> var. <i>multifidum</i> , <i>Prangos uloptera</i> , <i>Eryngium corniculatum</i> , <i>Carum nigrum</i> , <i>Anethum graveolens</i> , <i>Apium graveolens</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>D. carota</i> sp. <i>carota</i> , <i>D. carota</i> sp. <i>sativus</i> , <i>Seseli buchtormense</i> , <i>Kitagawia baicalensis</i> , <i>Molopospermum peloponnesiacum</i>	Zingiberaceae, Piperaceae, Lamiaceae, Clusiaceae, Cupressaceae, Ebenaceae, Araceae, Nymphaeaceae, Anacardiaceae, Solanaceae, Rosaceae	Kaul <i>et al.</i> , 1996; Tabanca <i>et al.</i> , 2005; Sabulal <i>et al.</i> , 2006; Cardeal <i>et al.</i> , 2006; Rui-Zhen <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Karim <i>et al.</i> , 2007; Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2007; Pala-Paul <i>et al.</i> , 2007; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006; Orav <i>et al.</i> , 2003; Díaz-Maroto <i>et al.</i> , 2002; Brandt y Schultze, 1995; Viswanathan <i>et al.</i> , 2002; Raina <i>et al.</i> , 2003; Rossi <i>et al.</i> , 2007; Myazawa <i>et al.</i> , 2005; Bairamian <i>et al.</i> , 2004; Kurucu <i>et al.</i> , 1993; Cardeal <i>et al.</i> , 2006; Tkachev <i>et al.</i> , 2006; Letchamo <i>et al.</i> , 2005(b); Staniszevska <i>et al.</i> , 2005; Vollmann y Schultze, 1995; Kubeczka y Ullmann, 1981
α-Calacoreno	-	<i>Eryngium bourgatii</i> , <i>E. corniculatum</i> <i>Pimpinella corymbosa</i> , <i>P. cappadocica</i> var. <i>cappadocica</i> , <i>Rhabdosciadium oligocarpum</i> , <i>R. petiolare</i> , <i>Pituranthos scoparius</i> , <i>Lomatium rigidum</i>	Ephedraceae, Asteraceae, Lamiaceae, Clusiaceae, Cupressaceae, Vitaceae, Euphorbiaceae, Boraginaceae, Valerianaceae, Araceae, Lauraceae, Liliaceae, Arecaceae, Nymphaeaceae, Lardizabalaceae, Solanaceae	Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2006; Kobaisy <i>et al.</i> , 2005; Vagionas <i>et al.</i> , 2007; Baser <i>et al.</i> , 2006; Dermirci <i>et al.</i> , 2006; Pala-Paul <i>et al.</i> , 2007; Nogueira <i>et al.</i> , 2008; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; Ruberto <i>et al.</i> , 2008; Simionatto <i>et al.</i> , 2007; de Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Pavlovic <i>et al.</i> , 2007; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Radusiene <i>et al.</i> , 2007; Pino <i>et al.</i> , 2006; Raina <i>et al.</i> , 2003; Pyun y Shin, 2006; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Facey <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2006; Senatore <i>et al.</i> , 2005; Habibi <i>et al.</i> , 2006; Myazawa <i>et al.</i> , 2005; Beauchamp <i>et al.</i> , 2004; Kawata <i>et al.</i> , 2007; Cardeal <i>et al.</i> , 2006
Cadala-1(10),3,8-trieno	-	<i>Angelica pubescens</i>	Lauraceae, Solanaceae, Arecaceae, Lamiaceae, Araceae, Cupressaceae	Song <i>et al.</i> , 2004; Sanhaji <i>et al.</i> , 2006; Huang <i>et al.</i> , 2006; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Facey <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Huang <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2006
3-(4,8,12-trimetiltridecil) furano	-	-	Rubiaceae	Huang <i>et al.</i> , 2007
Miristicina	<i>L. porteri</i> , <i>L. mutellina</i> , <i>L. scoticum</i>	<i>Petroselinum crispum</i> , <i>Apium graveolens</i> , <i>Apium graveolens</i> var. <i>secalium</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Pimpinella acuminata</i> , <i>Carum nigrum</i> , <i>C. carvi</i> , <i>Anethum graveolens</i> , <i>Sium latifolium</i> , <i>Coriandrum sativum</i> var. <i>vulgare</i> , <i>C. sativum</i> var. <i>microcarpum</i> , <i>Chaerophyllum prescottii</i> , <i>Peucedanum zenkeri</i> , <i>Pastinaca sativa</i>	Aristolochiaceae, Lamiaceae, Piperaceae, Ranunculaceae	Cégiéla-Carlioz <i>et al.</i> , 2005; MacLeod <i>et al.</i> , 1985; Karting <i>et al.</i> , 1972; MacLeod <i>et al.</i> , 1988; Passreiter <i>et al.</i> , 2005; Saleh <i>et al.</i> , 1985; Nguyen <i>et al.</i> , 2007, Dahia <i>et al.</i> , 2007; Chowdhury <i>et al.</i> , 2006; Mojab <i>et al.</i> , 2007; Jalali-Heravi <i>et al.</i> , 2007; Melkani <i>et al.</i> , 2006; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006; Tewari y Mathela, 2003; Pino <i>et al.</i> , 2004; Orav <i>et al.</i> , 2003; Díaz-Maroto <i>et al.</i> , 2002; Hethelyi y Galambosi, 2002; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Brandt y Schultze, 1995; Saiki <i>et al.</i> , 1967; Zeng <i>et al.</i> , 2007; Letchamo <i>et al.</i> , 2005(a); Telci <i>et al.</i> , 2006; Letchamo <i>et al.</i> , 2005(b); Menut <i>et al.</i> , 1995; Zangerl <i>et al.</i> , 1997

Compuesto	Ligusticum	Apiaceae	Otras familias	Referencia
Apiol	<i>L. hultenii</i> , <i>L. scoticum</i> , <i>L. mutellina</i>	<i>Petroselinum crispum</i> , <i>Apium graveolens</i> var. <i>secalium</i> , <i>A. graveolens</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Prangos turcica</i> , <i>Rhabdosciadium microcalycinum</i> , <i>Pimpinella acuminata</i> , <i>Carum nigrum</i> , <i>C. carvi</i> , <i>C. bulbocastanum</i> , <i>Diplotaenia cachrydifolia</i> , <i>Coriandrum sativum</i> , <i>Peucedanum decursivum</i> , <i>Anethum graveolens</i>	Ephedraceae, Aristolochiaceae, Lamiaceae, Bursereaceae, Fabaceae, Piperaceae, Ranunculaceae	MacLeod <i>et al.</i> , 1985; Karting <i>et al.</i> , 1972; Saleh <i>et al.</i> , 1985; Kobaisy <i>et al.</i> , 2005; Meepagala <i>et al.</i> , 2005; Nguyen <i>et al.</i> , 2007; Dahia <i>et al.</i> , 2007; Wu <i>et al.</i> , 2006; Chowdhury <i>et al.</i> , 2006; Mojab <i>et al.</i> , 2007; Suárez <i>et al.</i> , 2007; Jalali-Heravi <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Baser <i>et al.</i> , 2006; Melkani <i>et al.</i> , 2006; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006; Bazgir <i>et al.</i> , 2005; Raina <i>et al.</i> , 2004; Lo Cantore <i>et al.</i> , 2004; Lan <i>et al.</i> , 2004; Tewari y Mathela, 2003; Bertoli <i>et al.</i> , 2004; Pino <i>et al.</i> , 2004; Orav <i>et al.</i> , 2003; Díaz-Maroto <i>et al.</i> , 2002; Rao <i>et al.</i> , 2000; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Brandt y Schultze, 1995; Yang <i>et al.</i> , 2005
Elemicina	<i>L. porteri</i> , <i>L. scoticum</i> , <i>L. mutellina</i>	<i>Petroselinum crispum</i> , <i>Apium graveolens</i> var. <i>secalium</i> , <i>A. graveolens</i> , <i>Pimpinella isaurica</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Diplotaenia cachrydifolia</i> , <i>Carum carvi</i> , <i>C. bulbocastanum</i> , <i>Anethum graveolens</i> , <i>Daucus gigidium</i> spp. <i>gigidium</i> , <i>D. carota</i> , <i>Peucedanum officinale</i> , <i>Smyrniium olusatrum</i>	Bursereaceae, Lauraceae, Piperaceae, Clusiaceae, Aristolochiaceae, Araceae, Asteraceae, Rutaceae, Ranunculaceae	Cégiéla-Carlioz <i>et al.</i> , 2005; MacLeod <i>et al.</i> , ; Tabanca <i>et al.</i> , 2006; Dahia <i>et al.</i> , 2007; Suárez <i>et al.</i> , 2007; Jalali-Heravi <i>et al.</i> , 2007; Kovacevic <i>et al.</i> , 2007; Bazgir <i>et al.</i> , 2005; Tewari y Mathela, 2003; Pino <i>et al.</i> , 2004; Orav <i>et al.</i> , 2003; Hethelyi y Galambosi, 2002; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Brandt y Schultze, 1995; Karim <i>et al.</i> , 2007; Flamini <i>et al.</i> , 2007; Saiki <i>et al.</i> , 1967; Raina <i>et al.</i> , 2003; Kowalski <i>et al.</i> , 2007; Andrade <i>et al.</i> , 2006; Rossi <i>et al.</i> , 2007; Jaimand <i>et al.</i> , 2006; Merle <i>et al.</i> , 2006; Ramanoelina <i>et al.</i> , 2006; Zeng <i>et al.</i> , 2007; Molleken <i>et al.</i> , 1998(b)
α -Cadinol	<i>L. marginatum</i>	<i>Meum athamanticum</i> , <i>Angelica archangelica</i> , <i>Lomatium foeniculaceum</i> spp. <i>fimbriatu</i> , <i>L. nevadense</i> , <i>L. rigidum</i> , <i>Pimpinella corymbosa</i> , <i>P. cappadocica</i> var. <i>cappadocica</i> , <i>Rhabdosciadium strausii</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Centella asiatica</i> , <i>Prangos turcica</i> , <i>Rhabdosciadium oligocarpum</i> , <i>Carum carvi</i> , <i>C. bulbocastanum</i> , <i>Peucedanum officinale</i> , <i>P. zenkeri</i> , <i>Ferulago angulata</i> , <i>Seseli buchtormense</i> , <i>Smyrniium perfoliatum</i>	Asteraceae, Zingiberaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Clusiaceae, Oleaceae, Rutaceae, Bursereaceae, Convolvulaceae, Pittosporaceae, Anacardiaceae, Cupressaceae, Boraginaceae, Valerianaceae, Fabaceae, Piperaceae, Araceae, Nymphaeaceae, Ranunculaceae, Lardizabalaceae	Tesso <i>et al.</i> , 2006; Nivinskiene <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2006; Tabanca <i>et al.</i> , 2005; Tabanca <i>et al.</i> , 2006; Guo <i>et al.</i> , 2004; Sabulal <i>et al.</i> , 2006; Fakhari <i>et al.</i> , 2005; Rosselli <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Dahia <i>et al.</i> , 2007; Chowdhury <i>et al.</i> , 2006; Khin <i>et al.</i> , 2007; Karim <i>et al.</i> , 2007; Matasyoh <i>et al.</i> , 2007; Yu y Fu, 2007; Kurkcuoglu <i>et al.</i> , 2007; Brophy <i>et al.</i> , 2007; Yu y Guo, 2007; Vagionas <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Nik y Mirza, 2006; Baser <i>et al.</i> , 2006; Okoh <i>et al.</i> , 2007; Zriria <i>et al.</i> , 2007; Sylvestre <i>et al.</i> , 2007; Marie <i>et al.</i> , 2007; John <i>et al.</i> , 2007; Gardeli <i>et al.</i> , 2008; Tabanca <i>et al.</i> , 2007; Kovacevic <i>et al.</i> , 2007; Nogueira <i>et al.</i> , 2008; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; de Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Pavlovic <i>et al.</i> , 2007; Tewari y Mathela, 2003; Bertoli <i>et al.</i> , 2004; Pino <i>et al.</i> , 2004; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Radusiene <i>et al.</i> , 2007; Pino <i>et al.</i> , 2006; Raina <i>et al.</i> , 2003; Facey <i>et al.</i> , 2006; Liu <i>et al.</i> , 2006; Andrade <i>et al.</i> , 2006; Jaimand <i>et al.</i> , 2006; Javidnia <i>et al.</i> , 2006; Myazawa <i>et al.</i> , 2005; Beauchamp <i>et al.</i> , 2004; Zeng <i>et al.</i> , 2007; Kawata <i>et al.</i> , 2007; Tkachev <i>et al.</i> , 2006; Thakuri <i>et al.</i> , 2007; Menut <i>et al.</i> , 1995; Molleken <i>et al.</i> , 1998(a)
5,7,8-Trimetil-dihidroumarina	-	<i>Angelica sinensis</i>	-	Ming-Jiang <i>et al.</i> , 2005

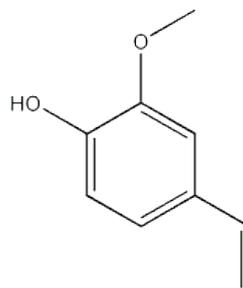
<i>Compuesto</i>	<i>Ligusticum</i>	<i>Apiaceae</i>	<i>Otras familias</i>	<i>Referencia</i>
Asarona	<i>L. mutellina</i>	<i>Daucus gingidium</i> spp. <i>gingidium</i> , <i>D. carota</i>	Araceae, Ephedraceae, Lamiaceae, Clusiaceae, Rutaceae, Amaranthaceae, Tiliaceae, Ranunculaceae, Lauraceae, Aristolochiaceae, Polygonaceae, Ebenaceae, Rutaceae, Asteraceae, Nymphaeaceae	Deng <i>et al.</i> , 2004; Kobaisy <i>et al.</i> , 2005; Lee <i>et al.</i> , 2004; Li <i>et al.</i> , 2007; Karim <i>et al.</i> , 2007; Brandt y Schultze, 1995; Khan <i>et al.</i> , 2007; Wei <i>et al.</i> , 2005; Rashmi, 2007; Radusiene <i>et al.</i> , 2007; Flamini <i>et al.</i> , 2007; Fang <i>et al.</i> , 2006; Yang <i>et al.</i> , 2005; Pino <i>et al.</i> , 2006; Saiki <i>et al.</i> , 1967; Gao <i>et al.</i> , 2002; Ren <i>et al.</i> , 2002; Viswanathan <i>et al.</i> , 2002; Wijaya <i>et al.</i> , 2002; Raina <i>et al.</i> , 2003; Kowalski <i>et al.</i> , 2007; Rossi <i>et al.</i> , 2007; Myazawa <i>et al.</i> , 2005
<i>E</i> -butilideneftálida	<i>L. chuanxiong</i> , <i>L. mutellina</i>	<i>Angelica sinensis</i> , <i>A. glauca</i> , <i>A. acutiloba</i> , <i>A. acutiloba</i> var. <i>sugiyamae</i> , <i>A. carmichaeli</i> , <i>Apium graveolens</i> , <i>A. graveolens</i> var. <i>rapaceum</i> , <i>Levisticum officinale</i> , <i>Lomatium dasycarpum</i> , <i>L. utriculatum</i> , <i>L. torreyi</i> , <i>Cnidium officinale</i> , <i>Meum athamanticum</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>P. crispum</i> var. <i>tuberosum</i> , <i>Glaucosciadium cordifolium</i>	-	Yi <i>et al.</i> , 2006; Lu <i>et al.</i> , 2004; Lao <i>et al.</i> , 2004; Kaul <i>et al.</i> , 1996; Gijbels <i>et al.</i> , 1985; Santos <i>et al.</i> , 2005; Gijbels <i>et al.</i> , 1982; Asuming <i>et al.</i> , 2005; Lin <i>et al.</i> , 2005
Dihidroactinidiólida	-	-	Cyperaceae, Theaceae, Actinidiaceae, Asteraceae, Aquifoliaceae, Primulaceae, Rosaceae, Ranunculaceae, Lamiaceae, Geraniaceae, Orchidaceae, Hydrocharitaceae, Olacaceae, Tiliaceae, Verbenaceae	Stevens y Merrill, 1981; Seigo <i>et al.</i> , 1969; Zhao <i>et al.</i> , 2006; Senatore <i>et al.</i> , 2007; Araujo <i>et al.</i> , 2007; Yuan y Yuan, 2007; Gong <i>et al.</i> , 2006; Rosselli <i>et al.</i> , 2007; Formisano <i>et al.</i> , 2007; Barra <i>et al.</i> , 2006; Formisano <i>et al.</i> , 2007; Han <i>et al.</i> , 2006; Bureau <i>et al.</i> , 2006; Guan <i>et al.</i> , 2006; Xian <i>et al.</i> , 2006; Mevy <i>et al.</i> , 2006; Wang y Tian, 2006; Al-Amier <i>et al.</i> , 2005; Senatore <i>et al.</i> , 2005
Oplopanona	-	<i>Meum athamanticum</i> , <i>Peucedanum officinale</i> , <i>Lomatium rigidum</i>	Ephedraceae, Araliaceae; Zingiberaceae, Asteraceae, Cupressaceae	Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2004; Kobaisy <i>et al.</i> , 2005; Takeda <i>et al.</i> , 1965; Tchuendem <i>et al.</i> , 1999; Gutiérrez <i>et al.</i> , 2001; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; Jaimand <i>et al.</i> , 2006; Céspedes <i>et al.</i> , 2006;

<i>Compuesto</i>	<i>Ligusticum</i>	<i>Apiaceae</i>	<i>Otras familias</i>	<i>Referencia</i>
Escoparona	-	-	Gentaniaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Malvaceae, Calycanthaceae, Asteraceae, Ulmaceae, Euphorbiaceae, Araliaceae, Orchidaceae	Randrianarivelosia <i>et al.</i> , 2006; Beauchamp <i>et al.</i> , 2004; Zheng <i>et al.</i> , 2006; Shi <i>et al.</i> , 2006; Silva <i>et al.</i> , 2006; Xiao <i>et al.</i> , 2005; Zhang y Kong, 2006; Céspedes <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2004; Huang <i>et al.</i> , 2004; Lin <i>et al.</i> , 2004; Wu <i>et al.</i> , 2005; Lee <i>et al.</i> , 2002; Triana <i>et al.</i> , 2001; Canelon <i>et al.</i> , 2005; Fan <i>et al.</i> , 2001
α -Espatulenol	<i>L. chuanxiong</i>	<i>Lomatium dasycarpum</i> , <i>L. lucidum</i> , <i>L. utriculatum</i> , <i>L. nevadense</i> , <i>L. foeniculaceum</i> spp. <i>fimbriatu</i> , <i>L. rigidum</i> , <i>Angelica archangelica</i> , <i>A. glauca</i> , <i>A. sinensis</i> , <i>Meum athamanticum</i> , <i>Eryngium bourgatii</i> , <i>E. glaciale</i> , <i>Pimpinella junoniae</i> , <i>P. aurea</i> , <i>P. corymbosa</i> , <i>P. cappadocica</i> var. <i>cappadocica</i> , <i>P. flabellifolia</i> , <i>P. isaurica</i> , <i>Rhabdosciadium strausii</i> , <i>R. petiolare</i> , <i>R. oligocarpum</i> , <i>Pituranthos chloranthus</i> spp. <i>cossonianus</i> , <i>P. scoparius</i> , <i>Nigella sativa</i> , <i>Cuminum cyminum</i> , <i>Tordylium trachycarpum</i> , <i>T. hasselquistiae</i> , <i>Ferulago angulata</i> , <i>Prangos uloptera</i> , <i>P. turcica</i> , <i>Carum nigrum</i> , <i>Daucus gigidium</i> spp. <i>gigidium</i> , <i>D. carota</i> spp. <i>carota</i> , <i>D. carota</i> spp. <i>sativus</i> , <i>Peucedanum officinale</i> , <i>Ferula szowitsiana</i> , <i>Seseli peucedanoides</i> , <i>S. rigidum</i> var. <i>rigidum</i> , <i>Smyrniium perfoliatum</i>	Rutaceae, Asteraceae, Fabaceae, Lauraceae, Piperaceae, Lamiaceae, Bursereaceae, Myrtaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Anacardiaceae, Cupressaceae, Euphorbiaceae, Boraginaceae, Valerianaceae, Amaranthaceae, Araceae, Arecaceae, Geraniaceae, Nymphaeaceae, Apocynaceae, Rhamnaceae, Rosaceae	Asuming <i>et al.</i> , 2005; Velasco-Negueruela <i>et al.</i> , 2003; Nivinskiene <i>et al.</i> , 2007; Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2004; Tapa <i>et al.</i> , 2005; Delazar <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2006; Beauchamp <i>et al.</i> , 2006; Palá-Paúl <i>et al.</i> , 2005(a); Paúl <i>et al.</i> , 2005(b); Tabanca <i>et al.</i> , 2006; Guo <i>et al.</i> , 2006; Ogunwande <i>et al.</i> , 2006; Song <i>et al.</i> , 2004; Suárez <i>et al.</i> , 2007; Senhaji <i>et al.</i> , 2006; Fakhari <i>et al.</i> , 2005; Cardeal <i>et al.</i> , 2006; Li <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Beauchamp <i>et al.</i> , 2007; Dahia <i>et al.</i> , 2007; Jalali-Heravi <i>et al.</i> , 2007; Tian <i>et al.</i> , 2006; Chen <i>et al.</i> , 2006; Khin <i>et al.</i> , 2007; Karim <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2007; Ashnagar <i>et al.</i> , 2007; Kurkcuoglu <i>et al.</i> , 2007; Brophy <i>et al.</i> , 2007; Reza <i>et al.</i> , 2007; Nazemiyeh <i>et al.</i> , 2007; Vagionas <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2006; Nik y Mirza, 2006; Baser <i>et al.</i> , 2006; Gardeli <i>et al.</i> , 2008; Radusiene <i>et al.</i> , 2007; Tabanca <i>et al.</i> , 2007; Kovacevic <i>et al.</i> , 2007; Nogueira <i>et al.</i> , 2008; Butkiene <i>et al.</i> , 2007; Simionatto <i>et al.</i> , 2007; de Oliveira <i>et al.</i> , 2007; Pavlovic <i>et al.</i> , 2007; Bozin <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006; Bertoli <i>et al.</i> , 2004; Vernin <i>et al.</i> , 1999; Rashmi, 2007; Flamini <i>et al.</i> , 2007; Ren <i>et al.</i> , 2002; Raina <i>et al.</i> , 2003; Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007; Barra <i>et al.</i> , 2006; Andrade <i>et al.</i> , 2006; Jaimand <i>et al.</i> , 2006; Habibi <i>et al.</i> , 2006; Javidnia <i>et al.</i> , 2006; Myazawa <i>et al.</i> , 2005; Beauchamp <i>et al.</i> , 2004; Bulatovic <i>et al.</i> , 2006; Savikin-Fodulovic <i>et al.</i> , 2006; Staniszewska <i>et al.</i> , 2005; Lopes <i>et al.</i> , 2005; Ghannadi <i>et al.</i> , 2003; Vollmann y Schultze, 1995; Molleken <i>et al.</i> , 1998(a)

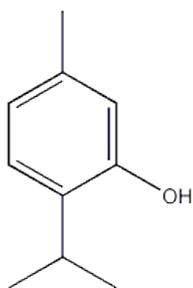
<i>Compuesto</i>	<i>Ligusticum</i>	<i>Apiaceae</i>	<i>Otras familias</i>	<i>Referencia</i>
Fitol	-	<i>Tordylium trachycarpum</i> , <i>T. hasselquistiae</i> , <i>Smyrniolum olusatrum</i>	Tiliaceae, Lauraceae, Lamiaceae, Solanaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Orchidaceae, Asteraceae, Verbenaceae, Aquifoliaceae, Fabaceae	Fang <i>et al.</i> , 2006; Pino <i>et al.</i> , 2006; Ren <i>et al.</i> , 2002; Huang <i>et al.</i> , 2006; Yuan y Yuan, 2007; Senatore <i>et al.</i> , 2007; Rosselli <i>et al.</i> , 2007; Han <i>et al.</i> , 2006; Guan <i>et al.</i> , 2006; Al-Amier <i>et al.</i> , 2005; Senatore <i>et al.</i> , 2005; Yang <i>et al.</i> , 2002; Tava <i>et al.</i> , 2007; Ozek <i>et al.</i> , 2007; Molleken <i>et al.</i> , 1998(b)
Acetovanillona	-	-	Orchidaceae, Solanaceae, Rosaceae	Pérez-Silva <i>et al.</i> , 2006; Miguel y Barroso, 1994; Kokubun y Harborne, 1995



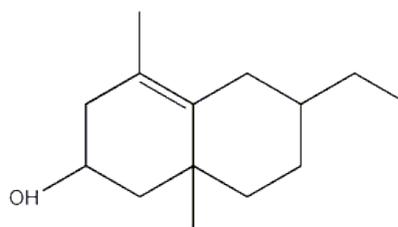
Z-2-heptenal



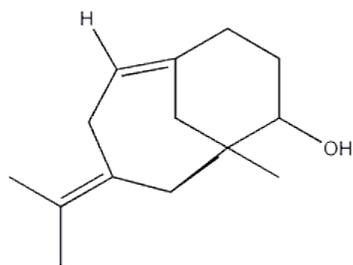
4-Vinilguayacol



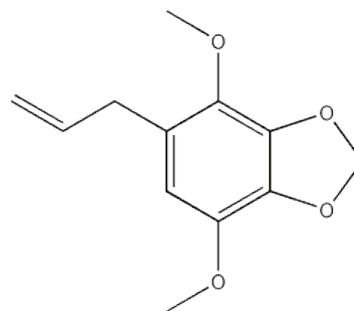
Timol



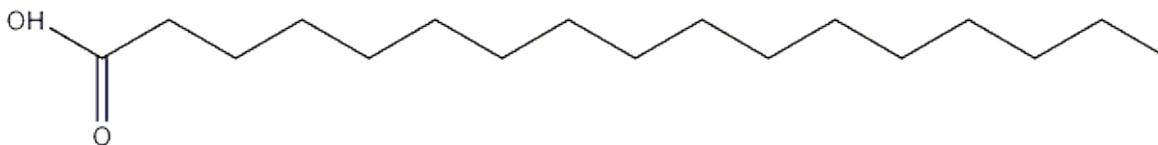
6-Isopropenil-4,8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-naftalen-2-ol



(7R*8R)-Biciclo(5,3,1)undec-1-en-8-ol,7-metil-4-(1-metiletilideno)

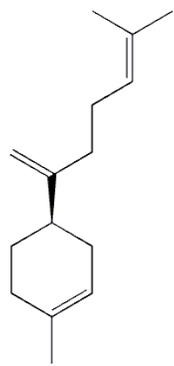


Apiol

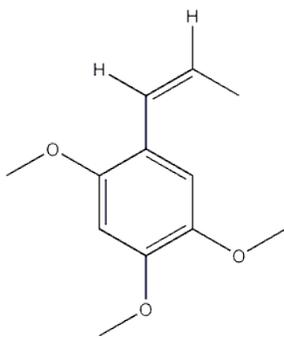


Ácido *n*-hexadecánico

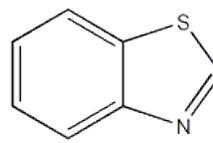
Figura 23. Estructuras químicas de algunos compuestos identificados en extractos de *L. porteri* y *P. crispum*.



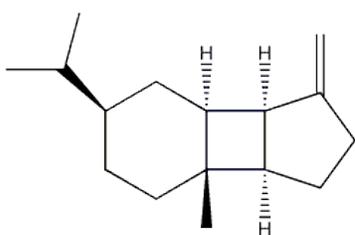
β -Bisaboleno



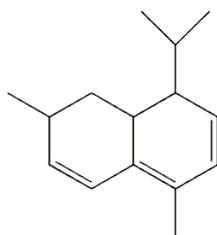
Asarona



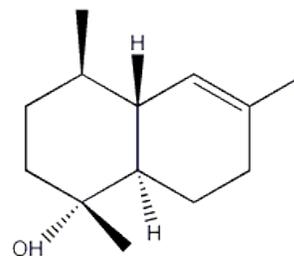
Benzotiazol



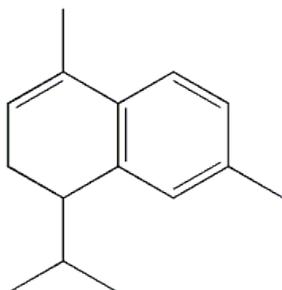
α -Bourboneno



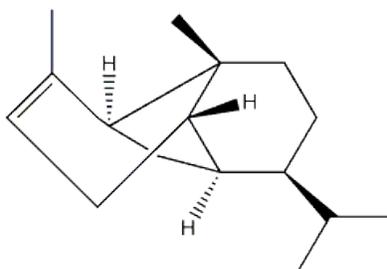
Cadala-1(10),3,8-trieno



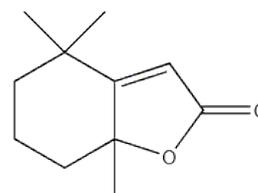
α -Cadinol



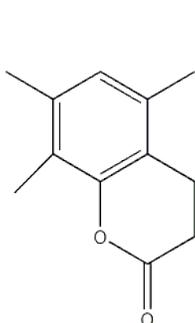
α -Calacoreno



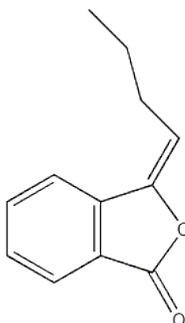
Copaeno



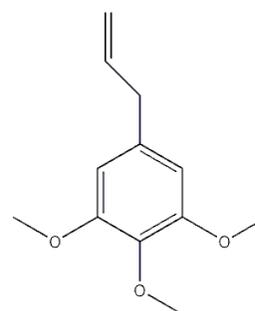
Dihidroactinidiólida



5,7,8-Trimetil-dihidrocumarina

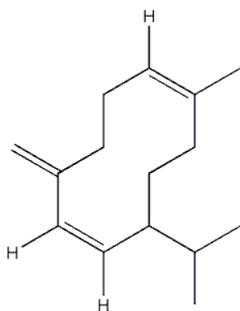


E-butilideneftálida

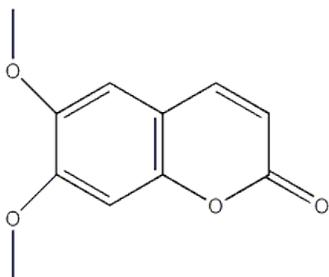


Elemicina

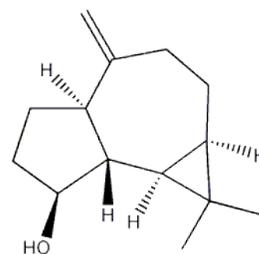
Figura 23. Continuación.



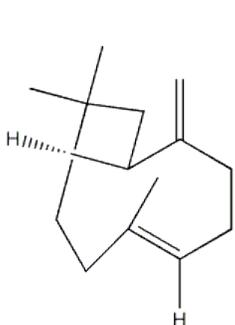
Germacreno D



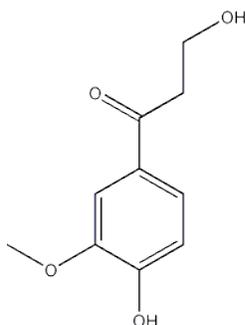
Escoparona



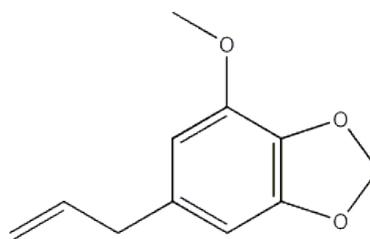
α-Espatulenol



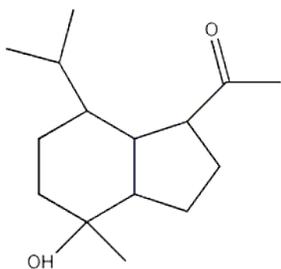
Cariofileno



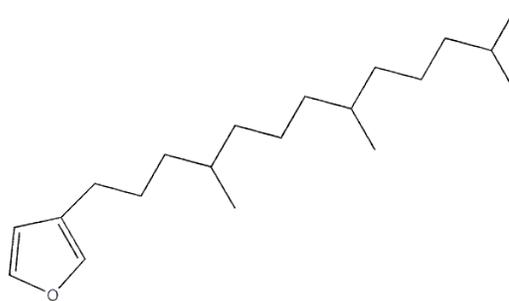
β-Hidroxipropiovanillona



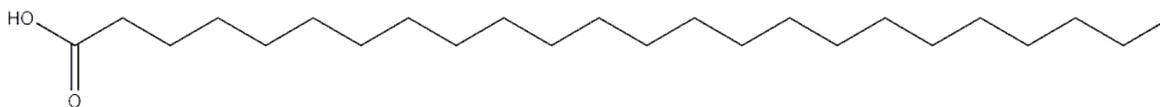
Miristicina



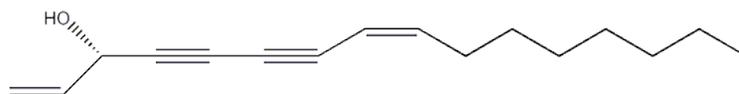
Oplopanona



3-(4,8,12-Trimetiltridecil) furano

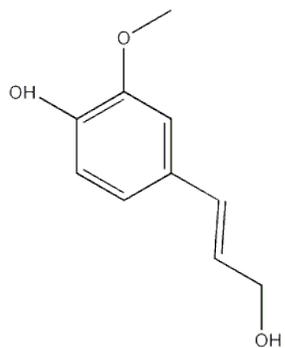


Ácido tetracosanóico

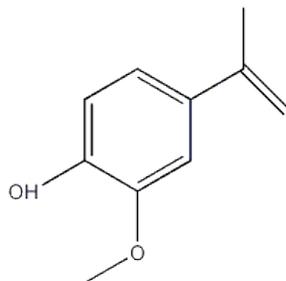


Falcarinol

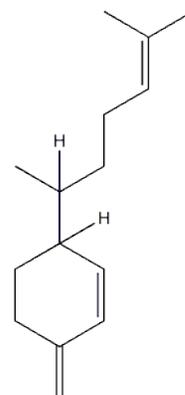
Figura 23. Continuación.



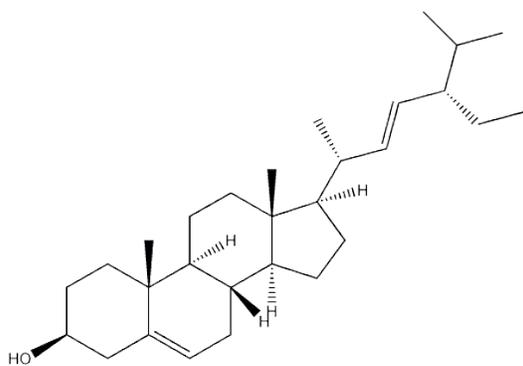
Coniferol



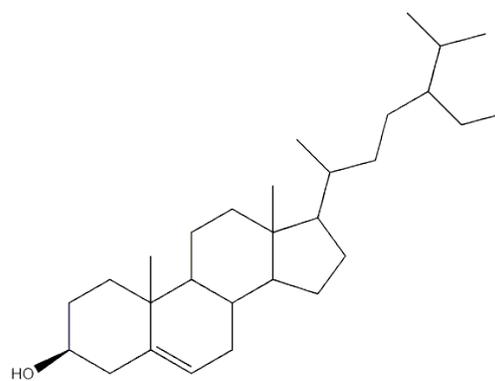
Vanillina



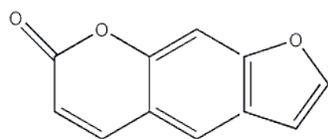
β -Felandreno



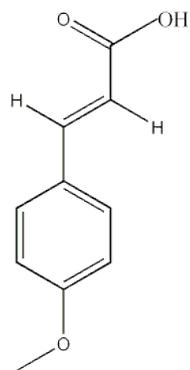
Estigmasterol



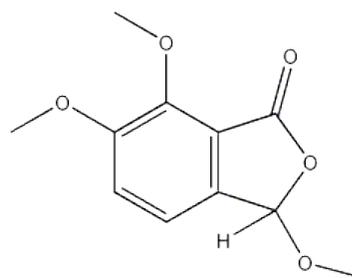
β -Sitosterol



Psoraleno

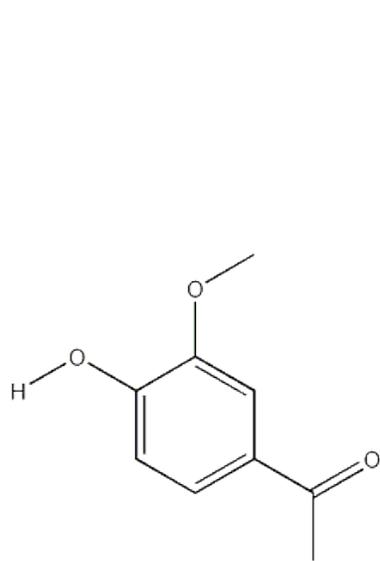


4-Metoxicinamato

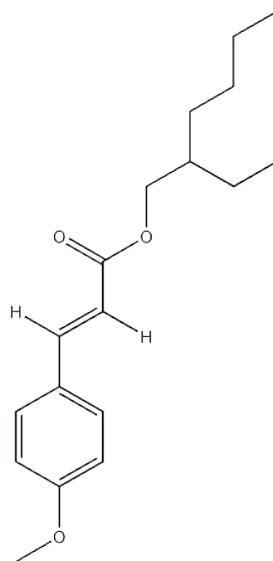


3,6,7-trimetoxy-isobenzofuran-13(H)-ona

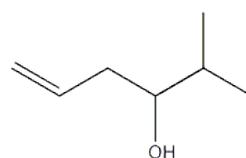
Figura 23. Continuación.



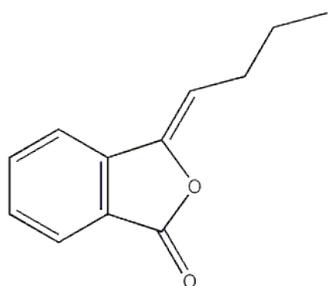
Acetovanillona



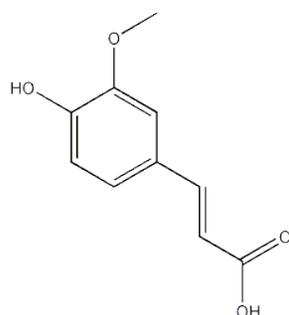
Escalol



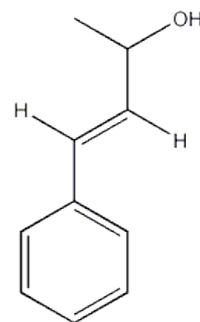
2-Metil-5-hexen-3-ol



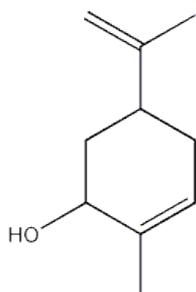
3-Butilideneftálida



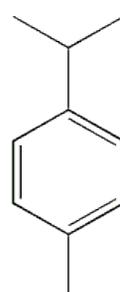
Ácido ferúlico



Alcohol metil cinámico



Carveol



***p*-Cimeno**

Figura 23. Continuación.

Pruebas preliminares de Ligusticum porteri

Viabilidad de semillas

La técnica de tinción con tetrazolio (TTZ) reveló que sólo el 50% de las semillas de los lotes 1 y 2 eran viables. En el lote 3 hubo 80% de viabilidad, en el lote 4 solo 60% y en el lote 5 un 100% de viabilidad. En el caso de las semillas no viables, las semillas no tenían embrión o el embrión no estaba teñido y el endospermo si lo estaba o ninguno de los dos estaba teñido (Figura 24).

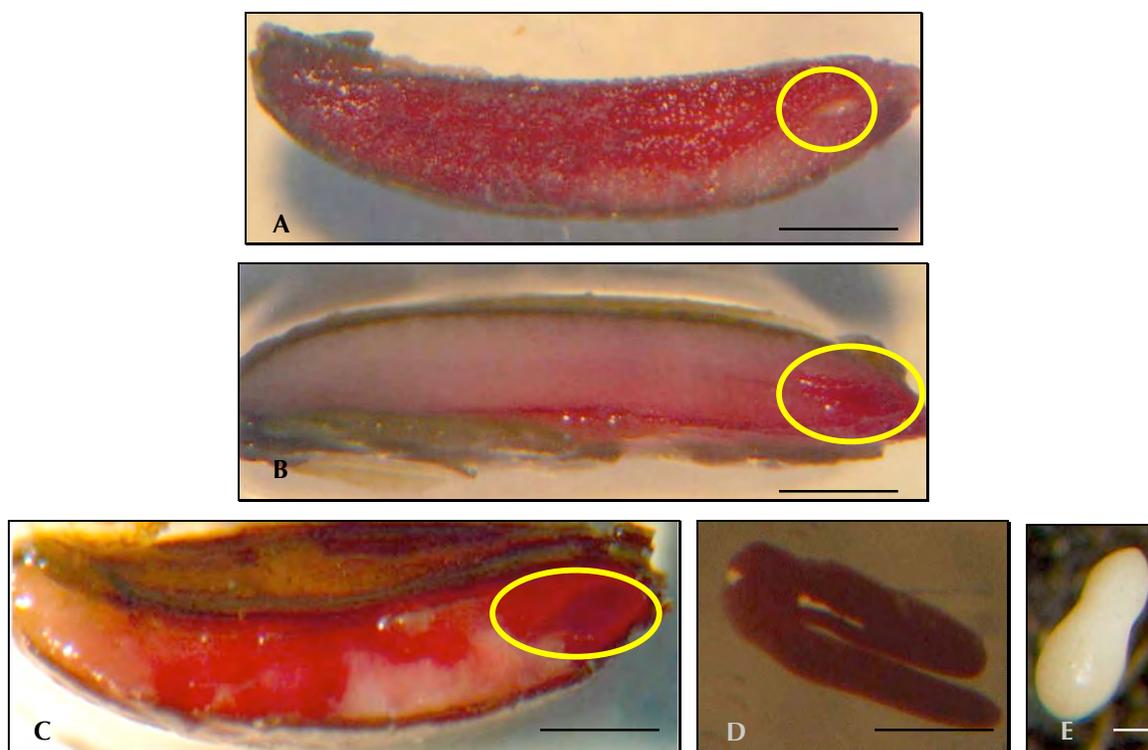


Figura 24. Prueba de viabilidad con TTZ. A. Embrión no viable. B. Embrión viable. C. Embrión ausente. D. Embrión viable. E. Embrión no viable. Barra: 0.1 mm.

Las semillas colocadas en una bolsa de organza en suelo de Chihuahua por un mes se contaminaron por hongos quedando inservibles (Figura 25). El crecimiento de hongos degradó por completo a las semillas, por lo que este método para inducir la germinación quedó descartado.



Figura 25. Semillas de *L. porteri* almacenadas un mes en organza.

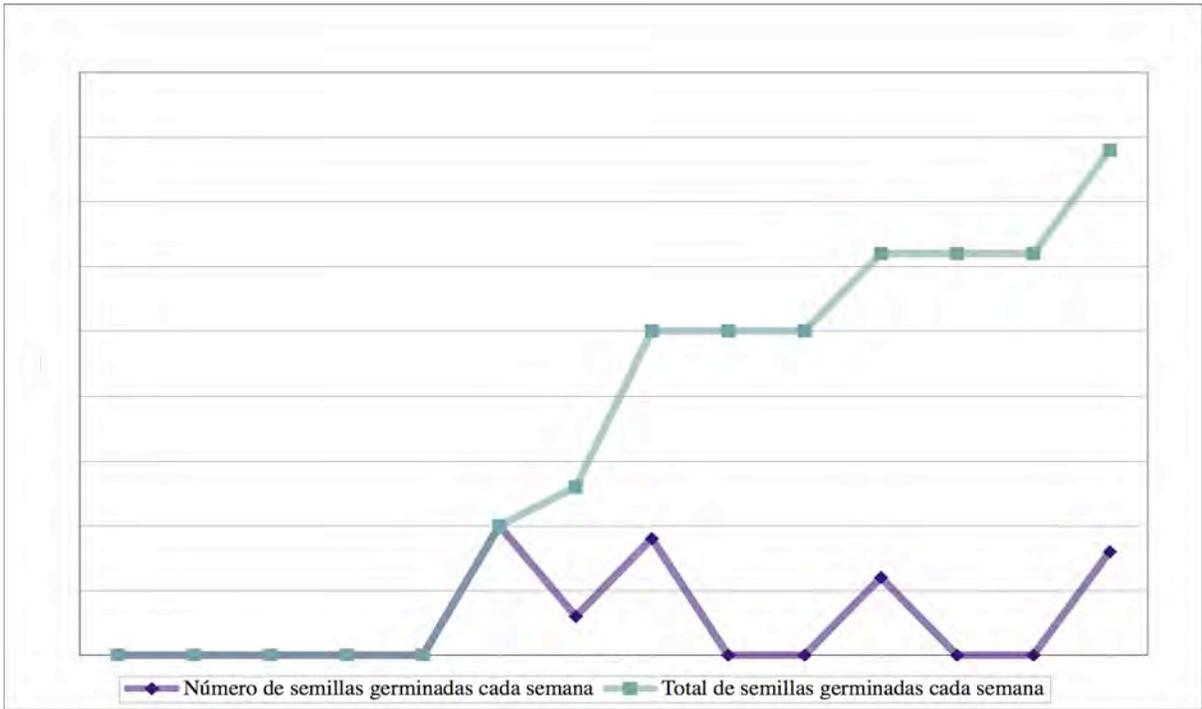
Germinación in vitro

Las semillas del lote 1 germinadas *in vitro* en medio MS-50 suplementado con GA₃ (2 mg/L) tuvieron un porcentaje menor al 5%, por lo que este lote quedó descartado para experimentos posteriores.

El porcentaje de germinación (MS-50 GA₃ 2 mg/L) del lote 2 fue de 5.5%, de un total de 181 semillas sembradas, solo 10 germinaron a las 6 semanas de incubación. En la siguiente semana germinaron 3 semillas; al término de la semana 9 habían germinado 9 semillas; en la semana 10 germinaron 6 semillas y en la semana 13 germinaron 8 semillas más (Gráfica 7). Estos resultados se correlacionan con el bajo porcentaje de viabilidad de las semillas obtenido con la tinción con TTZ.

Al subcultivar las plántulas de los frascos de 9.5 cm de altura a frascos de 13 cm de altura con medio MS-50 sin GA₃ comenzaron a elongarse rápidamente. Esto pudo deberse al cambio de la atmósfera dentro del frasco (Figura 26). Cuando algún cultivo está sometido a algún tipo de estrés, la tasa de biosíntesis del etileno aumenta y se acumula en el ambiente (George, 1993), por lo que es posible que ésta sea la causa de que las plántulas tenga un desarrollo lento y alterado.

Las semillas del lote 2 del tratamiento de imbibición por 24 h en GA₃ (5 mg/L) dieron resultados muy bajos, sólo germinó un 2% de las semillas. El resto de los tratamientos de imbibición por 24 h y 48 h en GA₃ (10 mg/L) para inducir la germinación no dieron resultados. Cabe mencionar, que el 0.5% de las semillas sometidas a estos tratamientos dieron lugar a callo en lugar de una radícula.



Gráfica 7. Tasa de germinación *in vitro* de semillas de *L. porteri*.

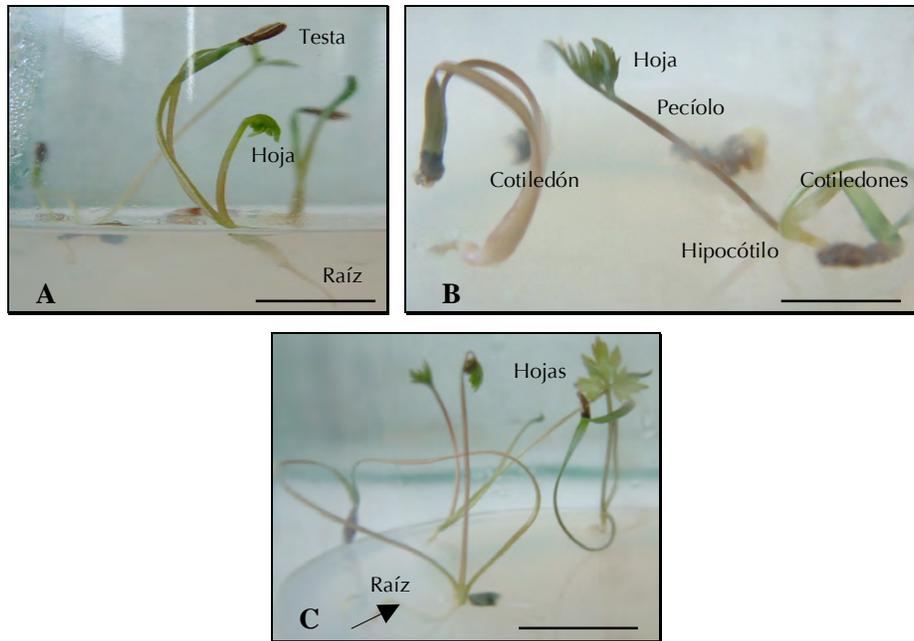
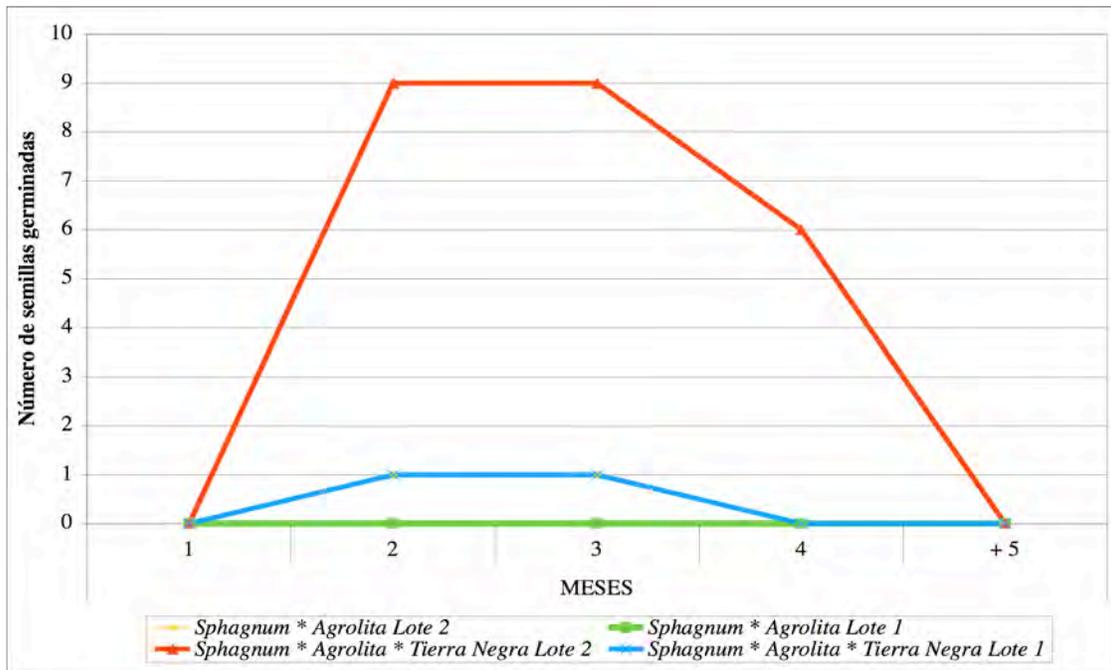


Figura 26. Plántulas de *L. porteri* germinadas *in vitro* en medio MS-100. **A.** Plántulas de 5 semanas de edad de 6 cm de altura a partir del tallo con cotiledones largos de color verde oscuro y pecíolo color amarillo y algunas con hoja de color verde oscuro sin expandir. **B.** Plántulas de 5 semanas de edad de 6-8 cm de altura a partir del tallo con cotiledones de color verde oscuro y café claro, hoja verde sin expandir y pecíolo de 4 cm de largo de color café oscuro. **C.** Plántulas de 5 semanas de edad de 8-10 cm de altura con cotiledones de 8 cm de largo, de color verde oscuro, pecíolo de 6 cm de largo de color café oscuro y con hoja expandida. Barra: 2 cm.

Germinación en suelo

La germinación de los lotes de semillas 1 y 2 en las mezclas de suelo fue muy baja. En la Gráfica 8 se muestran los resultados donde se muestra que las semillas del lote 1 no germinaron. Sin embargo, las semillas del lote 2 germinaron a las 4 semanas y en 2 semanas comenzaron a secarse y posteriormente murieron. Se descartó el uso de estos dos lotes para experimentos posteriores.

La germinación de semillas del lote 1 sembradas en tierra negra y tierra de hoja fue muy rápida, 7 días, sin embargo las plántulas de las mezclas de suelo se secaron y murieron.

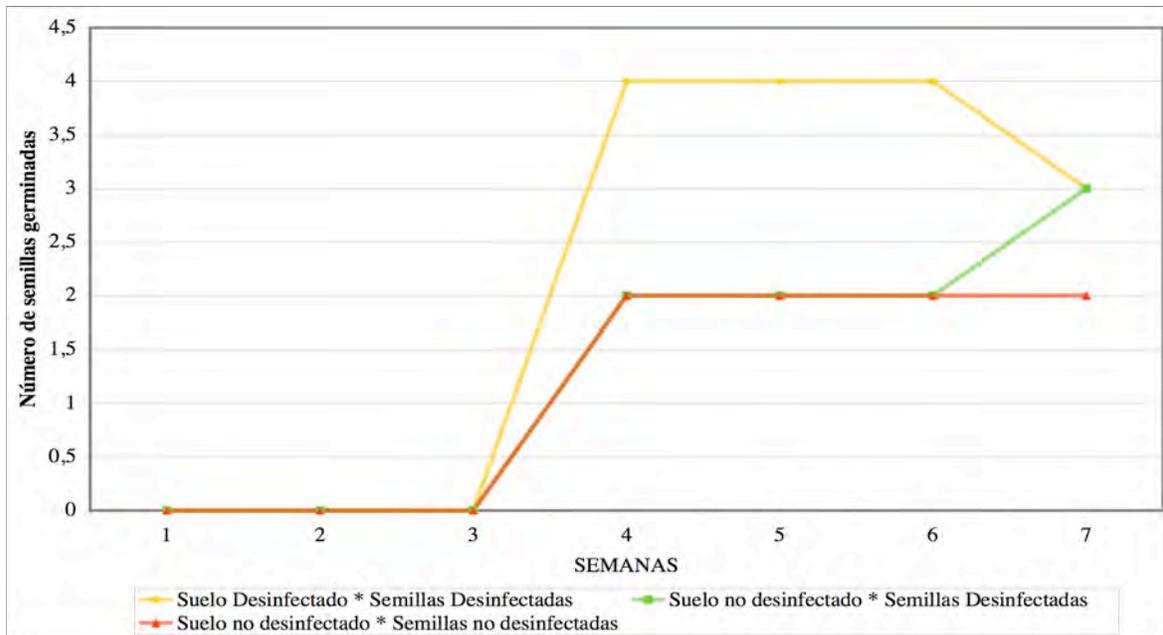


Gráfica 8. Germinación de semillas de *L. porteri* en mezclas de suelo.

La germinación de semillas en suelo de Chihuahua fue más rápida, 4 semanas, sin necesidad de utilizar GA₃ y sin estratificación para estimular la germinación (Figura 27).

Los resultados mostrados en la Gráfica 9 corresponden a las 4 y 7 semanas de incubación. Los resultados de los tratamientos con semillas desinfectadas y suelo desinfectado demostraron mejores resultados de germinación en comparación al resto de los tratamientos por lo que en el resto de la investigación se siguió utilizando este tratamiento para la germinación en suelo.

Entre las causas que propiciaron las bajas tasas de germinación estuvieron la falta de estratificación de las semillas, la edad de éstas, las condiciones de almacenamiento y principalmente la alta variabilidad fisiológica y genética de esta especie.



Gráfica 9. Germinación de semillas de *L. porteri* en suelo de Chihuahua.

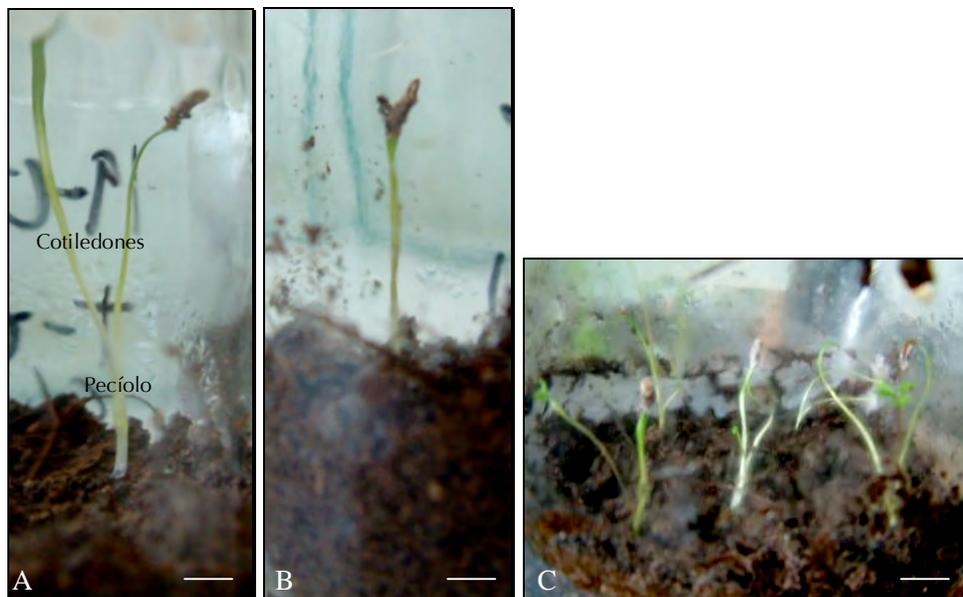


Figura 27. Plántulas de *L. porteri* germinadas *in vitro* en suelo de Chihuahua. A. Plántula de 4 semanas de edad de 6-8 cm de altura a partir del tallo con cotiledones de 4-5 cm de largo de color verde claro u oscuro y pecíolo color verde claro, sin hoja. B. Plántula de 4 semanas de edad de 3 cm de altura a partir del tallo, los cotiledones aún sin separarse y de color verde claro a oscuro. C. Plántulas de 4 semanas de edad de 6-8 cm de alto a partir del tallo, los cotiledones de 4-5 cm de largo y de color verde claro. Algunas plántulas con hoja expandida. Barra en A y B = 0.5 cm; C = 1 cm.

Inducción a callo

Para evaluar la inducción a callo, de manera preliminar se utilizaron explantes de hoja, raíz-tallo y pecíolos de plántulas de *L. porteri* de 5 meses de edad. El tratamiento con ANA (2 mg/L) y BA (1 mg/L) no indujo callo en ninguno de los explantes estudiados. Sin embargo, el tratamiento con 2,4-D (2 mg/L) con BA (1 mg/L) con explantes de hoja dio lugar al aumento de volumen, callos y también necrosis del tejido. El explante de raíz-tallo dio lugar a la formación de una hoja. Estas respuestas se observaron a las dos semanas de inducción. El resto de los explantes no fueron inducidos a callo con esta combinación hormonal (Tabla 28).

Tabla 28. Resultados de inducción a callo con distintos explantes a 50 días del inicio del cultivo.

<i>Explante</i>	ANA (2mg/L) y BA (1 mg/L)	2,4-D (2mg/L) y BA (1mg/L)
<i>Hojas</i>	-	Aumento de volumen Formación de callo Necrosis
<i>Tallos</i>	-	-
<i>Raíz</i>	-	Formación de hoja

(-) no hubo inducción

Contaminación de explantes

De un total de 289 frascos con un explante cada uno, se contaminaron 161 frascos, lo que corresponde a 55.7% de explantes contaminados, en su mayoría por hongos, por lo que se utilizaron fungicidas y bactericidas específicos para cultivos vegetales.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Hauptmann y cols (1985) y Shields y cols. (1984), utilizaron Benomilo (6.25-50 mg/L) para inhibir el crecimiento de *Penicillium* spp. en cultivos celulares en suspensión y protoplastos de *Nicotiana tabacum*, *Datura innoxia*, *Daucus carota*, *Glycine canescens* y *Solanum tuberosum*, utilizaron este fungicida de amplio espectro en la desinfección de explantes y como ingrediente en el medio sólido al igual que los antibióticos Gentamicina (20-40 mg/L) y Amoxicilina (100-500 mg/L) (Tabla 16) también reportados por Salehi y Khosh-Khui (1997) para la desinfección de *Rosa chinensis*.

El Benomilo y el Tiabendazol (Tecto 60) pertenecen al grupo de los bencimidazoles y son fungicidas de amplio espectro sistémicos, esto es, que son traslocados por el sistema vascular de la

planta desde el punto de penetración a áreas de alta transpiración como hojas en desarrollo. El movimiento acropétalo tiende a concentrar el fungicida en las puntas y márgenes de las hojas, sitios de mayor susceptibilidad por el ataque de los hongos. Inhibe la mitosis al unirse a la tubulina, de esta manera impide la división celular evitando el crecimiento y desarrollo del hongo. Es un fungicida de amplio espectro para el control de Ascomicetos, Deuteromicetos y Basidiomicetos (McCarroll *et al.*, 2002).

La amoxicilina es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina. Se trata de una amino penicilina. Actúa contra un amplio espectro de microorganismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos. Como las demás penicilinas, la amoxicilina impide en las bacterias la correcta formación de las paredes celulares. Concretamente inhibe la conexión entre las cadenas lineales de peptidoglicanos que forman la mayor parte de las paredes de los microorganismos Gram-positivos. Al impedir que la pared celular se construya correctamente, la amoxicilina ocasiona, en último término, la lisis de la bacteria y su muerte (Madigan *et al.*, 2004).

La gentamicina es un bactericida de espectro limitado a Gram-negativos. Debe alcanzar el citoplasma bacteriano para poder ejercer su acción a nivel ribosomal. Pasa la membrana externa a través de porinas por un proceso pasivo y no dependiente de energía. Se une a la subunidad 30S a nivel de las proteínas S12, S3, S4, S5, bloqueando el inicio de la síntesis proteica al fijar el complejo 30S-50S al codón de inicio del ARN mensajero acumulándose como complejos de inicio anormales impidiendo la elongación ocasiona la terminación prematura e induce la síntesis de proteínas anormales en la bacteria. Las proteínas anormales se insertan en la membrana alterando la permeabilidad y favoreciendo el ingreso de más antibiótico (Barranco, 1998; Madigan *et al.*, 2004).

Además de incluir estos antimicrobianos en el medio de cultivo, se observó que la desinfección previa de los explantes con NaOCl (10 ml/20 ml ADE) logró mejores resultados que los procedimientos con éstos antes de la siembra. El mejor tratamiento fue el 13, que incluye bactericidas, fungicidas y PPM, en el cual no hubo ningún tipo de contaminación, seguido por el 9 que incluye a los fungicidas (Tabla 16). Sin embargo, fueron muy agresivos con los explantes, se oxidaron rápidamente y murieron.

Cultivo de células en suspensión

Se seleccionaron los cultivos con callo de mayor volumen celular y que sobrevivieron a la contaminación por hongos y bacterias. En total fueron 15 callos y se sembraron en medio MS líquido al 100% de sales y sacarosa suplementado con 2,4-D (2mg/L) y BA (1mg/L). Sin embargo, estos

explantes murieron al ser transferidos al medio líquido, posiblemente por las concentraciones de sales y sacarosa, que fueron muy altas para los tejidos, por la falta de oxígeno o el cambio de un medio sólido a uno líquido de inmersión total e inclusive la agitación pudieron ser uno de los factores que tuvieron un efecto negativo sobre los cultivos celulares ensayados en este trabajo.

CONCLUSIONES

- Las mejores condiciones para la germinación de semillas de *L. porteri*, en el presente estudio, fueron un tiempo de estratificación a 1°C de 45 a 90 días, su cultivo *in vitro* en medio MS sólido al 100%, 1.5% de sacarosa, sin reguladores de crecimiento y en oscuridad, así como en una mezcla de agrolita y tierra negra (1:1).
- La adición de GA₃ en el medio MS sólido no sustituyó la falta de estratificación de las semillas de *L. porteri*.
- La germinación de las semillas de *L. porteri* fue asincrónica, muy heterogénea y altamente sensible al fotoperíodo e intensidad de luz.
- Las semillas de *P. crispum* no requirieron estratificación para lograr su germinación.
- La germinación de las semillas de *P. crispum* fue sincrónica, homogénea, insensible al fotoperíodo e intensidad de luz.
- Las semillas de *L. porteri* presentaron una contaminación fúngica muy frecuente.
- El método 14 (Tabla 16) demostró ser el mejor sistema de desinfección superficial para las semillas de *L. porteri*.
- El método 12 (Tabla 16) demostró ser el mejor sistema de desinfección superficial de los explantes de plántulas germinadas en maceta de *L. porteri*.
- Las semillas y explantes de *P. crispum* no sufrieron contaminación fúngica en ninguna etapa del cultivo.
- Los explantes de raíz, cotiledón, hoja, tallo y pecíolo de *L. porteri* y *P. crispum* mostraron un alto potencial para la inducción a callo bajo las condiciones de cultivo ensayadas.
- La combinación de reguladores de crecimiento donde se presentó el mayor número de explantes que dieron lugar a callo para *L. porteri* fue ANA/BA (1:1).
- El tipo de explante que mostró un mayor número de respuestas de inducción a callo fue la raíz de *L. porteri*.
- La combinación de reguladores de crecimiento donde se presentó el mayor número de explantes que dieron lugar a callo para *P. crispum* fueron ANA/BA (4:1) y 2,4-D/BA (4:1).
- Los explantes que presentaron un mayor número de respuestas de inducción a callo fueron la hoja y pecíolo de *P. crispum*.

- El cultivo de células en suspensión de *L. porteri* que logró aumentar la biomasa fue con medio MS líquido adicionado con 2,4-D (4 mg/L). Los explantes que mayor proliferación tuvieron fueron la hoja y la raíz.
- Los cultivos de células en suspensión de *P. crispum* con mayor proliferación fueron la raíz> hoja> cotiledón> y pecíolo en medio MS líquido adicionado con ANA/BA (4:1).
- *L. porteri* requirió de altas concentraciones de reguladores de crecimiento para lograr la formación de callo, a diferencia de *P. crispum*, que requirió menores concentraciones.
- Se logró establecer la cinética de crecimiento de los cultivos de células en suspensión de callos de los explantes de raíz, cotiledón hoja, tallo y pecíolo de *L. porteri* y *P. crispum*.
- Se lograron establecer plantas en invernadero de *L. porteri* y *P. Crispum* a partir de semillas.
- No se detectó la presencia de Z-ligustílida por CCF y CG-EM en los extractos de partes aéreas y semillas; ni en extractos de callos de raíz, semillas, cotiledón, hoja ni pecíolo de *L. porteri*.
- Se detectó la presencia de la ftálida *E*-butilideneftálida en el extracto de partes aéreas de *L. porteri*. Este es el primer reporte de su presencia en plantas recolectadas de sus poblaciones naturales.
- En el fraccionamiento del extracto de partes aéreas de *L. porteri* se identificaron por CG-EM 33 metabolitos secundarios, los cuales, no habían sido reportados para esta especie.
- En el extracto de raíz de *P. crispum* se identificaron por CG-EM 19 metabolitos secundarios, entre ellos, dos ftálidas que no habían sido reportadas para esta especie: la 3-*n*-butilftálida y 3,6,7-trimetoxi-isobenzofuran-13(H)-ona.
- En el extracto de callo de raíz de *L. porteri* se identificaron 6 componentes, dos de ellos, los fenilpropanoides 4-vinilguayacol y β -hidroxipropiovanillona. Esto indica el potencial de biosíntesis *in vitro* de esta estructura.
- En el extracto de callo de semillas de *L. porteri* se identificaron 6 componentes distintos, en su mayoría ácidos grasos.
- En el extracto de callo de cotiledón de *L. porteri* se identificó como componente único, el 4-metoxicinamato. Esto indica el potencial de biosíntesis *in vitro* de esta estructura.
- En el extracto de callo de hoja de *L. porteri* se identificaron 4 componentes distintos, uno de ellos el alcaloide cefalotaxina y el caroteno neurosporaxantina. Este es el primer reporte de la presencia de estos compuestos en *L. porteri*.

- En el extracto de callo de pecíolo de *L. porteri* se identificaron 3 componentes distintos, uno de ellos el vinilguayacol. Esto indica el potencial de biosíntesis *in vitro* de esta estructura.
- En los extractos de tallo y pecíolo de *L. porteri* se identificó la ftálica 3-butilideneftálica. Este es el primer reporte de su presencia en callos de esta especie.
- Los callos de *L. porteri* demostraron un potencial de biosíntesis *in vitro* de metabolitos secundarios.
- En el extracto de raíz de *L. porteri*, cultivada en invernadero, se identificó la ftálica 3-butilideneftálica. Este es el primer reporte de su presencia en la raíz de esta especie.
- Se detectó por CCF la presencia de *Z*-ligustílica en la raíz de plántulas de 3 meses de edad germinadas *in vitro* de *L. porteri*.
- Datos bibliográficos revelaron la presencia de *Z*-ligustílica en las raíces de *Akebia quinata*, *Geum montanum* y *Nuphar pumilum*, plantas filogenéticamente alejadas de la familia Apiaceae.
- *L. porteri* y *P. crispum* representaron un buen modelo experimental para la comparación de resultados morfogénicos y fitoquímicos entre especies silvestres y cultivadas.
- *L. porteri* demostró ser una especie silvestre altamente específica a su hábitat. En las mejores condiciones *in vitro* fue difícil mantenerla viva y en crecimiento.
- *P. crispum*, por el contrario, demostró ser una especie con una adaptación más amplia, indicando su condición de planta cultivada.

PERSPECTIVAS

Ligusticum porteri es una especie silvestre, que debido a que crece en el límite sur de su distribución geográfica en la Sierra Tarahumara en Chihuahua en México, tiene una producción alta de semillas pero la maduración de embriones es asincrónica e incluso algunos no maduran con tratamiento por frío. Si a esta situación se le añade el calentamiento global, el retraso de las lluvias en la Sierra Tarahumara, su sobrecolecta, el sobrepastoreo, la deforestación de su hábitat y el poco conocimiento que hay de esta especie, es posible que su estatus de riesgo deje de ser rara y se vuelva una especie amenazada o en peligro de extinción.

Es urgente incluir a esta especie en alguna norma oficial mexicana que regule su recolecta como la NOM-004-RECNAT-1996 en conjunto con autoridades oficiales y científicas en México y Estados Unidos, que permitan su conservación con un uso sostenible de ésta.

El uso sostenible de esta especie puede lograrse con su cultivo en invernaderos con la información generada en este trabajo, como la estratificación de las semillas, haciendo recolectas periódicas o tal vez destructivas de este material. También es necesario mantener cultivos *in vitro* de esta especie como banco de germoplasma y como recurso alternativo para la extracción del material vegetal.

Ligusticum porteri demostró ser una especie con un alto potencial biotecnológico para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios de interés comercial y farmacológico, por lo que es necesario establecer protocolos de germinación *in vitro* como *ex vitro*, la exploración de condiciones de cultivo con otros reguladores de crecimiento en distintas combinaciones, el establecimiento de cultivos en suspensión de células diferenciadas y callos y el monitoreo de los principales metabolitos secundarios en distintas etapas de crecimiento.

Debido a la falta de conocimiento sobre la biología y ecología de esta especie silvestre, es urgente realizar estudios de: el ciclo de vida de *L. porteri*, polinizadores, plagas, el papel ecológico que juega en su hábitat, dinámica de poblaciones, genéticos, biología molecular, transformación genética, sobre la germinación de sus semillas, fitoquímicos en sus distintas etapas de crecimiento, sobre la ruta de biosíntesis de las ftálicas, hasta ahora desconocida, taxonomía bioquímica y farmacológicos.

Esta especie medicinal es candidata para la elaboración de una monografía oficial donde se reconozca su uso en prescripciones médicas y el uso potencial de alguno de sus componentes en la medicina actual.

APÉNDICE I

Prueba de viabilidad con TTZ de acuerdo a Schmidt (2000)

El cloruro o bromuro de tetrazolio es una sal que se disuelve en agua antes de usarse. La sal así como la solución son sensibles a la luz por lo que deben guardarse en frascos ámbar o en oscuridad. Las soluciones deben guardarse en frío y no son reutilizables. El pH de la solución debe de estar entre 6.5 y 7.5. Se prepara una solución buffer con KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 .

- En la solución 1 se disuelven 9.078 g de KH_2PO_4 en un litro de agua.
- En la solución 2 se disuelven 9.472 g de Na_2HPO_4 o 11.876 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua.

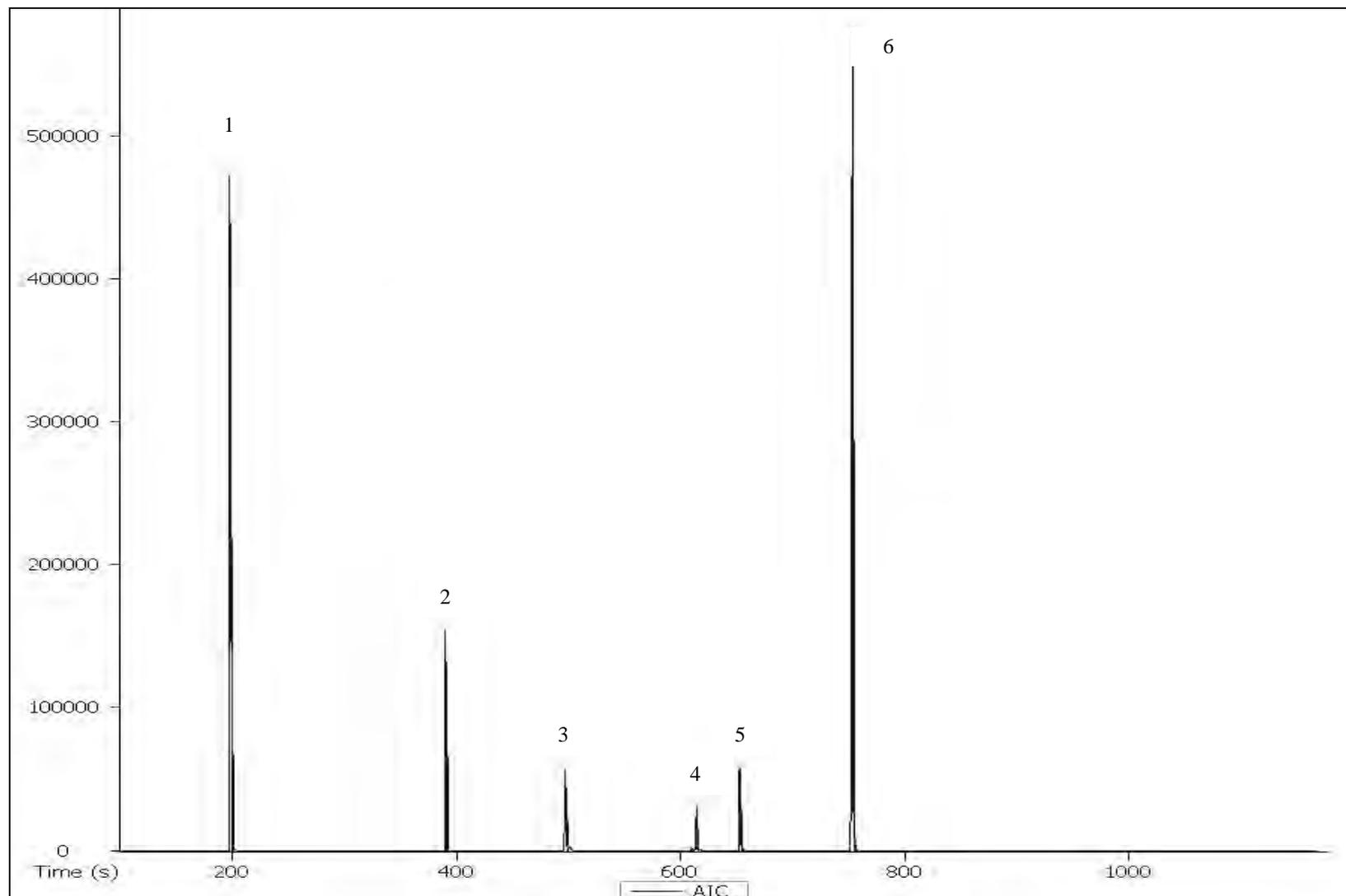
Se mezclan dos partes de la solución 1 con tres partes de la solución 2. Si la solución no es clara se añaden unas gotas de alcohol.

Para la mayoría de las especies se utiliza el 1% de la solución. Esta proporción se logra disolviendo 1 g de tetrazolio en un litro de agua. El procedimiento para evaluar la viabilidad de semillas es el siguiente:

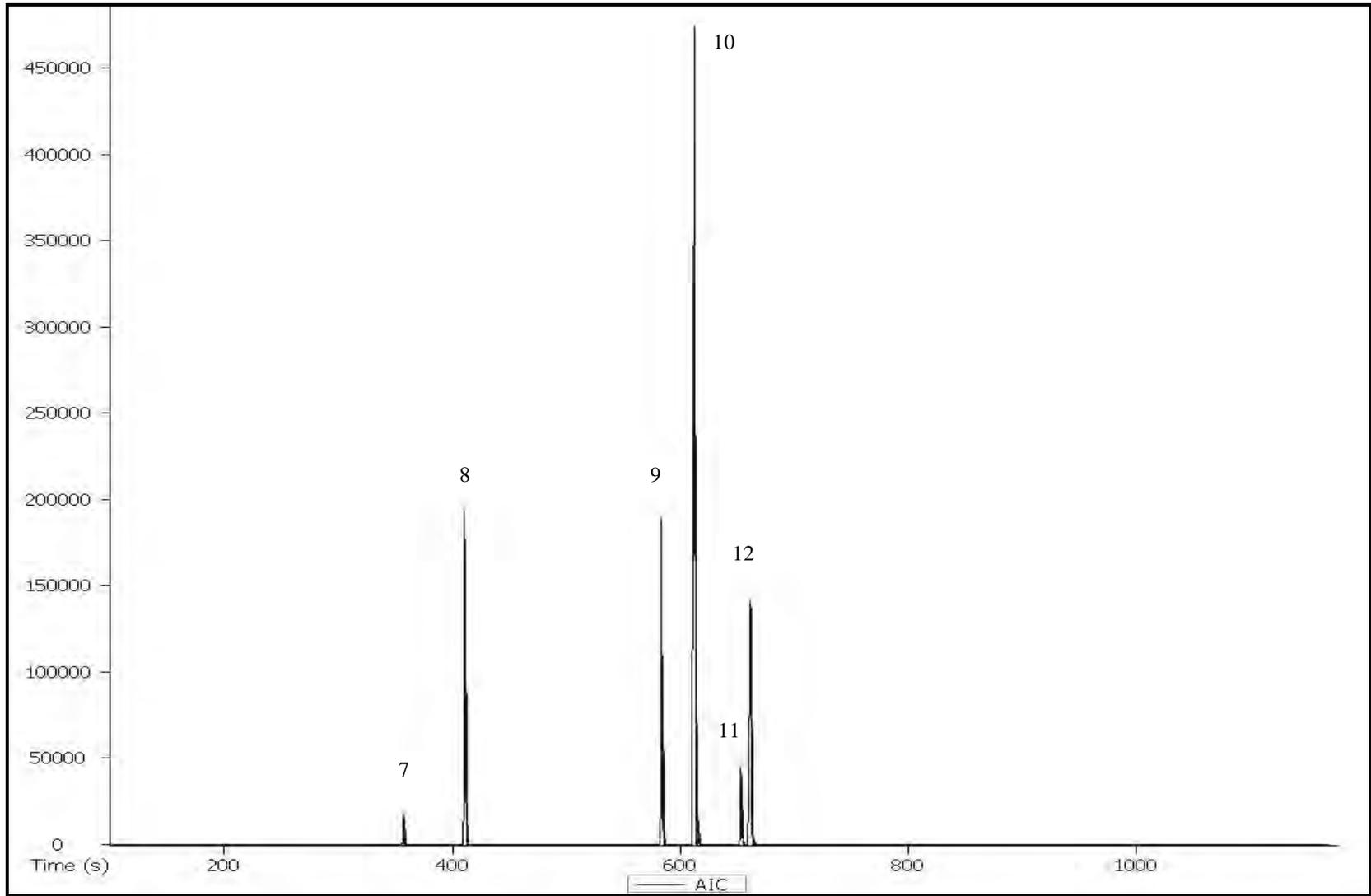
1. Las semillas deben estar escarificadas o pinchadas para que la solución pueda penetrar el tejido.
2. Las semillas deben estar previamente humedecidas a 20°C de 3 a 48 h.
3. Las semillas deben estar completamente cubiertas de la solución.
4. Las semillas se incuban en la solución en oscuridad de 30 a 35°C de 1 a 24 h.
5. Después de transcurrido ese tiempo, las semillas se enjuagan con agua destilada y deben estar húmedas para su evaluación.
6. Se evalúa el tñido bajo el microscopio.

APÉNDICE II

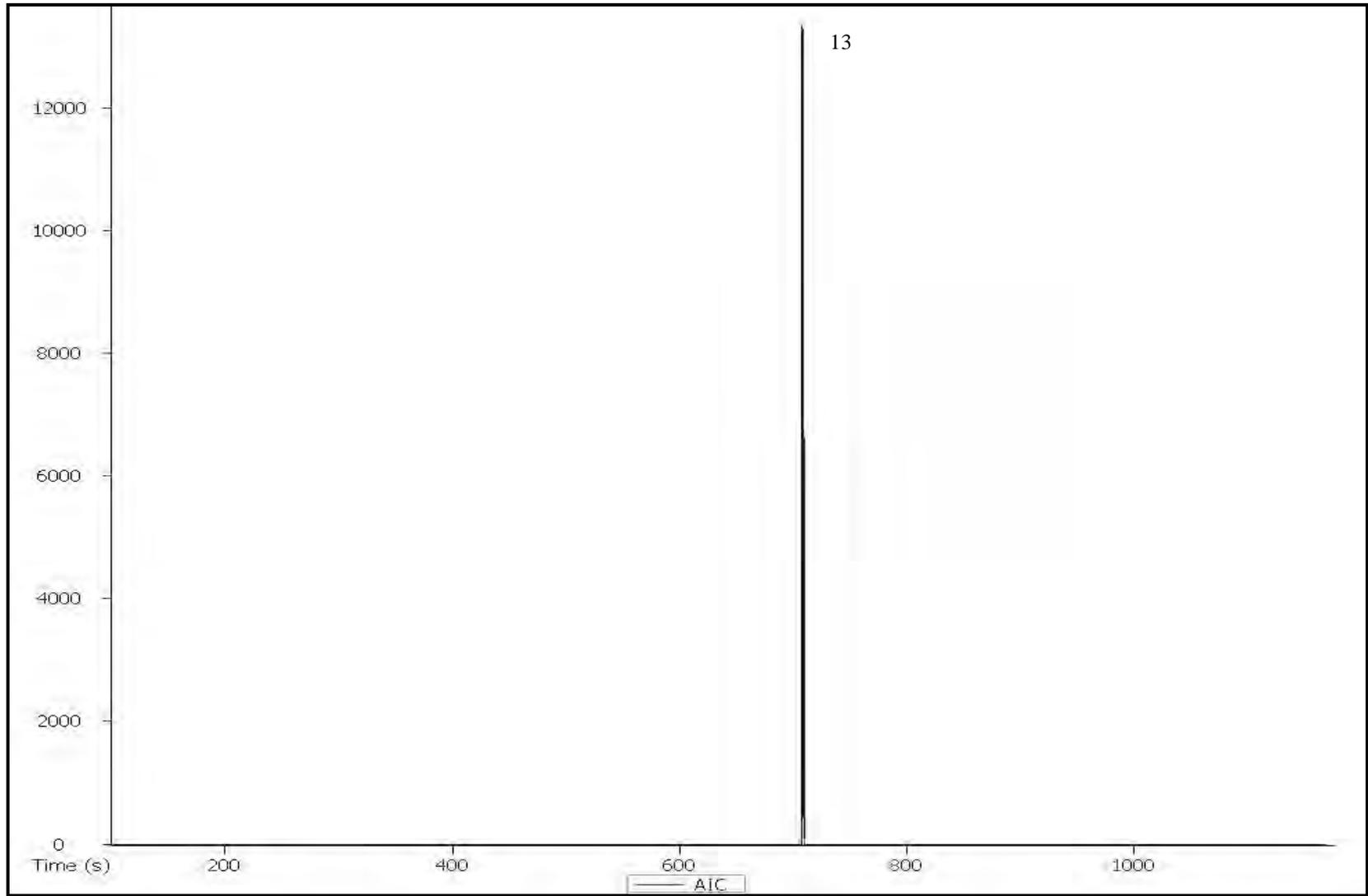
CROMATOGRAMAS



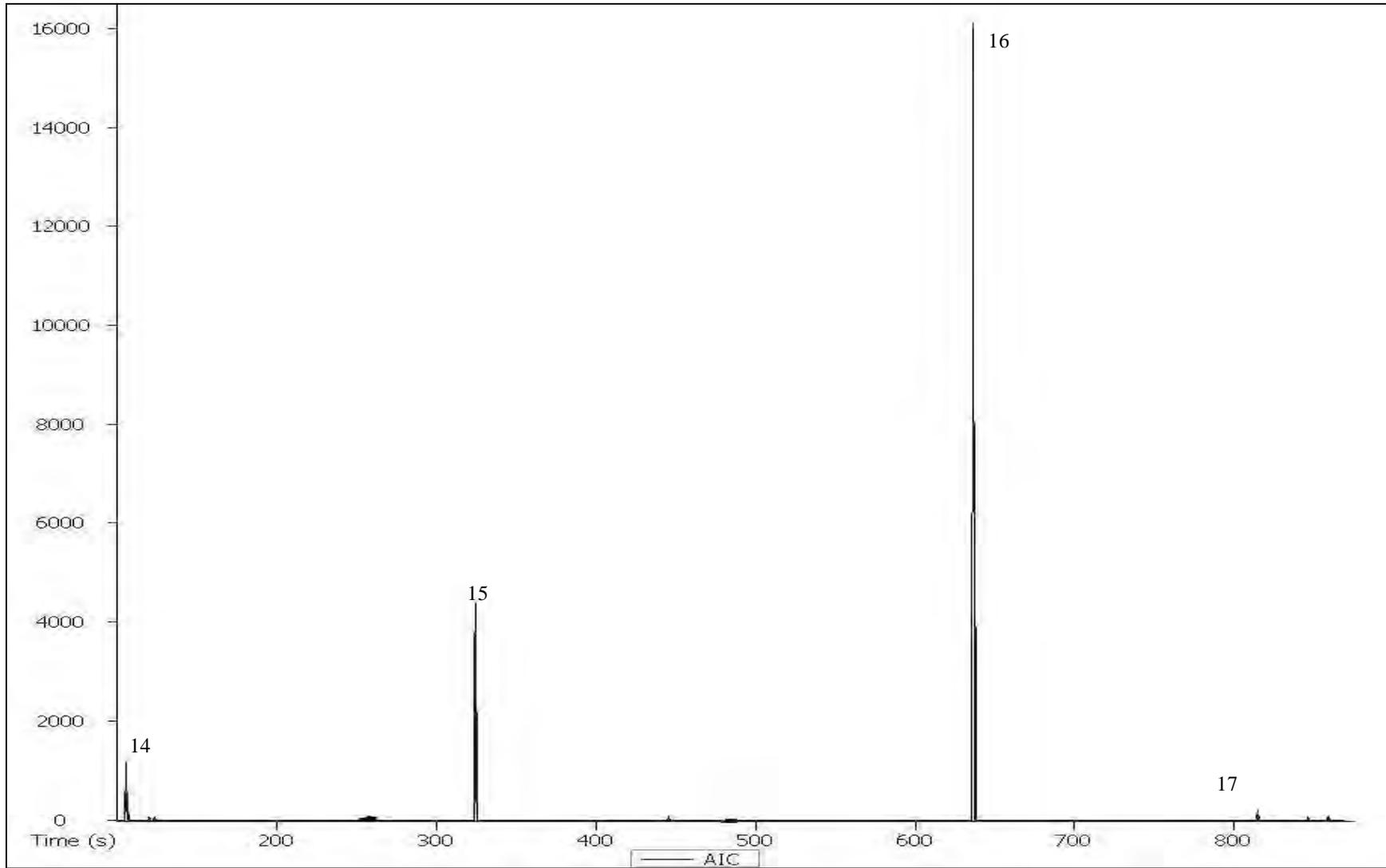
Cromatograma 1. Callo de raíz de *L. porteri*.



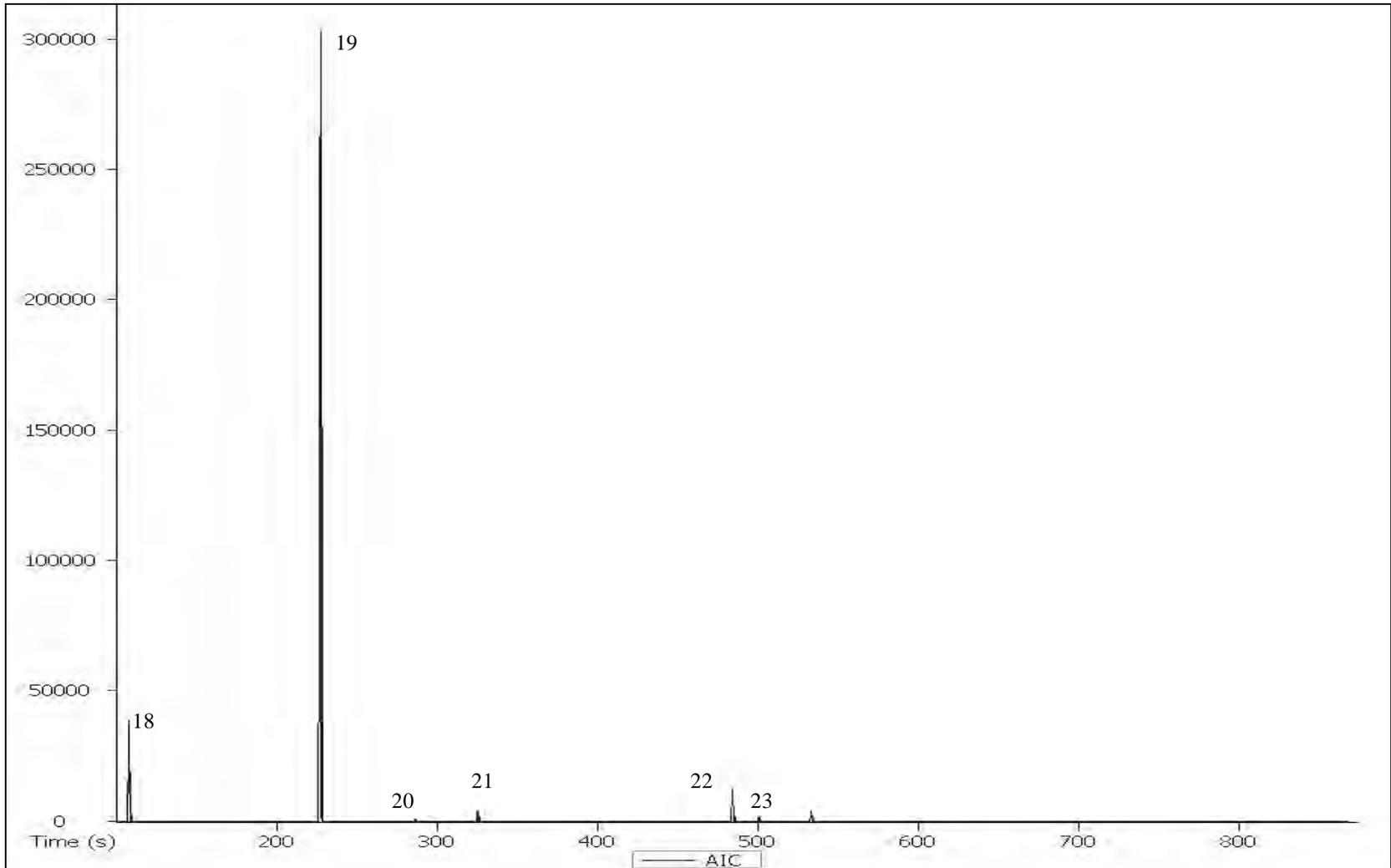
Cromatograma 2. Callo de semillas de *L. porteri*.



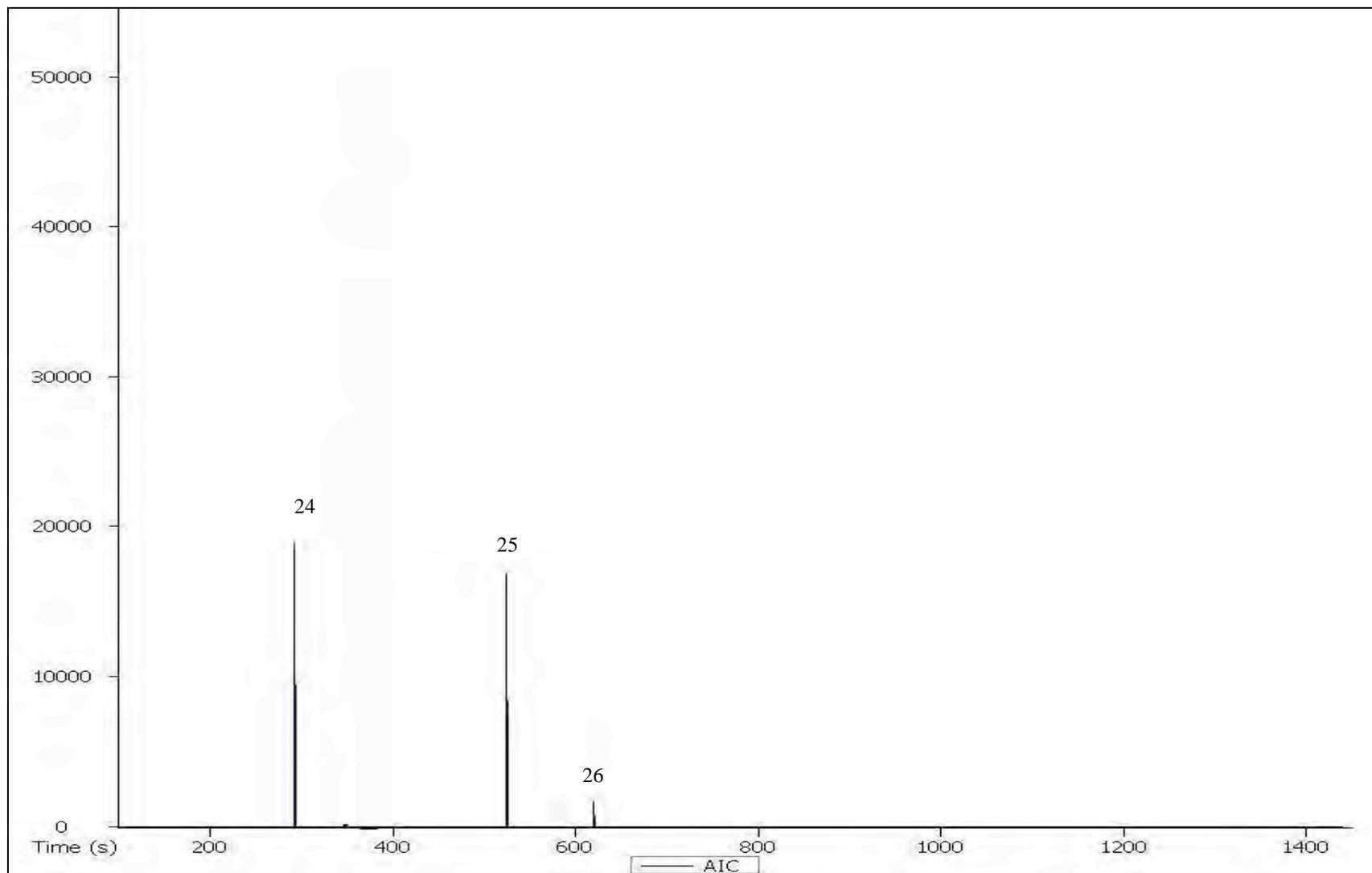
Cromatograma 3. Callo de cotiledón de *L. porteri*.



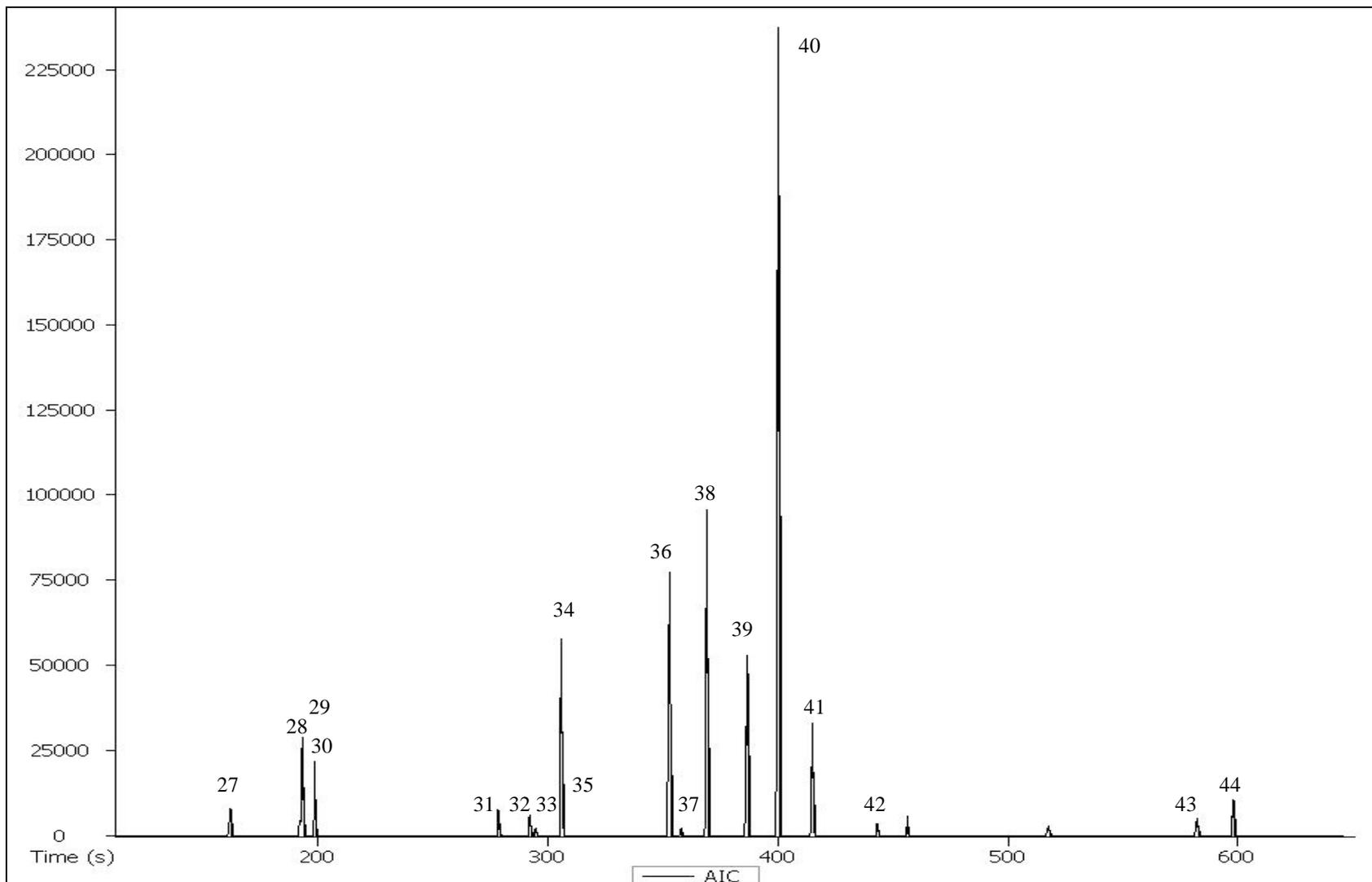
Cromatograma 4. Callo de hoja de *L. porteri*.



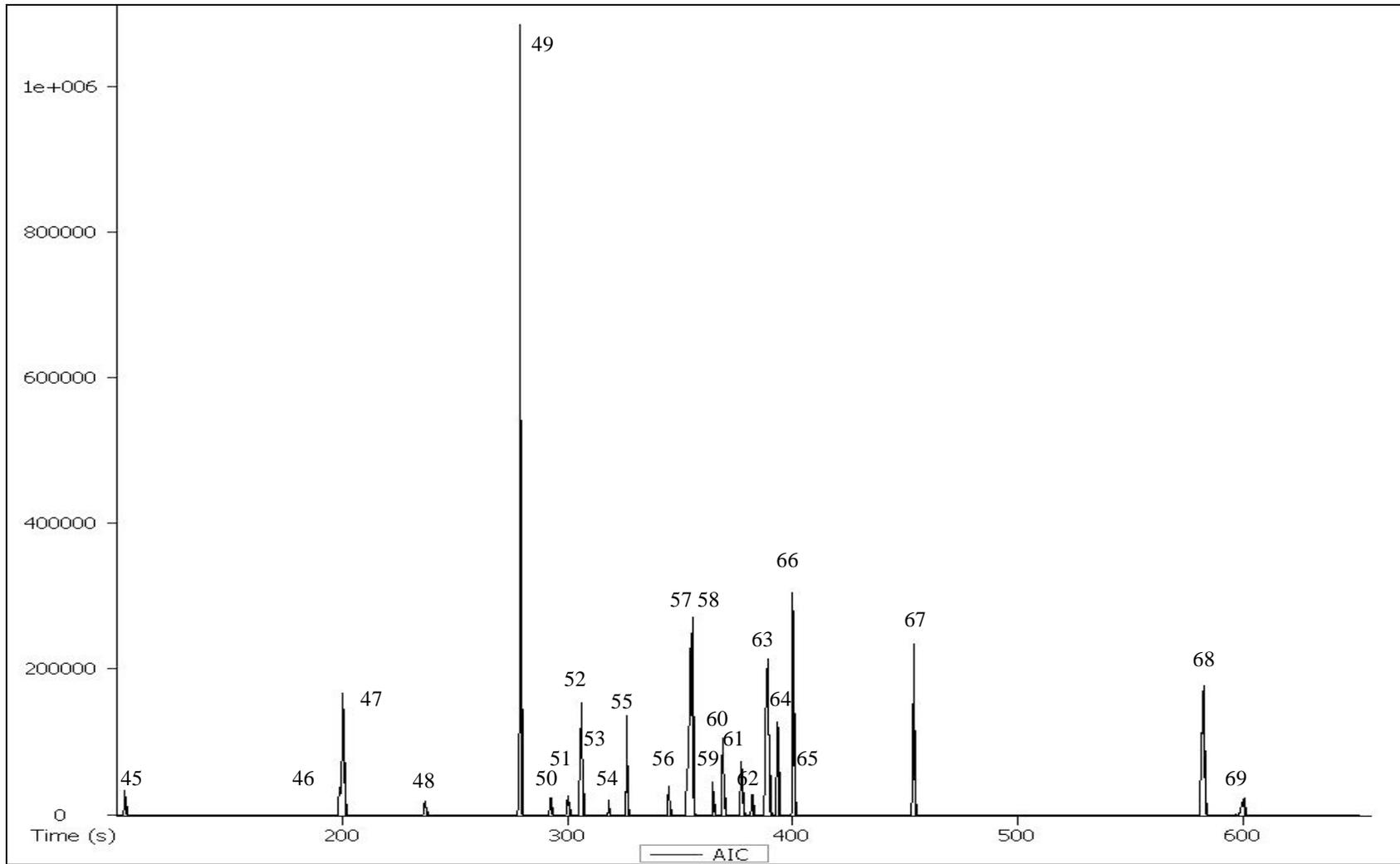
Cromatograma 5. Callo de raíz de *L. porteri*.



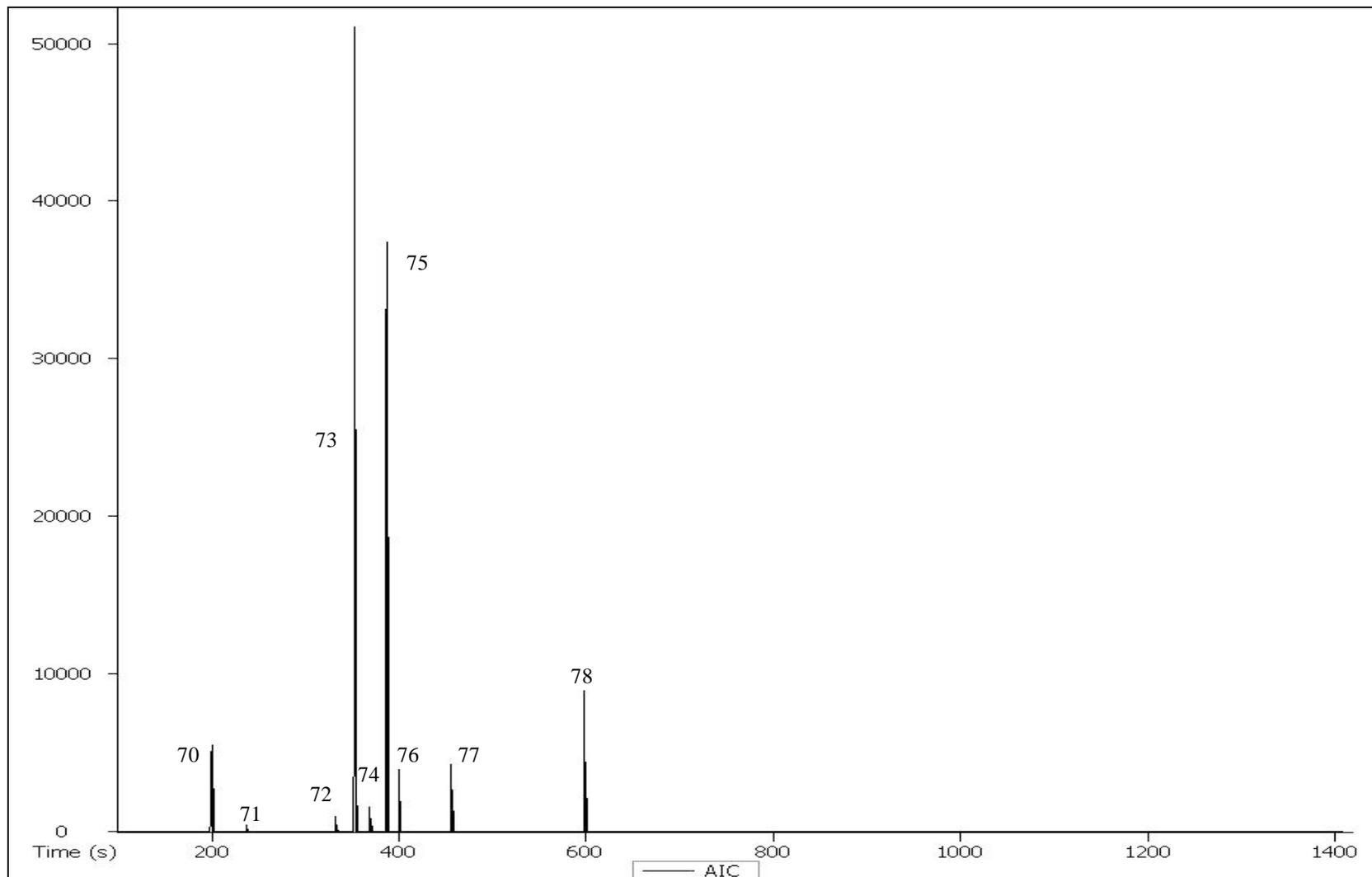
Cromatograma 6. Callo de peciolo de *L. porteri*.



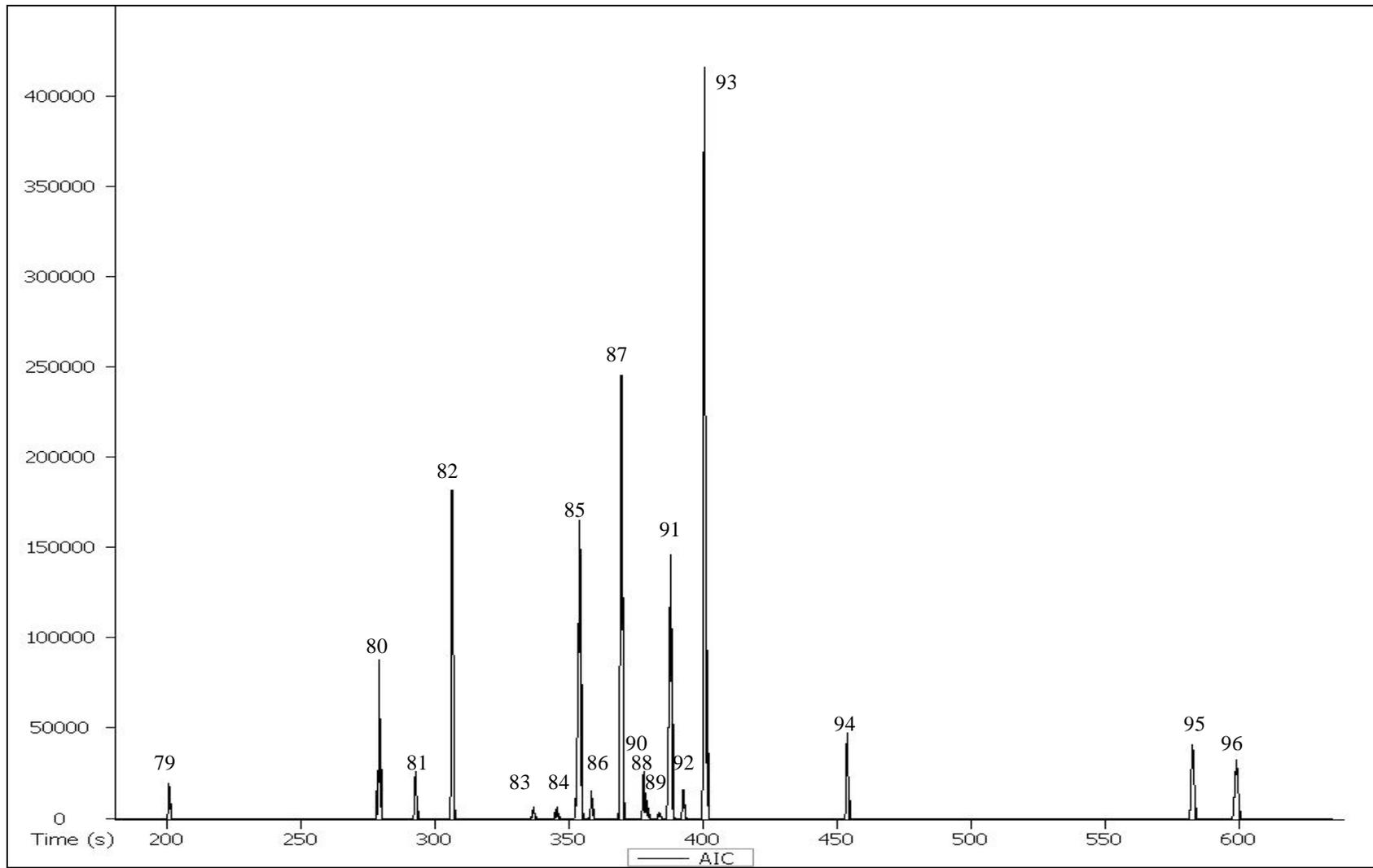
Cromatograma 7. Callo de tallo de *L. porteri*.



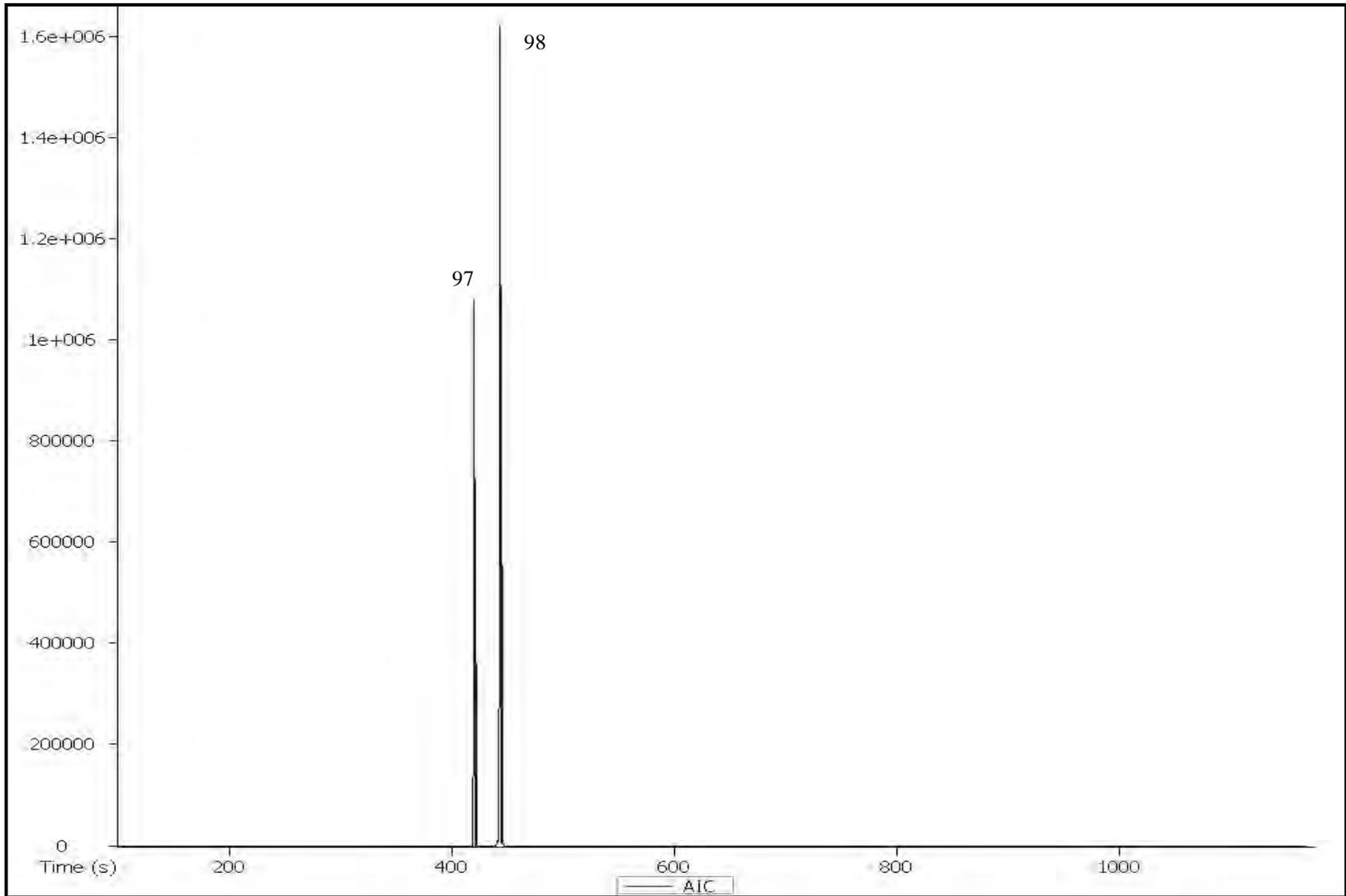
Cromatograma 8. Callo de peciolo de *L. porteri*.



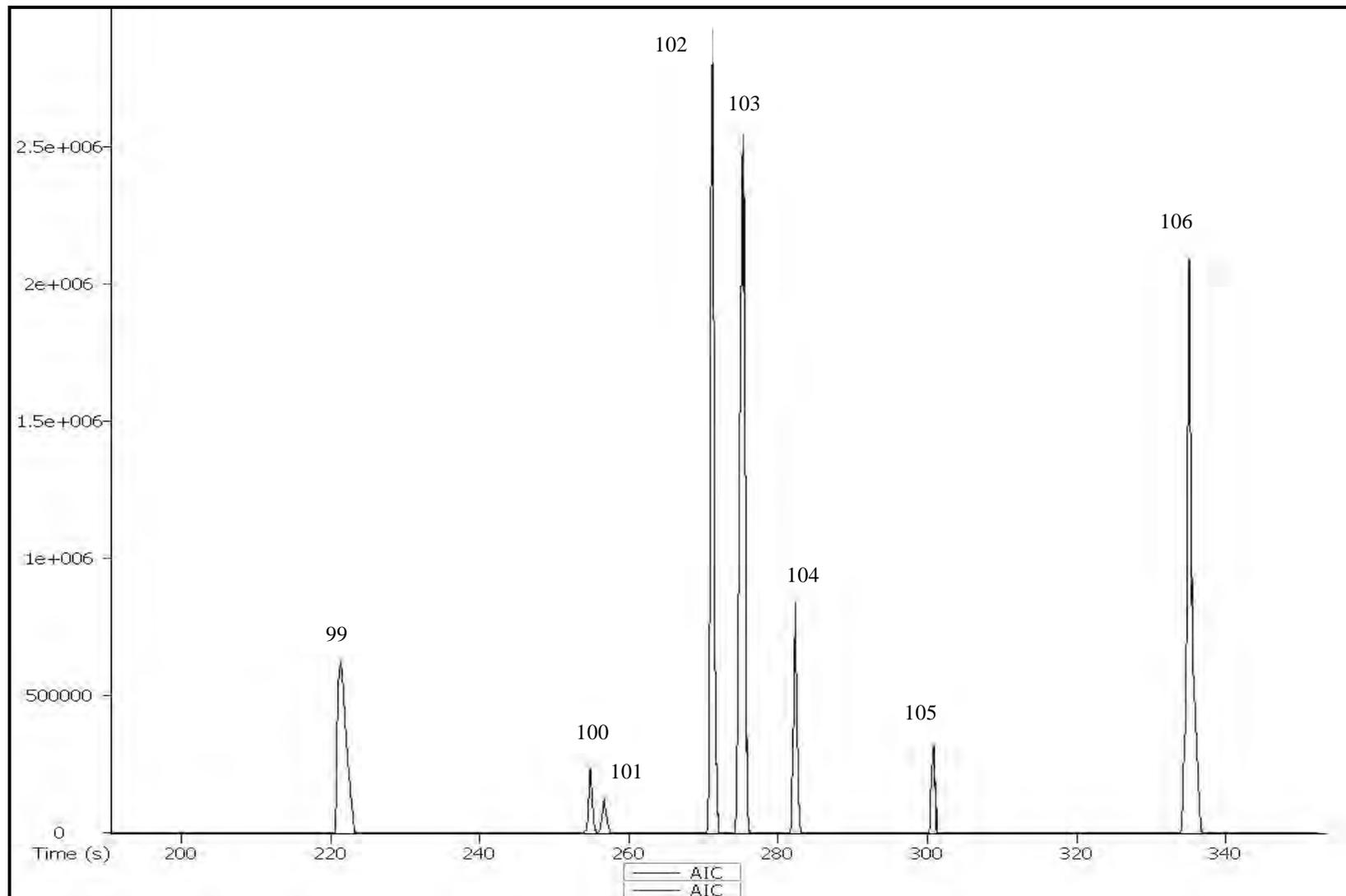
Cromatograma 9. Callo de raíz de *L. porteri*.



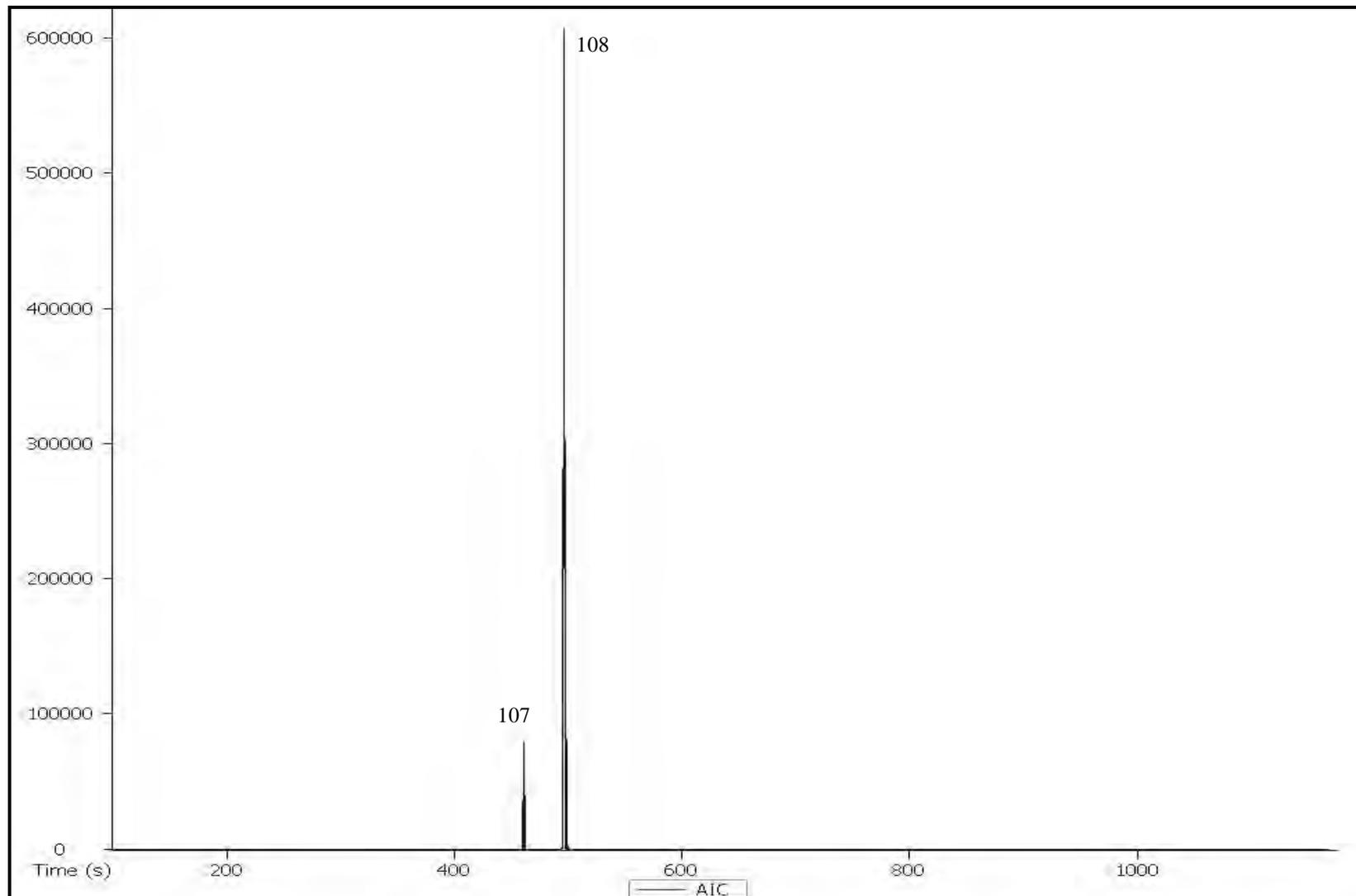
Cromatograma 10. Callo de peciolo de *L. porteri*.



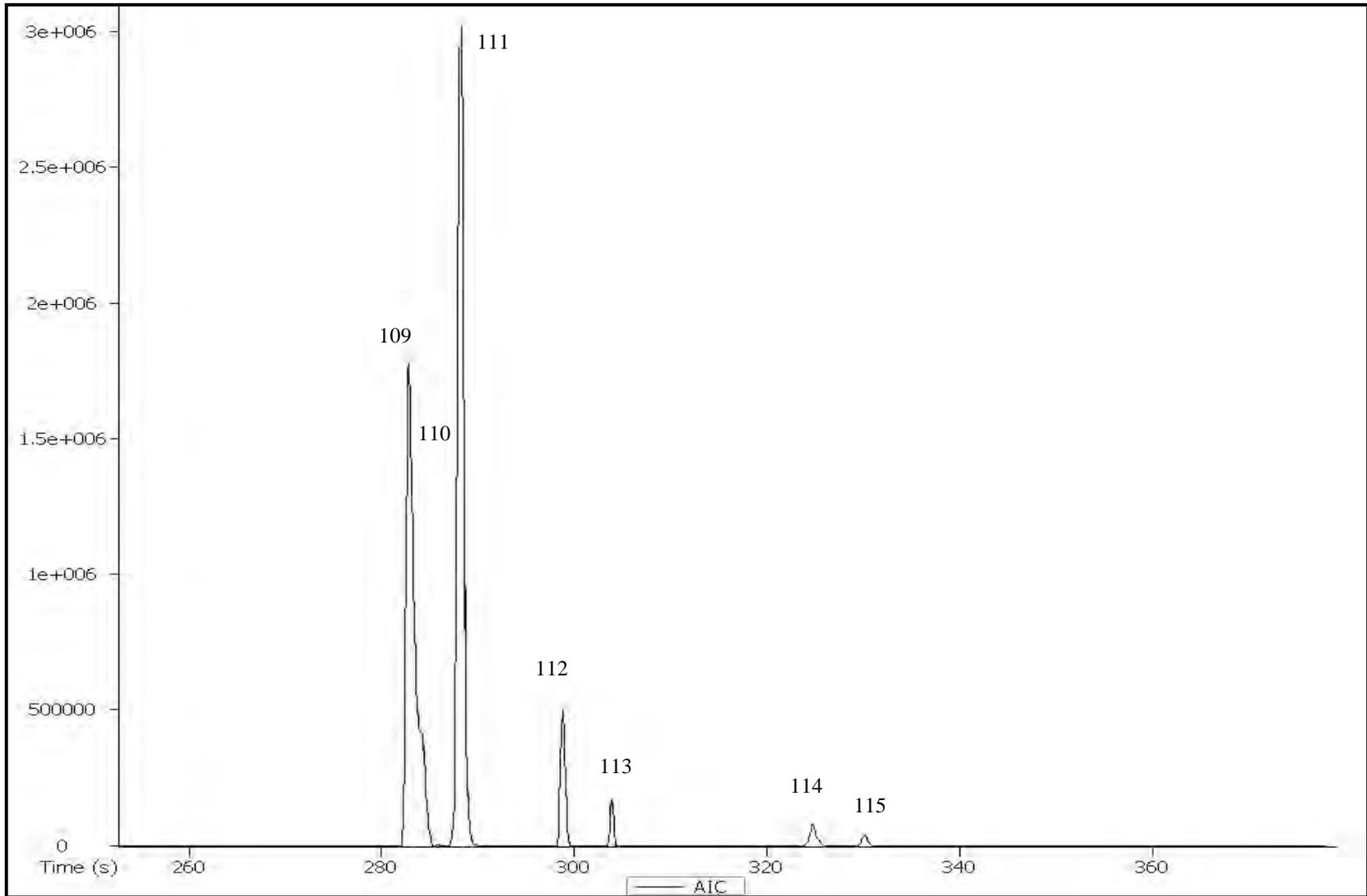
Cromatograma 11. Extracto de semillas de *L. porteri*.



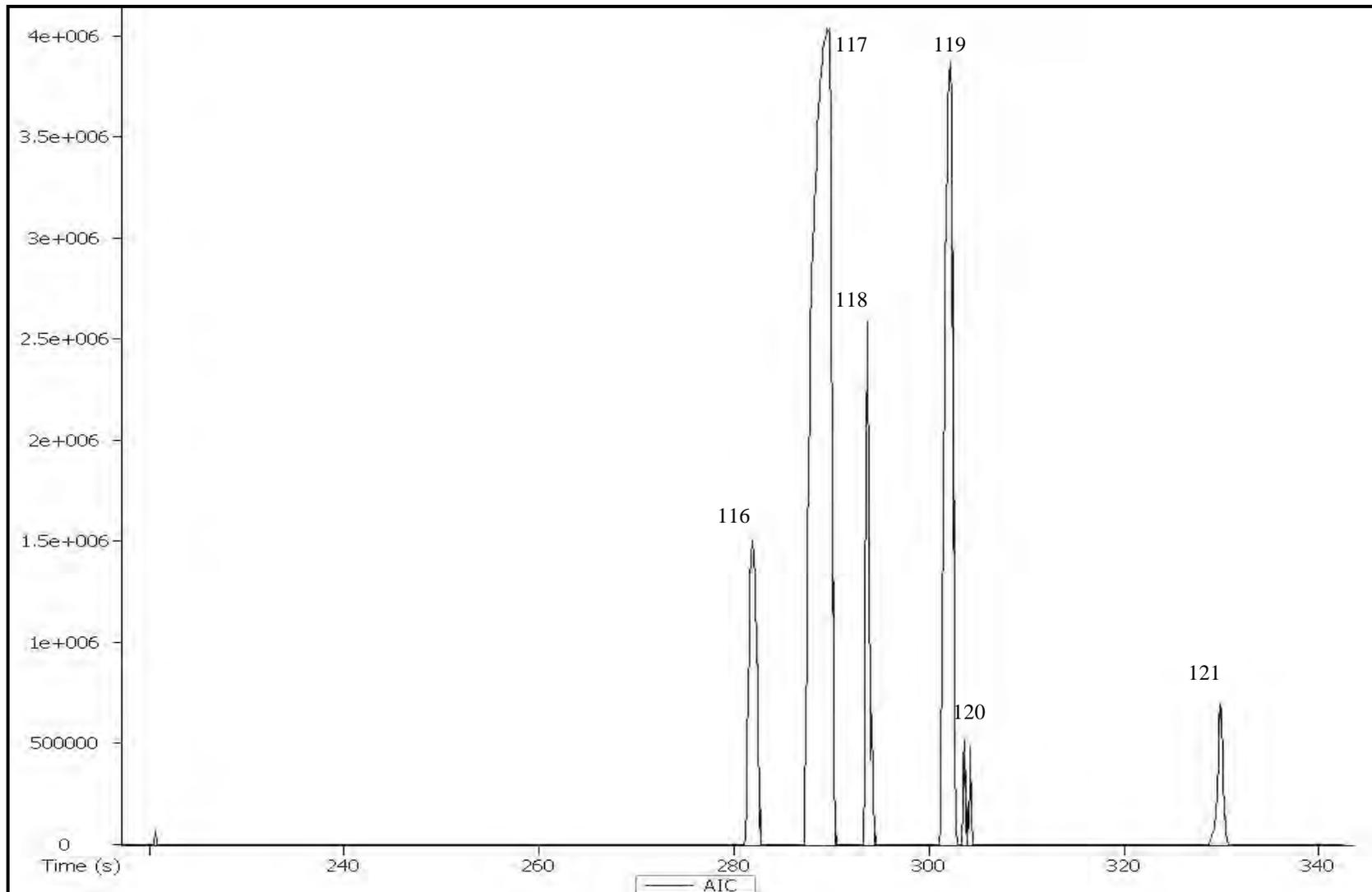
Cromatograma 12. Fracción 1 del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



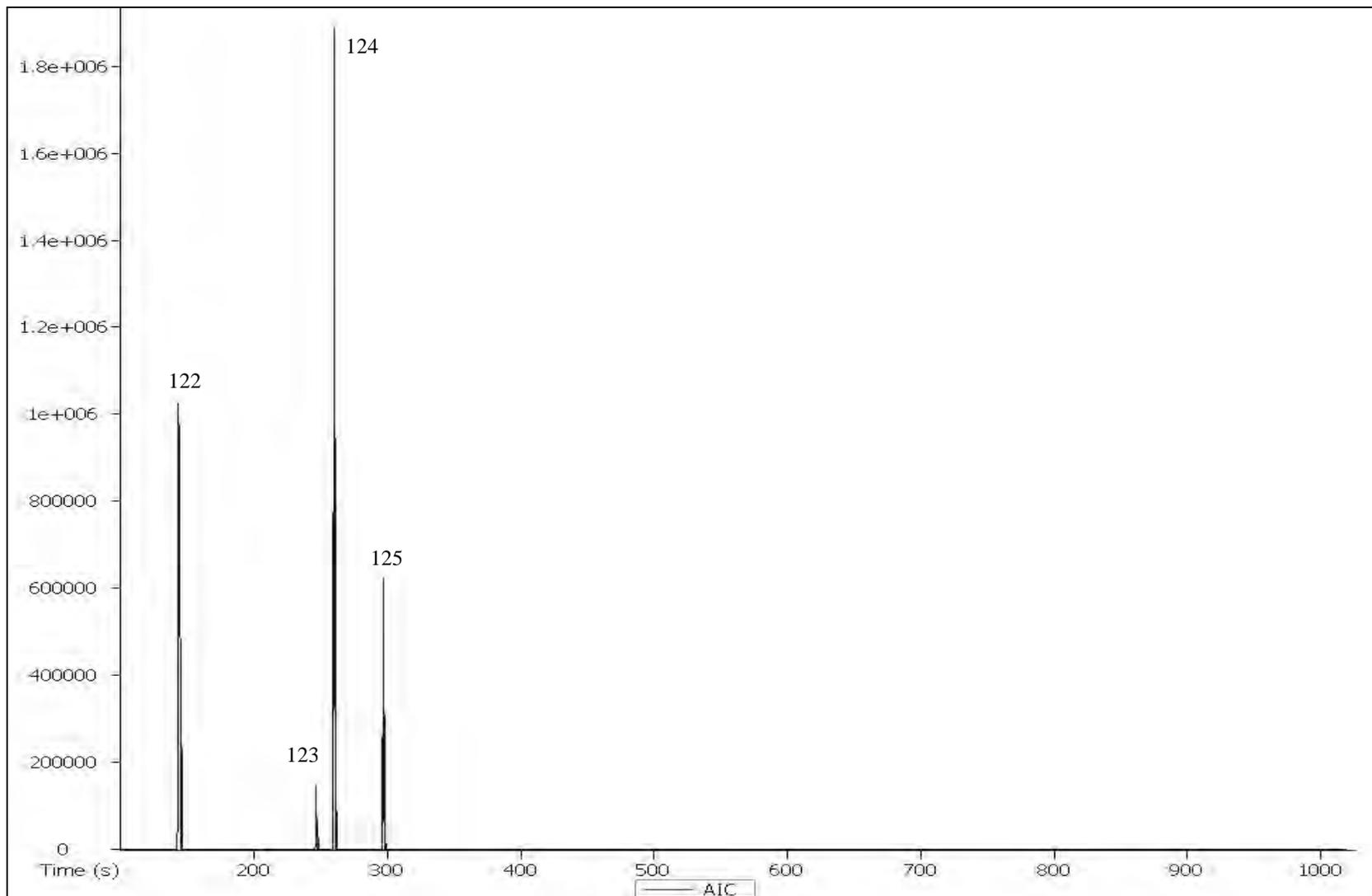
Cromatograma 13. Fracción 36 del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



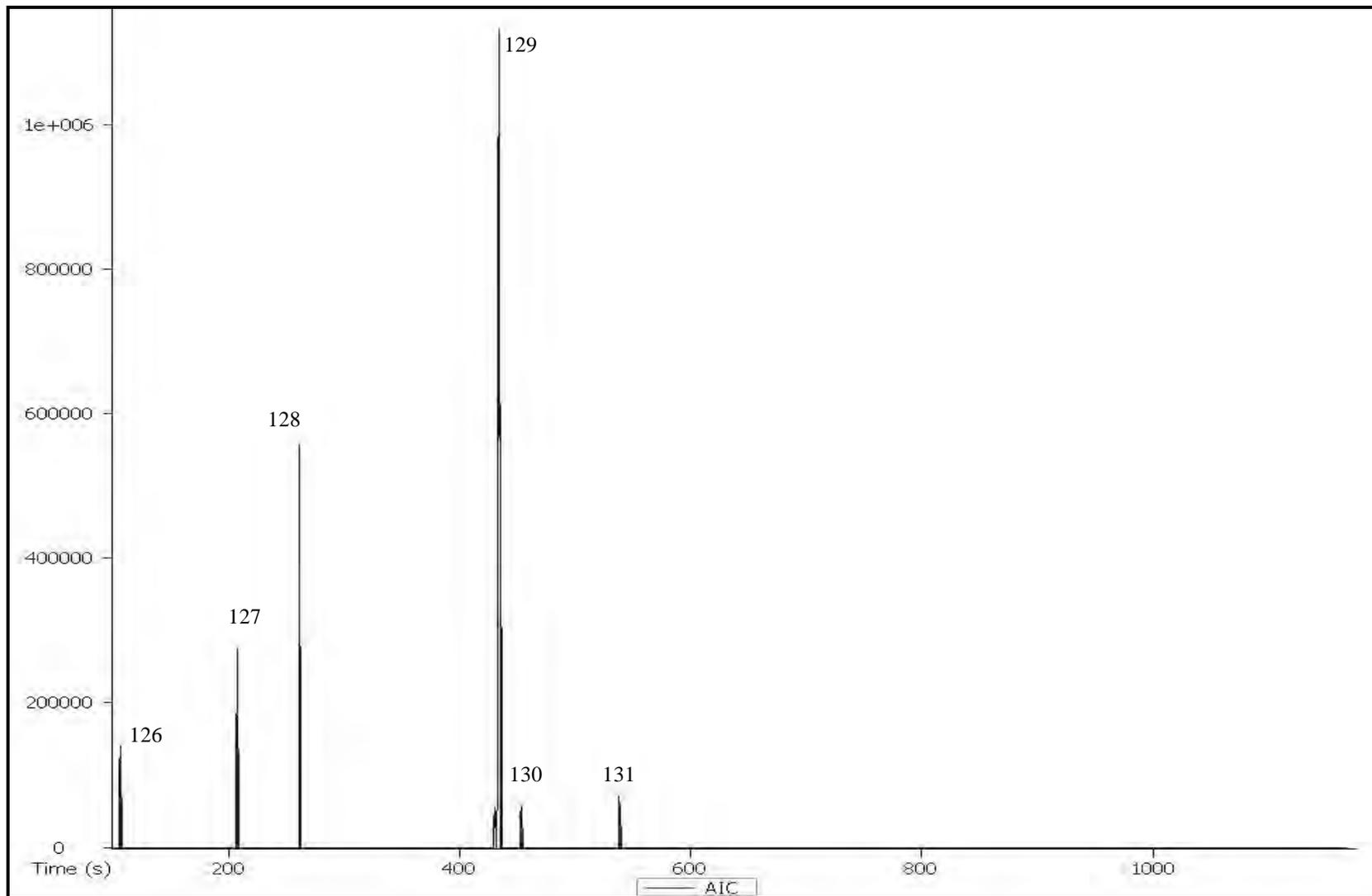
Cromatograma 14. Fracción 40 sólida del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



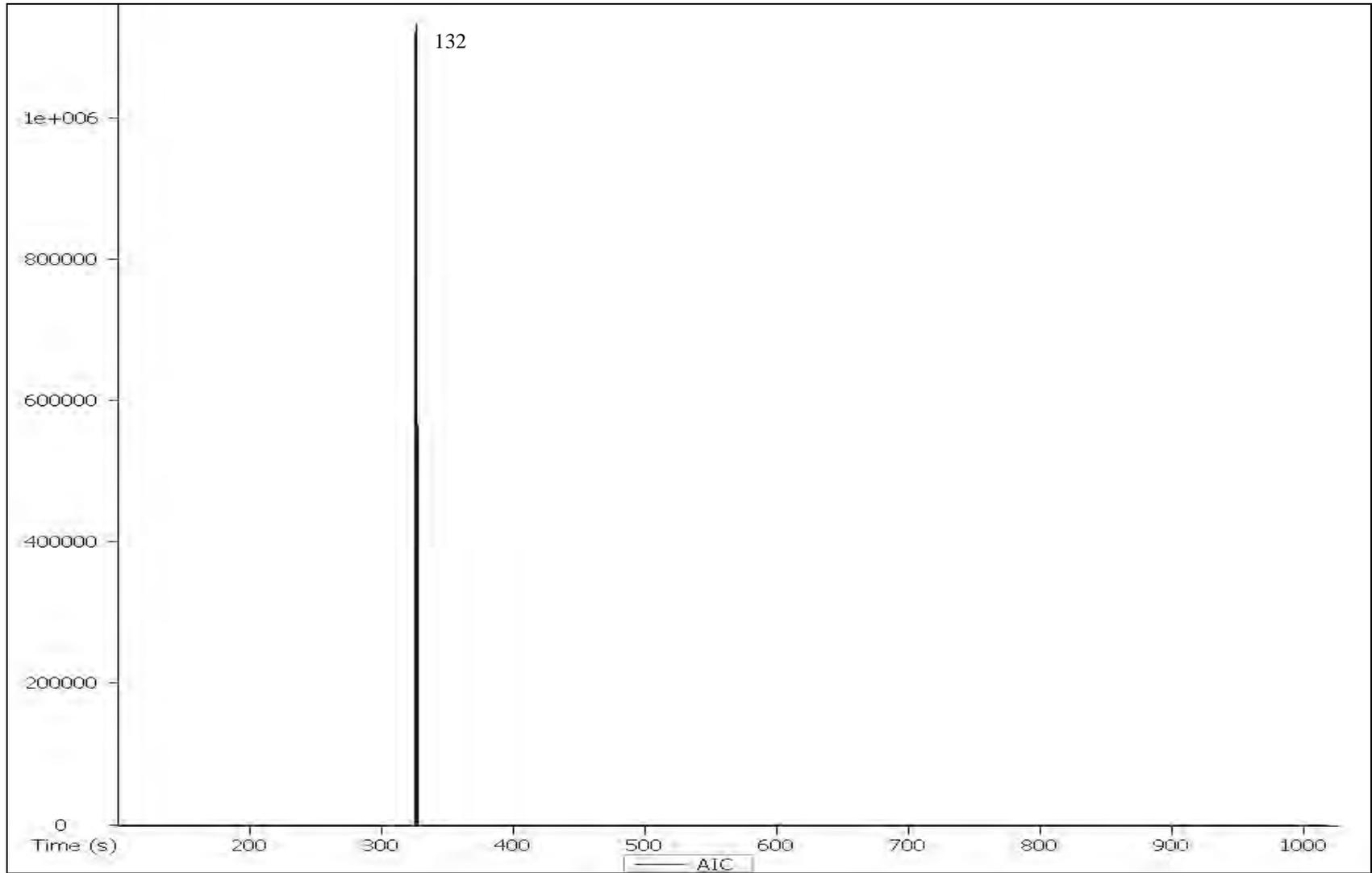
Cromatograma 15. Fracción 40 aguas madres del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



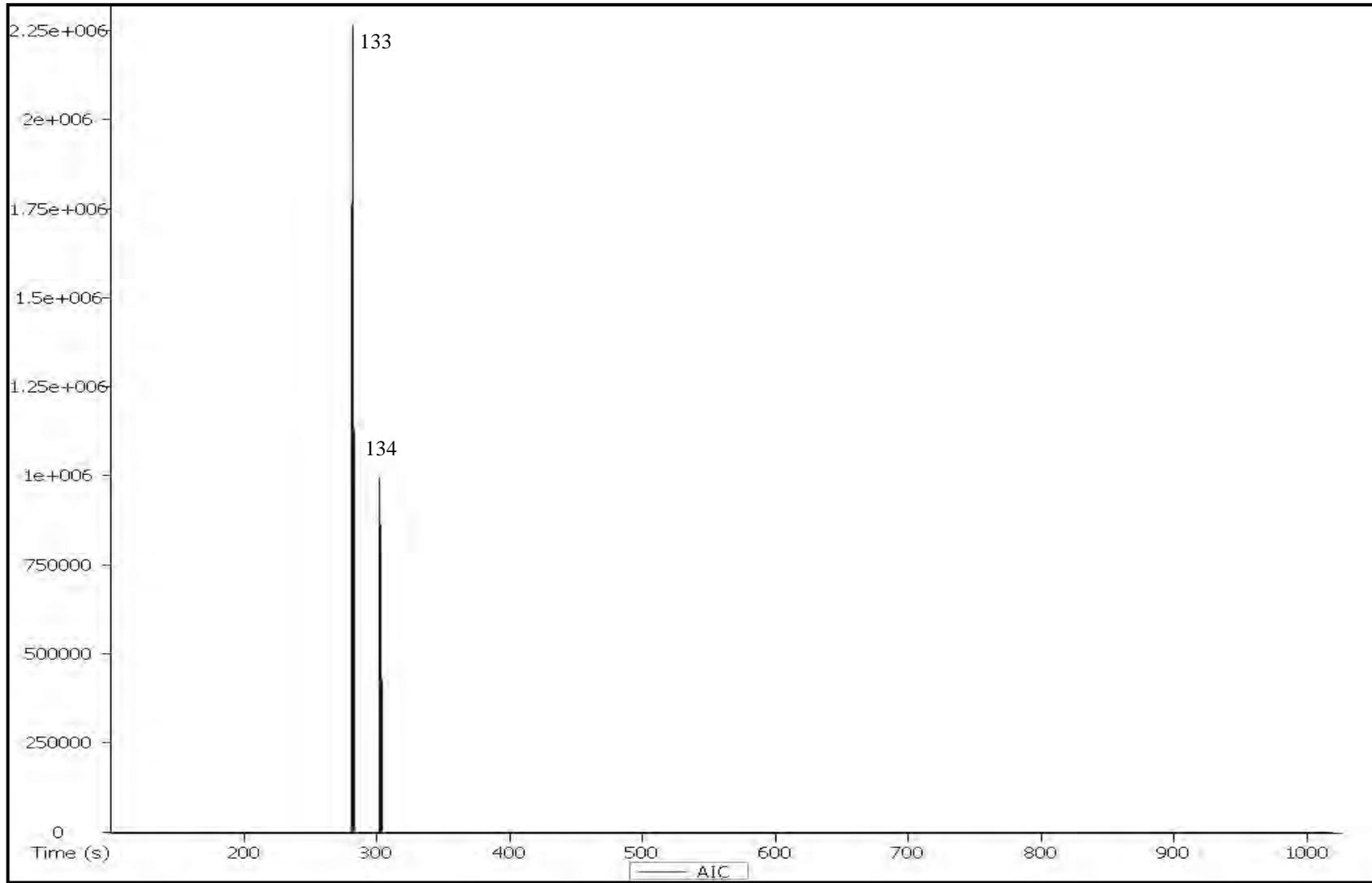
Cromatograma 16. Fracción 56 del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



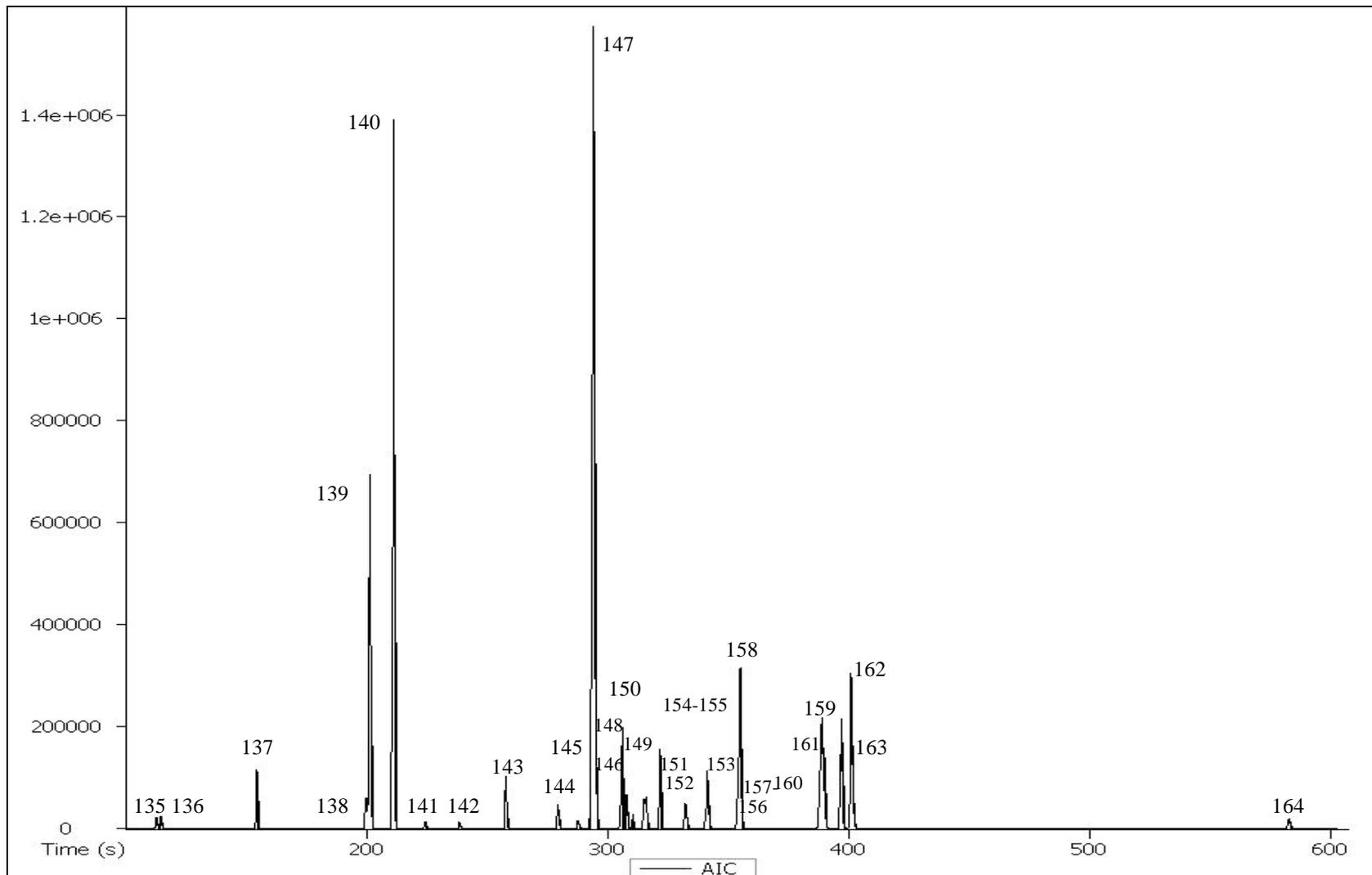
Cromatograma 17. Fracción 106 del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



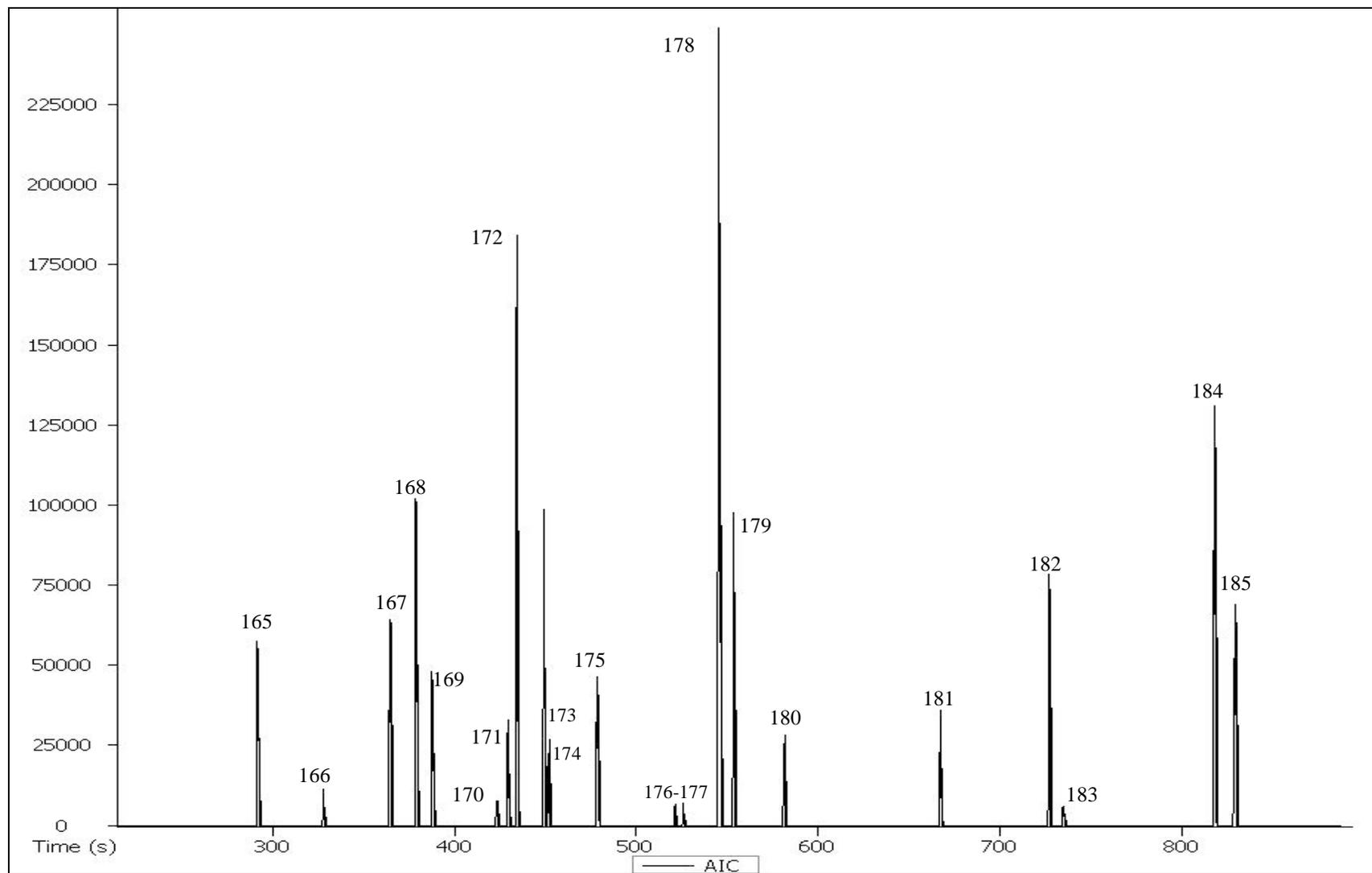
Cromatograma 18. Fracción 131 del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



Cromatograma 19. Fracción 148 del extracto de partes aéreas de *L. porteri*.



Cromatograma 20. Extracto de raíz de *L. porteri*.



Cromatograma 21. Extracto de raíz de *P. crispum*.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Agnihotri VK, Thappa RK, Meena B, Kapahi BK, Saxena RK, Qazi GN and Agarwal SG.** 2004. Essential oil composition of aerial parts of *Angelica glauca* growing wild in North-West Himalaya (India). *Phytochemistry* 65: 2411-24113.
- ❖ **Aguilar A y Zolla C.** 1982. Plantas tóxicas de México. IMSS. México. [*Conium*: pp 60-61].
- ❖ **Al-Abta S, Galpin IJ and Collin HA.** 1979. Flavour compounds in tissue cultures of celery. *Plant Science Letters* 16: 129-134.
- ❖ **Alali F and Al-Lafi T.** 2003. GC-MS analysis and bioactivity testing of the volatile oil from the leaves of the toothbrush tree *Salvadora persica* L. *Natural Product Letters* 17(3): 189-194
- ❖ **Al-Amier H, El-Hela AA, Al-Khadrawy FM and Craker LE.** 2005. Comparative evaluation of the volatile constituents in some *Verbena* species cultivated in Egypt. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 11(3): 25-33.
- ❖ **Alkhimova OG, Kyrylenko TK, Vagyn YV and Heslop-Harrison JS.** 2001. Alkaloid biosynthesis in *Papaver sp.* cells in culture and during organogenesis. *Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal* 73(3): 141-146.
- ❖ **American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium.** 2003. Dang Gui Root, *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels, Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics. California. USA. pp: 1-44.
- ❖ **Anaya AL.** 2003. Ecología Química. Plaza y Valdés S.A. de C.V. México. D.F. pp: 349.
- ❖ **Anderson LA, Keene AT and Philipson JD.** 1982. Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Planta Medica* 46: 25-27.
- ❖ **Andersson R and Lundgren LN.** 1988. The constituents of conifer needles. Part 13. Monoaryl and cyclohexenone glycosides from needles of *Pinus sylvestris*. *Phytochemistry* 27(2): 559-562.
- ❖ **Antognoni F, Zheng S, Pagnucco C, Baraldi R, Poli F and Biondi S.** 2007. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia* 78: 345-352.
- ❖ **Anzures y Bolaños MC.** 1978. Índice analítico. In: J. de Esteyneffer (ed). Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades. Academia Nacional de Medicina. México.
- ❖ **Appelt GD.** 1985. Pharmacological aspects of selected herbs employed in Hispanic folk medicine in the San Luis Valley of Colorado, USA: I. *Ligusticum porteri* (osha) and *Matricaria chamomilla* (manzanilla). *Journal of Ethnopharmacology* 13: 51-55.
- ❖ **Applequist WL.** 2005. Root anatomy of *Ligusticum* species (Apiaceae) sold as osha compared to that of potential contaminants. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 11(3): 1-11.
- ❖ **Araujo H, Lacerda ME, Lopes D, Bizzo H and Kaplan MA.** 2007. Studies on the aroma of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) using headspace solid-phase microextraction. *Phytochemical Analysis* 18(6): 469-474.
- ❖ **Argueta VA, Cano AL y Rodarte ME.** 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana.. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México. [*Ligusticum*: 759; *Petroselinum*: 1138-1140].
- ❖ **Asakawa Y, Matsuda R and Takemoto T.** 1982. Mono and sesquiterpenoids from *Hydrocotyle* and *Centella* species. *Phytochemistry* 21(10): 2590-2592.

- ❖ **Ashnagar A, Naseri NG and Foroozanfar S.** 2007. Isolation and identification of the major chemical components found in the upper parts of *Teucrium polium* plants grown in Khuzestan province of Iran. *Chinese Journal of Chemistry* 25(8): 1171-1173.
- ❖ **Asuming WA, Beauchamp PS, Descalzo JT, Dev BC, Dev V, Frost S and Ma CW.** 2005. Essential oil composition of four *Lomatium* Raf. species and their chemotaxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 17-26.
- ❖ **Attoubre J, Hano C, Mesnard F, Lamblib F, Bensaddek L, Raynaud-Le Grandic S, Laine E, Fliniaux MA and Baltora-Rosset S.** 2006. Identification by NMR and accumulation of a neolignan, the dehydronicoferyl alcohol-4- β -D-glucoside, in *Linum usitatissimum* cell cultures. *Comptes Rendus Chimie* 9: 420-425.
- ❖ **Aziz ZA, Davey MR, Power JB, Anthony P, Smith RM and Lowe KC.** 2007. Production of asiaticoside and madecassoside in *Centella asiatica* *in vitro* and *in vivo*. *Biologia Plantarum* 51(1): 34-42.
- ❖ **Bairamian S, Beauchamp PS, Descalzo JT, Dev BC, Dev V, Frost SC and Nguyen CV.** 2004. California *Lomatiums* Part III. Composition of the hydrodistilled oils from two varieties of *Lomatium dissectum*. Isolation of a new hydrocarbon. *Journal of Essential Oil Research* 16(5): 461-468.
- ❖ **Bajaj YP, Furmanowa F and Olszowska O.** 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 4. Medicinal and aromatic plants I. Springer-Verlag Berlin. pp: 60- 103.
- ❖ **Banerjee S, Rahman L, Uniyal GC and Ahuja PS.** 1998. Enhanced production of valeportiates by *Agrobacterium rhizogenes* induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* DC. *Plant Science* 131: 203-208.
- ❖ **Bang JW, In DS, Chung SH and Liu JR.** 1999. Plant regeneration from embryogenic cells-derived protoplasts of *Bupleurum falcatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 55: 151-154.
- ❖ **Barra A, Norouzi-Arasi H, Sedaghat-Sharehjini S and Baldovini N.** 2006. Volatile constituents of *Geranium tuberosum* L. from Iran. *Natural Product Communications* 1(5): 387-390.
- ❖ **Barranco E.** 1998. Aminoiglucośidos. *Acta Médica* 8(1): 48-53.
- ❖ **Baser KH, Ozek G, Ozek T, Duran A and Duman H.** 2006. Composition of the essential oil of *Rhabdosciadium oligocarpum* (Post ex Boiss.) Hedge et Lamond and *Rhabdosciadium microcalycinum* Hand.-Mazz. *Flavour and Fragrance Journal* 21(4): 650-655.
- ❖ **Baser KH, Özek T, Demirci B and Duman H.** 2000. Composition of the essential oil of *Glaucosciadium cordifolium* (Boiss.) Burt et Davis from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal* 15: 45-46.
- ❖ **Baser KH.** 2002. Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure & Applied Chemistry* 74(4): 527-545.
- ❖ **Bava A, Dallavalle S, Fronza G, Nasini G and de Pava OV.** 2006. Absolute configuration of sporotricale and structure of 6-hydroxysporotricale. *Journal of Natural Products* 69: 1793-1795.
- ❖ **Bazgir A, Shaabani A and Sefidkon F.** 2005. Composition of the essential oil of *Diplotaenia cachrydifolia* Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research* 17(5): 525-526.
- ❖ **Beauchamp P, Dev B, Dev V, Midland SL and Sims JJ.** 2007. California *Lomatiums*, Part VII. Analysis of the essential oils of *Lomatium nevadense* (Watson) J. Coulter et Rose var. *parishii* (J.Coulter et Rose)

- Jepson. Isolation of trans-Dauc-8-en-11-ol, a new sesquiterpene alcohol and naturally occurring 2',3',3'-trimethyl-2',3'-dihydroangelicin. *Journal of Essential Oil Research* 19(2): 117-124.
- ❖ **Beauchamp PS, Descalzo JT, Dev BC, Dev V, Nguyen CV, Midland SL, Sims JJ and Tham FS.** 2004. California *Lomatiums*, Part IV^a: Composition of the essential oils of *Lomatium rigidum* (M. E. Jones) Jepson. Structures of two new funebrene epimers and a tridecatriene. *Journal of Essential Oil Research* 16(6): 571-578.
 - ❖ **Beauchamp PS, Dev BC and Dev V.** 2006. California *Lomatiums*, part VI. Composition of the essential oils of *Lomatium foeniculaceum* spp. *fimbriatu*. *Journal of Essential Oil Research* 18(6): 666-669.
 - ❖ **Beck JJ and Chou SC.** 2007. The structural diversity of phthalides from the Apiaceae. *Journal of Natural Products* 70(5): 891-900.
 - ❖ **Beck JJ and Stermitz FR.** 1995. Addition of methyl thioglycolate and benzylamine to (*Z*)-ligustilide, a bioactive unsaturated lactone constituent of several herbal medicines. An improved synthesis of (*Z*)-ligustilide. *Journal of Natural Products* 58(7): 1047-1055.
 - ❖ **Beer AM, Lukanov J and Sagorchev P.** 2007. Effect of thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* 14(1): 65-69.
 - ❖ **Beier RC, Ivie GW and Oertli EH.** 1994. Linear furanocoumarins and graveolone from the common herb parsley. *Phytochemistry* 36(4): 869-972.
 - ❖ **Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini AF and Costa J.** 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry* 106(1): 132-139.
 - ❖ **Bennici A, Anzidei M and Vendramin GG.** 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science* 166: 221-227.
 - ❖ **Bensaddek L, Gillet F, Nava JE and Fliniaux MA.** 2001. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *Journal of Biotechnology* 85: 35-40.
 - ❖ **Bentley KW.** 1999. β -Phenylethylamines and isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports* 16: 367-388.
 - ❖ **Bentsink L and Koornneef M.** 2002. Seed dormancy and germination. In: CR Somerville, EM Meyerowitz. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists. Rockville, MD.
 - ❖ **Berlin J.** 1988. Formation of secondary metabolites in cultured plant cells and its impact on pharmacy. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture Forestry*. Vol. 4. Medicinal and Aromatic Plants I. Springer-Verlag, Berlin. pp: 37-59.
 - ❖ **Bertoli A, Menichini F, Noccioli C, Morelli I and Pistelli L.** 2004. Volatile constituents of different organs of *Psoralea bituminosa* L. *Flavour and Fragrance Journal* 19(2): 166-171.
 - ❖ **Bewley JD and Black M.** 1994. Seeds. Physiology of development and germination. 2nd Edition. Plenum Press. New York. pp: 231-257.
 - ❖ **Bi HP, Han CR, Liang ZY, Zhu ZH and Zhong QX.** 2007. Chemical constituents of volatile oil from leaves of *Microcos paniculata*. *Linchan Huaxue Yu Gongye* 27(3): 124-126.

- ❖ **Bjeldanes LF and Kim IS.** 1977. Phthalide components of celery essential oil. *Journal of Organic Chemistry* 42(13): 2333-2335.
- ❖ **Blaskó G, Hussain SF and Shamma M.** 1981. (-)-Corlumine, a new phthalideisoquinoline alkaloid from *Fumaria parviflora*. *Journal of Natural Products* 44(4): 475-477.
- ❖ **Bohrmann H, Stahl E and Mitsuhashi H.** 1967. Studies of the constituents of Umbelliferae plants. XIII. Chromatographic studies on the constituents of *Cnidium officinale* Makino. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 15(10): 1606-1608.
- ❖ **Bonsignore L, Casu L, Loy G, Deidda D and Genco F.** 2004. Analysis of the essential oil of *Oenanthe crocata* L. and its biological activity. *Journal of Essential Oil Research* 16(3): 266-269.
- ❖ **Bozin B, Mimica-Dulic N, Simin N and Anackov G.** 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(5): 1822-1828.
- ❖ **Brain KR.** 1976. Accumulation of L-DOPA in cultures from *Mucuna pruriens*. *Plant Science Letters* 7: 157-161.
- ❖ **Brandt JJ and Schultze W.** 1995. Composition of the essential oils of *Ligusticum mutellina* (L.) Crantz (Apiaceae). *Journal of Essential Oil Research* 7(3): 231-235.
- ❖ **Brophy JJ, Goldsack RJ and Forster PI.** 2007. Essential oils from the leaves of *Bosistoa* F. Muell. ex Benth (Rutaceae). *Journal of Essential Oil Research* 19(3): 249-254.
- ❖ **Brown AH, Brubaker CL and Grace JP.** 1997. Regeneration of germplasm samples: wild versus cultivated plant species. *Crop Science* 37: 7-13.
- ❖ **Buchanan BB, Gruissem W and Jones RL.** 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. pp: 873-894.
- ❖ **Buchbauer G, Jirovetz L and Nikiforov A.** 1996. Comparative investigation of essential clover flower oils from Austria using gas chromatography-flame ionization detection, gas chromatography-mass spectrometry, and gas chromatography-olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1827-1828.
- ❖ **Bulatovic VM, Savikin-Fodulovic KP, Zdunic GM and Popovic MP.** 2006. Essential oil of *Seseli peucedanoides* (MB) Kos.-Pol. *Journal of Essential Oil Research* 18(3): 286-287.
- ❖ **Bureau S, Gouble B, Grotte M, Audergon JM and Albagnac G.** 2005. Variability of volatile aroma composition in apricot fruits. *Acta Horticulturae* 717: 327-332.
- ❖ **Butkiene R, Nivinskiene O, Mockute D and Miliute A.** 2007. Variety of the essential oils composition of wood, needles (leaves), unripe and ripe berries of *Juniperus communis* var. *communis* growing wild in Druskininkai district. *Chemija* 18(3): 35-40.
- ❖ **Bye RA and Linares E.** 1986. Ethnobotanical notes from the Valley of San Luis, Colorado. *Journal of Ethnobiology* 6(2): 289-306.
- ❖ **Bye RA.** 1985. Medicinal plants of the Tarahumara Indians of Chihuahua, Mexico. In: RA Tyson and DV Elerick (eds.). Two mummies from Chihuahua, Mexico. A multidisciplinary study. San Diego Museum Papers No. 19. San Diego Museum of Man. pp: 77-103.
- ❖ **Bye RA.** 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany* 40(1): 103-124.

- ❖ **Bye RA.** 1998. La intervención del hombre en la diversificación de las plantas en México. In: TP Ramamoorthy, R Bye, A Lot y J Fa. *Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 689-713.
- ❖ **Bylaite E, Venskutonis RP and Roozen JP.** 1998. Influence of harvesting time on the composition of volatile components in different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3735-3740.
- ❖ **Caballero J.** 1990. Medio ambiente y desarrollo en México. Vol. I. Editorial Porrúa. México. pp: 257-288.
- ❖ **Calderón de Rzedowski G.** 2001. Umbelliferae. In: G Calderón de Rzedowski y J Rzedowski. *Flora fanerogámica del valle de México*. 2ª Edición. CONABIO. Instituto de Ecología, A.C. Michoacán, México. pp: 494-515.
- ❖ **Calucci L, Pinzino C, Zandomenighi M, Capocchi A, Ghiringhrlli S, Saviozzi F, Tozzi S y Galleschi I.** 2003. Effects of γ -irradiation on the free radical and antioxidant contents of nine aromatic herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 927-934.
- ❖ **Camazine S and Bye RA.** 1980. A study of the medicinal ethnobotany of the Zuni Indians of New Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 2: 365-388.
- ❖ **Campeol E, Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Cremonini R and Ceccarini L.** Volatile fractions from three cultivars of *Olea europaea* L. collected in two different seasons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(7): 1994-1999.
- ❖ **Canelon DJ, Compagnone RS, Castillo A and Suárez AI.** 2005. Chemical constituents from *Senefelderopsis chiribiquetensis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33(12): 1303-1306.
- ❖ **Canter PH, Thomas H and Ernst E.** 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 23(4): 180-185.
- ❖ **Cao P, Liu C and Liu K.** 2007. Aromatic constituents in fresh leaves of *Lingtou Dancong* tea induced by drought stress. *Frontiers of Agriculture in China* 1(1): 81-84.
- ❖ **Cao YX, Zhang W, He JY, He LC and Xu CB.** 2006. Ligustilide induces vasodilatation via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca^{2+} influx and release. *Vascular Pharmacology* 45: 171-176.
- ❖ **Cardeal ZL, Gomes da Silva MD y Marriott PJ.** 2006. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 2823-2836.
- ❖ **Cardozo E, Rubio M, Rojas LB and Usubillaga A.** 2004. Composition of the essential oil from the leaves of *Eryngium foetidum* L. from the Venezuelan Andes. *Journal of Essential Oil Research* 16(1): 33-34.
- ❖ **Carrier D, Chauret N, Mancini M, Coulombe P, Neufeld R, Weber M and Archambault J.** 1991. Detection of ginkgolide A in *Ginkgo biloba* cell cultures. *Plant Cell Reports* 10: 256-259.
- ❖ **Carrier J, Chauret N, Neufeld R and Archambault J.** 1994. *Ginkgo biloba* L. (Maiden Hair Tree): *In vitro* culture and the formation of ginkgolides. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture Forestry*. Vol. 26. Medicinal and Aromatic Plants VI. Springer-Verlag. Berlin. pp: 136-145.
- ❖ **Cégiéla-Carlio P, Bessiere JM, David B, Mariotte AM, Gibbons S and Dijoux-Franca MG.** 2005. Modulation of multi-drug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus* by Osha (*Ligusticum porteri* L.,

- Apiaceae) essential oil compounds. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 671-675.
- ❖ **Ceska O, Chaudhary SK, Warrington PJ and Smith JA.** 1987. Photoactive furanocoumarins in fruits of some umbellifers. *Phytochemistry* 26(1): 165-169.
 - ❖ **Céspedes CL, Ávila JG, Martínez A, Serrato B, Calderón-Muciga JC and Salgado-Garciglia R.** 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(10): 3521-3527.
 - ❖ **Chan JG and Wang XC.** 2005. Analysis of volatile flavor components in sesame seed oil by headspace extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Zhipu Xuebao* 26(1): 49-50, 13.
 - ❖ **Chan SS, Cheng TY and Lin G.** 2007. Relaxation effects of ligustilide and senkyunolide A, two main constituents of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 111(3): 677-680.
 - ❖ **Chan SS, On-Ki A, Jones RL and Lin G.** 2006. Mechanisms underlying the vasorelaxing effects of butyldene-phthalide, an active constituent of *Ligusticum chuanxiong*, in rat isolated aorta. *European Journal of Pharmacology* 537: 111-117.
 - ❖ **Chandler S and Dodds JH.** 1983. Solasodine production in rapidly proliferating tissue cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Reports* 2: 69-72.
 - ❖ **Chaudhary SK, Ceska O, Tetu C, Warrington PJ, Ashwood-Smith MJ and Poulton GA.** 1986. Oxypeucedanin, a major furocoumarin in parsley, *Petroselinum crispum*. *Planta Medica* 6: 462-464.
 - ❖ **Chen GY, Luo XX, Han CR, Jiang ZL and Mo ZR.** 2007. GC-MS analysis of essential oils from the leaves of *Canthium horridum*. *Hebei Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 27(5): 486-488.
 - ❖ **Chen JT and Yang CR.** 2006. Studies on chemical constituents from *Ligusticum glaucescens* Franch. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 29(9): 918-920.
 - ❖ **Cho SK, Abd El-Aty AM, Choi JH, Kim MR and Shim JH.** 2007. Optimized conditions for the extraction of secondary metabolites in *Angelica* roots by accelerated solvent extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44(5): 1154-1158.
 - ❖ **Choi HS, Kim MS and Sawamura M.** 2002. Constituents of the essential oil of *Cnidium officinale* Makino, a Korean medicinal plant. *Flavour and Fragrance Journal* 17(1): 49-53.
 - ❖ **Chowdhury JU, Nandi NC, Rahman M and Hossain ME.** 2005. Chemical constituents of essential oils from two types of *Mentha arvensis* grown in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 40(1-2): 135-138.
 - ❖ **Chrispeels MJ and Sadava DE.** 1994. Valuable chemicals from plant cell and tissue culture. In: Chrispeels MJ and Sadava DE (eds). *Plants, genes and agriculture*. Ed Jones and Bartlett. Boston, USA.
 - ❖ **Christensen LP and Brandt K.** 2006. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 683-693.
 - ❖ **Chuang PH, Lee CW, Chou JY, Murugan M, Shieh BJ and Chen HM.** 2007. Antifungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology* 98: 232-236.
 - ❖ **Chulia AJ, García J et Mariotte AM.** 1986. Nouveau glycoside de phthalide chez *Gentiana pedicellata*. *Journal of Natural Products* 49(3): 514-516.
 - ❖ **Chulia AJ, Kaouadji M et Mariotte AM.** 1984. Pedicelloside, nouveau phthalide isolé de *Gentiana pedicellata* Wall. *Tetrahedron Letters* 25(44): 5039-5040.

- ❖ **Chwodhury JU, Nandi NC and Uddin M.** 2006. Aromatic plants of Bangladesh: volatile oil constituents of *Centella asiatica*. *Indian Perfumer* 50(2): 36-37.
- ❖ **Cline SD and Coscia CJ.** 1988. Stimulation of sanguinarine production by combined fungal elicitation and hormonal deprivation in cell suspension cultures of *Papaver bracteatum*. *Plant Physiology* 86: 161-165.
- ❖ **Collin HA.** 2001. Secondary product formation in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 34: 119-134.
- ❖ **Constante L, Chiang TI and Bye RA.** 1976. Chromosome numbers in Chihuahuan Umbelliferae. Vol. 23. No. 8. Botanical Museum Leaflets, Harvard University. pp: 241-247.
- ❖ **Convention of International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES).** 1999. Review of four species for potential listing on the convention on international trade in endangered species. Appendix II. The Problem Solving Course. Sustainable Development and Conservation Biology. University of Maryland. (http://www.nps.gov/plants/medicinal/pubs/cites-a.htm#lig_top).
- ❖ **Cordero C.** 1996. La industria farmacéutica en busca de nuevos elementos: explorar la biodiversidad. *Biodiversitas* 2(10): 9-12.
- ❖ **Cronquist A, Holmgren NH and Holmgren PK.** 1997. Intermountain Flora. Vascular Plants of the Intermountain West, U.S.A. Vol. 3 Part A. Subclass Rosidae (except Fabales). The New York Botanical Garden Bronx, New York. USA. pp: 340-341, 365-367.
- ❖ **Crowden RK, Harborne JB and Heywood VH.** 1969. Chemosystematics of the Umbelliferae – A general survey. *Phytochemistry* 8: 1963-1984.
- ❖ **D'Agostino IB and Kieber J.** 1999. Molecular mechanism of cytokinin action. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 359-364.
- ❖ **Dahia M, Laouer H, Chaker AN, Prado S, Meierhenrich UJ and Baldovini N.** 2007. Chemical composition and antibacterial activity of *Pituranthos chloranthus* volatile oil. *Natural Product Communications* 2(11): 1159-1162.
- ❖ **De Andrade L, De Oliveira S, Zuanazzi JA, Rech SB and Henriques AT.** 2005. Pilocarpine accumulation on *Pilocarpus pennatifolius* tissue culture. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas* 40(3): 437-439.
- ❖ **De Oliveira JC, da Camara CA and Schwartz MO.** 2007. Volatile constituents of the stem and leaves of *Cordia* species from mountain forests of Pernambuco (north-eastern Brazil). *Journal of Essential Oil Research* 19(5): 444-448.
- ❖ **Deciga-Campos M, González-Trujano E, Navarrete A and Mata R.** 2005. Antinociceptive effect of selected Mexican traditional medicinal species. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 48: 70-72.
- ❖ **Delazar A, Biglari F, Esnaashari S, Nazemiyeh H, Talebpour AH, Nahar L and Sarker SD.** 2006. GC-MS analysis of the essential oils, and the isolation of phenylpropanoid derivatives from the aerial parts of *Pimpinella aurea*. *Phytochemistry* 67: 2176-2181.
- ❖ **Delgado G, Reza-Garduño RG, Ríos MY and Del Río F.** 1992. Phtalides and monoterpenes of the hexane extract of the roots of *Ligusticum porteri*. *Planta Medica* 58: 570-571.

- ❖ **Delgado G, Reza-Garduño RG, Toscano RA, Bye RA and Linares E.** 1988. Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Umbelliferae). X-Ray structure of Z-6.6',7.3"-diligustilide. *Heterocycles* 27(6): 1305-1312.
- ❖ **Demirci B, Baser KH and Dadandi MY.** 2006. Composition of the essential oils of *Phlomis rigida* Labill. and *P. samia* L. *Journal of Essential Oil Research* 18(3): 328-331.
- ❖ **Deng C, Li N and Zhang X.** 2004. Rapid determination of essential oil in *Acorus tatarinowii* Schott. by pressurized hot water extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1059: 149-155.
- ❖ **Deng C, Song G, Hu Y and Zhang X.** 2003. Analysis of the volatile constituents of *Schisandra chinensis* (Turz.) Bail by gas chromatography-mass spectrometry, using headscape solid-phase microextraction. *Chromatographia* 58 (5-6): 289-294.
- ❖ **Deng S, Chen SN, Lu J, Wang ZJ, Nikolic D, van Breemen RB, Santarsiero BD, Mesecar A, Fong HH, Farnsworth NR and Pauli GF.** 2006. GABAergic phthalide dimers from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Phytochemical Analysis* 17: 398-405.
- ❖ **Deng S, Chen SN, Yao P, Nikolic D, van Breemen RB, Bolton JL, Fong HH, Farnsworth NR and Pauli GF.** 2006. Serotonergic activity-guided phytochemical investigation of the roots of *Angelica sinensis*. *Journal of Natural Products* 69: 536-541.
- ❖ **Deng S, Chen SN, Yao P, Nikolic D, van Breemen RB, Bolton JL, Fong HH, Farnsworth NR and Pauli GF.** 2006. Serotonergic activity-guided phytochemical investigation of the roots of *Angelica sinensis*. *Journal of Natural Products* 69: 536-541.
- ❖ **Dev V, Ly B, Miranda AE and Whaley W.** 2007. *Lomatium grayi* and Indra swallowtail butterfly. Composition of the essential oils of three varieties of *Lomatium grayi* (J. M. Coult et Rose) J. M. Coult et Rose. *Journal of Essential Oil Research* 19(3): 244-248.
- ❖ **Dewick PM.** 2001. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: Dewick PM (eds). *Medicinal natural products*. 2nd edition. John Wiley and Sons Ltd. Sussex, UK. pp: 121-166.
- ❖ **Diario Oficial de la Federación.** 24 junio 1996. NOM-004-RECNAT-1996.
- ❖ **Días-Maroto MC, Pérez-Coello MS and Cabezudo MD.** 2002. Effect of different drying methods on the volatile components of parsley (*Petroselinum crispum* L.). *European Food Research and Technology* 215(3): 227-230.
- ❖ **Dixon RA, Achinine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS and Wang L.** 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3(5): 371-390.
- ❖ **Dodds JH y Roberts LW.** 1982. Experiments in plant tissue culture. Chapter 9. Cell Suspension Cultures. Cambridge University Press. pp: 104-112.
- ❖ **Dougall DK, Johnson JM and Whitten GH.** 1980. A clonal analysis of anthocyanin accumulation by cell cultures of wild carrot. *Planta* 149(3): 292-297.
- ❖ **Drude CG.** 1898. Umbelliferae. In: A. Engler and K. Prantl eds., *Die Natürlichen Pflanzenfamilien* 3:63–250. Wilhelm Engelmann. Leipzig, Germany.
- ❖ **Du J, Bai B, Kuang X, Yu Y, Wang C, Ke Y, Xu Y, Tzang A and Qian ZM.** 2006(a). Ligustilide inhibits spontaneous and agonists- or K⁺ depolarization-induced contraction of rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology* 108(3): 54-58.

- ❖ **Du J, Yu Y, Ke Y, Wang C, Zhu L and Qian ZM.** 2007. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. *Journal of Ethnopharmacology* 112: 211-214.
- ❖ **Du JR, Yu Y, Yao Y, Bao B, Zong X, Lei Y, Wang CY and Qian ZM.** 2006(b). Ligustilide reduces phenylephrine induced-aortic tension *in vitro* but has no effect on systolic pressure in spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Chinese Medicine* 35(3): 487-496.
- ❖ **Ebrahimie E, Naghavi MR, Hosseinzadeh A, Behamta MR, Mohammadi-Dehcheshmeh M, Sarrafi A and Spangenberg G.** 2007. Induction and comparison of different *in vitro* morphogenesis pathways using embryo of cumin (*Cuminum cyminum* L.) as a model material. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 293-311.
- ❖ **Ekiert H.** 1993. *Ammi majus* L. (Bishop's weed): *In vitro* culture and the production of coumarin compounds. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 21. Medicinal and Aromatic Plants IV. Springer-Verlag. Berlin. pp: 1-17.
- ❖ **Endo T and Yamada Y.** 1985. Alkaloid production in cultured roots of three species of *Duboisia*. *Phytochemistry* 24: 1233-1236.
- ❖ **Ermayanti TM, McComb JA and O'Brien PA.** 1994. Growth and swainsonine production of *Swainsona galegifolia* (Andr.) R. Br. untransformed and transformed root cultures. *Journal of Experimental Botany* 45(5): 633-639.
- ❖ **Ernst D.** 1989. *Pimpinella anisum* L. (Anise): cell culture, somatic embryogenesis and the production of anise oil. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 7. Medicinal and Aromatic Plants II. Springer-Verlag. Berlin. pp: 381-397.
- ❖ **Esteyneffer J.** 1978. *Florilegio Medicinal de Todas las Enfermedades*. Academia Nacional de Medicina, México.
- ❖ **Facey PC, Porter RB, Williams LA.** 2006. The chemical composition and insecticidal activity of the essential oils from Jamaican *Hyptis capitata* Jacq. *Biologically Active Natural Products for the 21st Century* 13-19.
- ❖ **Fakhari AR, Sonboli A and Heydari R.** 2005. Composition of the essential oil of *Rhabdosciadium strausii* from Iran. *Chemistry of Natural Compounds* 41(4): 413-414.
- ❖ **Fan C, Wang W, Wang Y, Qin G and Zhao W.** 2001. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum*. *Phytochemistry* 57(8): 1255-1258.
- ❖ **Fang L, Tian F, Ma Y and Zhang X.** 2006. Analysis of chemical constituents of *Tilia mongolica* leaves by GC-MS. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 18(3): 423-425.
- ❖ **Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD and Guo Z.** 1985. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization* 63(6): 965-981.
- ❖ **Fehr D.** 1979. Untersuchung über aromastoffe von sellerie (*Apium graveolens* L.) *Pharmazie* 34: 658-662.
- ❖ **Fehr D.** 1981. Untersuchung über aromastoffe von sellerie (*Apium graveolens* L.). *Pharmazie* 36: 374-376.
- ❖ **Fellah S, Romdhane M and Abderraba M.** 2006. Extraction and a study of essential oils of *Salvia officinalis* from two different regions in Tunisia. *Journal de la Societe Algerienne de Chimie* 16(2): 193-202.
- ❖ **Figuerola R.** 1997. Derivatización química del Z-ligustilido, un metabolito bioactivo de *Ligusticum porteri*, para su evaluación biológica. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.

- ❖ **Fischer FC and Gijbels MJ.** 1987. *cis*- and *trans*-neocnidilide; ¹H- and ¹³C-NMR data of some phthalides. *Planta Medica* 53(1): 77-80.
- ❖ **Flamini G, Cioni PL and Morelli I.** 2004. Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*. *Food Chemistry* 91(1): 63-68.
- ❖ **Flamini G, Cioni PL, Macciioni S and Baldini R.** 2007. Composition of the essential oil of *Daucus gingidium* L. *ssp. gingidium*. *Food Chemistry* 103(4): 1237-1240.
- ❖ **Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Ceccarini L, Andolfi L and Macchia M.** 2003. Composition of the essential oil of *Medicago marina* L. from the coastal dunes of Tuscany, Italy. *Flavour and Fragrance Journal* 18(5): 460-462.
- ❖ **Flemion F.** 1949. *Lygus* bugs in relation to the occurrence of embryoless seeds in the Umbelliferae. *Science* 109: 364-365.
- ❖ **Flores-Sánchez IJ, Ortega-López J, Montes-Horcasitas MC and Ramos-Valdivia AC.** 2002. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant Cell Physiology* 43(12): 1502-1509.
- ❖ **Formisano C, Rigano D, Senatore F, De Feo V, Bruno M and Rosselli S.** 2007. Composition and allelopathic effect of essential oils of two thistles: *Cirsium creticum* (Lam.) D.'Urv. *ssp. triumfetti* (Lacaita) Werner and *Carduus nutans* L. *Journal of Plant Interactions* 2(1-3): 115-120.
- ❖ **Formisano C, Senatore F, Arnold NA, Piozzi F and Rosselli S.** 2007. GC and GC/MS analysis of the essential oil of *Salvia hierosolymitana* Boiss. growing wild in Lebanon. *Natural Product Communications* 2(2): 181-184.
- ❖ **Freeman GG, Whenham RJ, Self R and Eagles J.** 1975. Volatile flavour components of parsley leaves (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26: 465-470.
- ❖ **Fujita Y, Hara Y, Suga C and Morimoto T.** 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports* 1(2): 61-63.
- ❖ **Furuya T, Syono K and Ikuta A.** 1972. Isolation of berberine from callus tissue of *Coptis japonica*. *Phytochemistry* 11: 175.
- ❖ **Gala R, Mita G and Caretto S.** 2005. Improving α -tocopherol production in plant cell cultures. *Journal of Plant Physiology* 162: 782-784.
- ❖ **Galaviz A, Galaviz C, Galaviz L y Duarte C.** 1994. Flora medicinal Pima de Yecora, Sonora. In: C. Zolla. Flora medicinal indígena de México: treinta y cinco monografías del atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I. Instituto Nacional Indigenista. México. pp: 90-105.
- ❖ **Gao L, Wei X, Zheng S, Shen X and Su Y.** 2002. Studies on chemical constituents of *Rumex patientia*. *Zhongcaoyao* 33(3): 207-209.
- ❖ **García Aldrete Alfonso (Dr.).** 2007. Departamento de Zoología, Colección Nacional de Insectos (CNIN), Colección de Psocoptera, Instituto de Biología, UNAM.
- ❖ **García J, Mpondo E, Chulia AJ, Kaouadji M and Cartier G.** 1989. Two phthalide glucosides from *Gentiana pyrenaica*. *Phytochemistry* 28(6): 1759-1760.

- ❖ **Gardeli C, Papageorgiou V, Mallouchos A, Theodosis K and Komaitis M.** 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* 107(3): 1120-1130.
- ❖ **Gbolade AA and Lockwood GB.** 1990. Metabolic studies of volatile constituents in tissue cultures of *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman. *Journal of Plant Physiology* 135: 198-202.
- ❖ **Gbolade AA and Lockwood GB.** 1991. Growth and production of volatile substances by *Melissa officinalis* and *Petroselinum crispum* cultures. *Fitoterapia* 62(3): 237-242.
- ❖ **Gbolade AA y Lockwood GB.** 1999. XIX *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman (Parsley): *in vitro* culture, production and metabolism of volatile constituents. In: YPS Bajaj. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 43. Medicinal and Aromatic Plants XI. Springer-Verlag. Berlin. pp: 324-336.
- ❖ **George EF and Sherrington PD.** 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories. Exegetics Ltd. England.
- ❖ **George EF.** 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2nd Edition. Exegetics Limited.
- ❖ **Ghannadi A, Tavakoli N and Mehri-Ardestani M.** 2003. Volatile constituents of the leaves of *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd. from Bushehr, Iran. *Journal of Essential Oil Research* 15(3): 191-192.
- ❖ **Gibson DM, Ketchum RE, Vance NC and Christen AA.** 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific Yew). *Plant Cell Reports* 12: 479-482.
- ❖ **Gijbels MJ, Bos R, Scheffer JJ and Svendsen AB.** 1983. Phthalides in roots of *Opopanax chironium*. *Planta Medica* 47(1): 3-6.
- ❖ **Gijbels MJ, Fischer FC, Scheffer JJ and Svendsen AB.** 1984. Phthalides in roots of *Capnophyllum peregrinum* and *Peucedanum ostruthium*. *Planta Medica* 50(1): 110.
- ❖ **Gijbels MJ, Fischer RC, Scheffer JJ and Svendsen AB.** 1985. Phthalides in roots of *Apium graveolens*, *A. graveolens* var. *rapaceum*, *Bifora testiculata* and *Petroselinum crispum* var. *tuberosum*. *Fitoterapia* 56(1): 17-23.
- ❖ **Gijbels MJ, Scheffer JJ and Svendsen AB.** 1979. Phthalides in Umbelliferae. *Rivista Italiana EPPOS* 51: 335-341.
- ❖ **Gijbels MJ, Scheffer JJ and Svendsen AB.** 1981. Analysis of phthalides from Umbelliferae by combined liquid-solid and gas-liquid chromatography. *Chromatographia* 14(8): 452-454.
- ❖ **Gijbels MJ, Scheffer JJ and Svendsen AB.** 1982. Occurrence and prevention of isomerization of ligustilide during gas-liquid chromatography on packed columns. *Chromatographia* 15(6): 358-360.
- ❖ **Gijbels MJ, Scheffer JJ and Svendsen AB.** 1982. Phthalides in the essential oil from roots of *Levisticum officinale*. *Planta Medica* 44: 207-211.
- ❖ **Gillespie SG y Duszynski JN.** 1998. Phthalides and monoterpenes of the hexane extracts of the roots of *Ligusticum porteri*, *L. filicinum* and *L. tenuifolium*. *Planta Medica* 64: 392.
- ❖ **Gläbgen WE, Wray V, Strack D, Metzger JW and Seitz HU.** 1992. Anthocyanins from cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Phytochemistry* 31(5): 1593-1601.
- ❖ **Gong FJ, Lu XC, Chen L and Wang YW.** 2006. Chemical constituents of volatile oils of *Chaenomeles thibetica*. *Zhongcaoyao* 37(11): 1634-1635.

- ❖ **González M, González S y Herrera Y.** 1991. Listados florísticos de México. IX Flora de Durango. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp: 167.
- ❖ **Gören AC, Bilsel G, Altum M, Satil F and Dirmenci T.** 2003. Fatty acid composition of seeds of *Satureja timbra* and *S. cuneifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung* 58c: 502-504.
- ❖ **Grayer RJ, Chase MW and Simmonds MS.** 1999. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Byochemical Systematics and Ecology* 27(4): 369-393.
- ❖ **Grech JN, Li Q, Roufogalis BD and Duke CC.** 1994. Novel Ca²⁺-ATPase inhibitors from the dried root tubers of *Polygonum multiflorum*. *Journal of Natural Products* 57(12): 1682-1687.
- ❖ **Gros EG, Pomilio AB, Seldes AM y Burton G.** 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington DC.
- ❖ **Guan W, Li S, Yan R and Huang Y.** 2006. Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Levl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research, Part B: Bioactive Natural Products* 20(11): 992-998.
- ❖ **Guenther E.** 1942. The essential oils. Vol. I. D. van Nostrand Co, Inc. New York, USA. pp: 77-83.
- ❖ **Guo FQ, Huang LF, Zhou SY, Zhang TM and Liang YZ.** 2006. Comparison of the volatile compounds of *Atractylodes* medicinal plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 570: 73-78.
- ❖ **Guo FQ, Liang YZ, Xu CJ, Huang LF and Li XN.** 2004. Comparison of the volatile constituents of *Artemisia capillaris* from different locations by gas chromatography-mass spectrometry and projection method. *Journal of Chromatography A* 1054: 73-79.
- ❖ **Gupta BD, Banerjee SK and Handa KL.** 1975. Coumarins of *Ligusticum elatum*. *Phytochemistry* 14: 598.
- ❖ **Gurney KA, Evans LV and Robinson DS.** 1992. Purine alkaloid production and accumulation in cocoa callus and suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* 43(6): 769-775.
- ❖ **Gutierrez AN, Bardón A, Catalán CA, Gedris TB and Herz W.** 2001. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Dasynaphia multicrenulata* from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology* 29(6): 633-647.
- ❖ **Habibi Z, Reza H and Ghahremanzadeh R.** 2006. Composition of the essential oils of *Ferula szowitsiana* DC., *Artemisia squamata* L. and *Rhabdosciadium petiolare* Boiss. & Hausskn. ex Boiss. three Umbelliferae herbs growing wild in Iran. *Journal of Essential Oil Research* 18(5): 503-505.
- ❖ **Hagemeyer J, Batz O, Schmidt J, Wray V, Hahlbrock K and Strack D.** 1999. Accumulation of phthalides in elicitor-treated cell suspension cultures of *Petroselinum crispum*. *Phytochemistry* 51: 629-635.
- ❖ **Hamerski D, Beier RC, Kneusel RE, Matern U and Himmelspach K.** 1990. Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of *Ammi majus*. *Phytochemistry* 29(4): 1137-1142.
- ❖ **Han M, Yang X and Jin Y.** 2006. Chemical constituents of the essential oil from the whole plants of *Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 18(1): 65-68.

- ❖ **Han M, Yang X and Jin Y.** 2006. Chemical constituents of the essential oil from the whole plants of *Anoectochilus roxburghii* (Wall) Lindl. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 18(1): 65-68.
- ❖ **Harborne JB.** 1973. *Phytochemical methods*. Chapman and Hall Ltd. London, UK. pp: 92-103
- ❖ **Hauptmann RM, Widholm JM and Paxton JD.** 1985. Benomyl: a broad-spectrum fungicide for use in plant cell and protoplast culture. *Plant Cell Reports* 4:129-132.
- ❖ **Hawkes JG, Maxted N and Ford-Lloyd BV.** 2000. The *ex situ* conservation of plant genetic resources. Kluwer Academic Press. Boston. USA.
- ❖ **He ZM, Meng XY, Bao YL, Wu Y, Zhu HY and Li YX.** 2007. Antivirus effect of volatile oil from *Senecio cannabifolius* Less. and its constituents analysis. *Fenxi Huaxue* 35(10): 1513-1516.
- ❖ **Heble MR and Staba E.** 1980. Steroid metabolism in stationary phase cell suspensions of *Dioscorea deltoidea*. *Planta Medica suppl*: 124-128.
- ❖ **Hegnauer R.** 1971. Chemical patterns and relationships of Umbelliferae. In: VH Heywood. The biology and chemistry of the Umbelliferae. Linnean Society of London. Academic Press Inc. London. pp: 267-277.
- ❖ **Heimbegner JL, Beck CE and Beck JJ.** 2004. Antibacterial activity of several benzylidenephtalide derivates. *Journal of Undergraduate Chemistry Research* 4: 141-143.
- ❖ **Heinstein PF.** 1985. Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell cultures. *Journal of Natural Products* 48: 1-9.
- ❖ **Heinstein PF.** 1985. Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cell suspension cultures. *Journal of Natural Products* 48(1): 1-9.
- ❖ **Hernández-Domínguez E, Campos-Tamayo F and Vázquez-Flota F.** 2004. Vindoline synthesis in *in vitro* shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Letters* 26: 671-674.
- ❖ **Hernández-Xolocotzi, E.** 1993. Aspects of plant domestication in Mexico: a personal view, En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.). *Biological diversity of Mexico. Origins and distribution*. Oxford University Press. New York. USA.
- ❖ **Hethelyi EB and Galambosi B.** 2002. Determination of essential oil composition in *Ligusticum scoticum* L. by GC, GC/MS techniques. *Olaj, Szappan, Kozmetika* 51(4): 148-154.
- ❖ **Heywood VH.** 1971. The biology and chemistry of the Umbelliferae. Linnean Society of London by Academic Press Inc. London.
- ❖ **Hiraoka N, Tabata M and Konoshima M.** 1973. Formation of acetyltopine in *Datura* callus cultures. *Phytochemistry* 12: 795-799.
- ❖ **Hiraoka N.** 1989. *Bupleurum falcatum* L.: embryogenesis and the production of saikosaponins. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 7. Medicinal and Aromatic Plants II*. Springer-Verlag. Berlin. pp: 69-81.
- ❖ **Hon PM, Lee CM, Choang TF, Chui KY and Wong HN.** 1990. A ligustilide dimer from *Angelica sinensis*. *Phytochemistry* 29(4): 1189-1191.
- ❖ **Hook IL.** 1994. *Taraxacum officinale* Weber (Dandelion): *In vitro* culture, micropropagation and the production of volatile metabolites. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture Forestry. Vol. 26. Medicinal and Aromatic Plants VI*. Springer-Verlag. Berlin. pp: 356-369.

- ❖ **Hou YZ, Zhao GR, Yuan YJ, Zhu GG and Hiltunen R.** 2005. Inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation by extract of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 140-144.
- ❖ **Huang LF, Wu MJ, Zhong KJ, Sun XJ, Liang YZ, Dai YH, Huang KL and Guo FQ.** 2007. Fingerprint developing of coffee flavor by gas chromatography-mass spectrometry and combined chemometrics methods. *Analytica Chimica Acta* 588: 216-223.
- ❖ **Huang LF, Zhong KJ, Sun XJ, Wu MJ, Huang KL, Liang YZ, Guo FQ and Li YW.** 2006. Comparative analysis of the volatile components in cut tobacco from different locations with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and combined chemometric methods. *Analytica Chimica Acta* 575: 236-245.
- ❖ **Huang W, Kong D and Yang P.** 2004. Studies on chemical constituents from stem of *Clematis arandii*. *Zhongcaoyao* 35(6): 621-622.
- ❖ **Hudaib M and Aburjai T.** 2007. Volatile components of *Thymus vulgaris* L. from wild-growing and cultivated plants in Jordan. *Flavour and Fragrance Journal* 22(4): 322-327.
- ❖ **Huerta C.** 1997. La herbolaria: mito o realidad. *Biodiversitas* 12: 1-7.
- ❖ **Hurtado DV y Merino ME.** 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. pp: 44-47.
- ❖ **Hussain SF, Guinaudeau H and Shamma M.** 1988. Two spirobenzylisoquinoline alkaloids from *Corydalis stewartii*. *Journal of Natural Products* 51(6): 1136-1139.
- ❖ **Huxley A, Griffiths M and Levy M.** 1999. The New Royal Horticultural Society. Dictionary of Gardening. London. Macmillan Reference Limited. NY.
- ❖ **Ignacimuthu S, Arockiasamy S, Antonysamy M and Ravichandran P.** 1999. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 131-137.
- ❖ **Inoue K, Nayeshiro H, Inouye H and Zenk M.** 1981. Anthraquinones in cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Phytochemistry* 20(7): 1693-1700.
- ❖ **Ivanova A, Kostova I, Navas HR and Villegas J.** *Volatile components of some Rutaceae species.* *Zeitschrift fur Naturforschung, C* 59(3-4): 169-173.
- ❖ **Jager AK, Schottlander B, Smitt UW and Nyman U.** 1993. Somatic embryogenesis in cell cultures of *Thapsia garganica*. *Plant Cell Reports* 12: 517-520.
- ❖ **Jaimand K, Sharifi E and Dini M.** 2006. Chemical constituents of the leaf and seed oils of *Peucedanum officinale* L. cultivated in Iran. *Journal of Essential Oil Research* 18(6): 670-671.
- ❖ **Jakupovic J, Schuster A, Sun H, Bohlmann F and Bhakuni DS.** 1987. Prenylated phthalides from *Anaphalis araneosa* and *Helichrysum platypterum*. *Phytochemistry* 26(2): 580-581.
- ❖ **Jalali-Heravi M, Zekavat B and Serechti H.** 2007. Use of gas chromatography-mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian cumin and caraway. *Journal of Chromatography A* 1143(1-2): 215-226.
- ❖ **Jasrai YT, Barot SM and Mehta AR.** 1992. Plant regeneration through somatic embryogenesis in hypocotyl explants of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29: 57-60.
- ❖ **Javidnia K, Miri R, Edraki N, Khoshneviszadeh M and Javidnia A.** 2006. Constituents of the volatile oil of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss. from Iran. *Journal of Essential Oil Research* 18(5): 548-550.

- ❖ **Jirovetz L, Buchbauer G, Stoyanova AS, Georgiev EV and Damianova ST.** 2003. Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3854-3857.
- ❖ **John AJ, Karunakaran VP, George V and Sethuraman MG.** 2007. Chemical composition of leaf and fruit oils of *Heracleum candolleianum*. *Journal of Essential Oil Research* 19(4): 358-359.
- ❖ **Johnson T, Ravishankar GA and Venkataraman LV.** 1990. *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. *Plant Science* 70: 223-2339.
- ❖ **Ka MH, Choi EH, Chun HS and Lee KG.** 2005. Antioxidant activity of volatile extracts isolated from *Angelica tenuissima* roots, peppermint leaves, pine needles and sweet flag leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4124-4129.
- ❖ **Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H and Shimomura K.** 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* 5: 239-242.
- ❖ **Kameoka H, Sagara K and Nakahara S.** 1991. Aroma constituents of medicinal herb of Umbelliferae (Byakushi, Hamabofu). *Yukagaku* 40(3): 216-220.
- ❖ **Kaouadji M and Pouget C.** 1986. Additional phthalide derivatives from *Meum athamanticum*. *Journal of Natural Products* 49(1): 184-185.
- ❖ **Kaouadji M, De Pachtere F, Pouget C, Chulia AJ.** 1986. Three additional phthalide derivatives, an epoxy monomer and two dimers, from *Ligusticum wallichii* rhizomes. *Journal of Natural Products* 49(5): 872-877.
- ❖ **Kaouadji M, Puech-Baronnat M et Mariotte AM.** 1983(b). (Z) ligustilidiol, nouveau phthalide hydroxyle isole de *Ligusticum wallichii* Franch. *Tetrahedron Letters* 24(43): 4675-4676.
- ❖ **Kaouadji M, Reutenauer H, Chulia AJ et Marsura A.** 1983(a). (Z, Z') diligustilide, nouveau phthalide dimere isole de *Ligusticum wallichii* Franch. *Tetrahedron Letters* 24(43): 4677-4678.
- ❖ **Kapoor SK, Kohli JM, Sharma YN and Zaman A.** 1972. Extractives of *Ligusticum elatum*. *Phytochemical Reports* 11: 477.
- ❖ **Karagiannis S, Lanaridis P and Salaha MJ.** 2000. Determination of benzothiazole in grapes and wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 34(2): 69-73.
- ❖ **Karim H, Kamel M, Mouna BT, Thouraya C and Brahim M.** 2007. Essential oil composition of *Hypericum triquetrifolium* Turra. aerial parts. *Italian Journal of Biochemistry* 56(1): 40-46.
- ❖ **Karonen M, Haemaelainen M, Nieminen R, Kilka KD, Loponen J, Ovcharenko VV, Moilanen E and Pihlaja K.** 2004. Phenolic extractives from the bark of *Pinus sylvestris* L. and their effects on inflammatory mediators nitric oxide and prostaglandin E2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2(25): 7532-7540.
- ❖ **Kasting R, Andersson J and von Sydow E.** 1972. Volatile constituents in leaves of parsley. *Phytochemistry* 11: 2277-2282.
- ❖ **Kato T, Kobayashi M, Sasaki N, Kitahara Y and Takahashi N.** 1978. The coumarin heraclenol as a growth inhibitor in parsley seeds. *Phytochemistry* 17(1): 158-159.
- ❖ **Kaul PN, Mallavarapa GR and Chamoli RP.** 1996. The essential oil composition of *Angelica glauca* roots. *Planta Medica* 62: 80-81.

- ❖ **Kawanishi K, Uhara Y and Hashimoto Y.** 1982. Shihunine and dihydroshihunine from *Banisteriopsis caapi*. *Journal of Natural Products* 45(5): 637-639.
- ❖ **Kawata J, Kameda M and Miyazawa M.** 2007. Constituents of essential oil from the dried fruits and stems of *Akebia quinata* (Thunb.) Decne. *Journal of Oleo Science* 56(2): 59-63.
- ❖ **Khan MN, Munawar MA, Mahmud S, Qureshi AK and Rehman S.** 2007. Characterization of essential oil of local varieties of *Citrus grandis*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 29(3): 272-274.
- ❖ **Khin T, Zhang Q, Yang J and Wang Q.** 2007. GC-MS analysis of non-polar compounds from the stem barks of three species of *Cinnamomum*. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao* 38(3): 203-207.
- ❖ **Kim MR, Abd El-Aty AM, Kim IS and Shim JH.** 2006. Determination of volatile flavor components in Danggui cultivars by solvent free injection and hydrodistillation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A* 1116: 259-264.
- ❖ **Kinnersley AM and Dougall DK.** 1980. Increase in anthocyanin yield from wild-carrot cell cultures by a selection system based on cell-aggregate size. *Planta* 149(3): 200-204.
- ❖ **Kitajima J, Ishikawa T and Satoh M.** 2003. Polar constituents of celery seed. *Phytochemistry* 64: 1003-1011.
- ❖ **Kitamura Y, Ikenaga T, Ooe Y, Hirakoa N and Mizukami H.** 1998. Induction of furanocoumarins biosynthesis in *Glehnia littoralis* cell suspension cultures by elicitor treatment. *Phytochemistry* 48(1): 113-117.
- ❖ **Kobaisy M, Tellez MR, Khan IA and Schaneberg BT.** 2005. Essential oil composition of three Italian species of *Ephedra*. *Journal of Essential Oil Research* 17(5): 542-546.
- ❖ **Kobayashi M and Mitsuhashi H.** 1987. Studies on the constituents of Umbelliferae plants. XVII. Structures of three new ligustilide derivatives from *Ligusticum wallichii*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 35(12): 4789-4792.
- ❖ **Kobayashi M, Fujita M and Mitsuhashi H.** 1987. Studies on the constituents of Umbelliferae plants. XV. Constituents of *Cnidium officinale*: Occurrence of pregnenolone, coniferylferulate and hydroxyphthalides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 35(4): 1427-1433.
- ❖ **Kobayashi S, Mimura Y, Naitoh T, Kimura I and Kimura M.** 1993. Chemical structure-activity of *Cnidium* rhizome-derived phthalides for the competence inhibition of proliferation in primary cultures of mouse aorta smooth muscle cells. *Japanese Journal of Pharmacology* 63: 353-359.
- ❖ **Kokubun T and Harborne JB.** 1995. Phytoalexin induction in the sapwood of plants of the Maloideae (Rosaceae): biphenyls or dibenzofurans. *Phytochemistry* 40(6): 1649-1654.
- ❖ **Kondo T, Taniguchi M, Shibano M, Wang NH and Baba K.** 2008. Coumarins from the roots of *Ligusticum multivittatum*. *Journal of Natural Medicines* 62(1): 87-90.
- ❖ **Kornfeld A, Kaufman PB, Lu CR, Gibson DM, Bolling SF, Warber SL, Chang SC and Kirakosyan A.** 2007. The production of hypericins in two selected *Hypericum perforatum* shoot cultures is related to differences in black gland structure. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 24-32.
- ❖ **Kovacevic NN, Simic MD and Ristic MS.** 2007. Essential oil of *Laurus nobilis* from Montenegro. *Chemistry of Natural Compounds* 43(4): 408-411.
- ❖ **Kreydiyyeh SI and Usta J.** 2002. Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 353-357.

- ❖ **Kuang X, Du JR, Liu YX, Zhang GY and Peng HY.** 2007. Postischemic administration of Z-ligustilide ameliorates cognitive dysfunction and brain damage induced by permanent forebrain ischemia in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 88(3): 213-221.
- ❖ **Kuang X, Yao Y, Du JR, Liu YX, Wang CY and Qian ZM.** 2006. Neuroprotective role of Z-ligustilide against forebrain ischemic injury in ICR mice. *Brain Research* 1102: 145-153.
- ❖ **Kubeczka KH and Ullmann I.** 1981. Terpenoids of the essential oil from *Molopospermum peloponnesiacum* roots. *Phytochemistry* 20(4): 828-830.
- ❖ **Kumazawa K, Wada Y and Masuda H.** 2007. Characterization of potent odorants in hand-squeezed and heat processed citrus juices. *Shokuhin Kagaku Kogaku Kogakkai* 54(6): 266-273.
- ❖ **Kurkcuoglu M, Iscan G, Ozek T, Baser KH and Alan S.** 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Calamintha betulifolia* Boiss. et Bal. *Journal of Essential Oil Research* 19(3): 285-287.
- ❖ **Kurobayashi Y, Kouno E, Fujita A, Morimitsu Y and Kubota K.** 2006. Potent odorants characterize the aroma quality of leaves and stalks in raw and boiled celery. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 70(4): 958-965.
- ❖ **Kurucu S, Koyuncu M, Guven A, Baser KH and Ozek T.** 1993. The essential oils of *Rhus coriaria* L. (Sumac). *Journal of Essential Oil Research* 5(5): 481-6.
- ❖ **Kwon JH and Ahn YJ.** 2002. Acaricidal activity of butyldenephthalide identified in *Cnidium officinale* rhizome against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4479-4483.
- ❖ **Lakon G.** 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiology* 24(3): 389-394.
- ❖ **Lamarti A, Badoc A and Bouriquet R.** 1991. A chemotaxonomic evaluation of *Petroselinum crispum* (Mill.) A. W. Hill (parsley) marketed in France. *Journal of Essential Oil Research* 3: 425-433.
- ❖ **Lan YK, Nie JY and Li ZL.** 2004. Structural characterization of some components of *Peucedanum decursivum* Maxim and the estimation and prediction of their retention time. *Jingxi Huagong* 21(5): 342-348.
- ❖ **Lane N, Weidenhamer JD and Romeo JT.** 2004. *Zapoteca Formosa*: sulfur chemistry and phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology* 30(2): 425-437.
- ❖ **Lao SC, Li SP, Kan KW, Li P, Wan JB, Wang YT, Dong TT and Tsim KW.** 2004. Identification and quantification of 13 components in *Angelica sinensis* (Danggui) by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pressurized liquid extraction. *Analytica Chimica Acta* 526: 131-137.
- ❖ **Lee HJ, Park ER and Kim KS.** 2000. Volatile flavor components in various varieties of apple (*Malus pumila* M.). *Han'guk Sikip'um Yongyang Kwahak Hoechi* 29(4): 597-605.
- ❖ **Lee JY, Lee JY, Yun BS and Hwang BK.** 2004. Antifungal activity of β -asarone from rhizomes of *Acorus gramineus*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 52(4): 776-780.
- ❖ **Lee S, Kim BK, Cho SH and Shin KH.** 2002. Phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*. *Archives of Pharmacal Research* 25(3): 280-284.
- ❖ **Lemmich J, Petersen PA and Nielsen BE.** 1971. Coumarins and terpenoids of the fruits of *Ligusticum seguieri*. *Phytochemistry* 10(12): 3333-3334.

- ❖ **Letchamo W, Korolyk EA and Tkachev AV.** 2005(b). Chemical screening of essential oil bearing flora of Siberia V. Composition of the essential oil of *Chaerophyllum prescottii* DC tops from Altai region. *Journal of Essential Oil Research* 17(5): 560-562.
- ❖ **Letchamo W, Korolyuk EA and Tkachev AV.** 2005(a). Chemical screening of essential oil bearing flora of Siberia III. Composition of the essential oil of *Sium latifolium* L. tops from Altai region. *Journal of Essential Oil Research* 17(4): 396-397.
- ❖ **Letchamo W, Korolyuk EA and Tkachev AV.** 2005(c). Chemical screening of volatile oil bearing flora of Siberia VI. Composition of the essential oil of *Kitagawia baicalensis* (Redow. ex Willd.) Pimenov flowering tops from Altai region. *Journal of Essential Oil Research* 17(5): 577-578.
- ❖ **Li C, Guo F, Liang Y and Huang L.** 2005. Analysis of constituents of essential oil from *Angelica sinensis* with GC-MS method. *Jingxi Huagong Zhongjianti* 35(4): 73-74.
- ❖ **Li H y Kurata K.** 2005. Static suspension culture of carrot somatic embryos. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99(3): 300-302.
- ❖ **Li H, Murch SJ and Saxena PK.** 2000. Thidiazuron-induced *de novo* shoot organogenesis on seedlings, etiolated hypocotyls and stem segments of Huang-qin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 62: 169-173.
- ❖ **Li HX, Ding MY and Yu JY.** 2002. Separation and identification of the phthalic anhydride derivatives of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by GC-MS, TLC, HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Chromatographic science* 40: 156-161.
- ❖ **Li RZ, Zhu ZX, Huang XI and Wu HQ.** 2007. Comparison of constituents of essential oil from *Herba lycopi* by supercritical-CO₂ fluid extraction and steam distillation. *Fenxi Ceshi Xuebao* 26(4): 548-551.
- ❖ **Li SL, Lin G and Tam YK.** 2006. Time-course accumulation of main bioactive components in the rhizome of *Ligusticum chuanxiong*. *Planta Medica* 72: 278-280.
- ❖ **Li XH and McLaughlin JL.** 1989. Bioactive compounds from the root of *Myrsine africana*. *Journal of Natural Products* 52(3): 660-662.
- ❖ **Li Y, Xu C, Zhang Q, Yan Liu J and Xiang Tan R.** 2005. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 98: 329-333.
- ❖ **Li YH, Peng SL, Zhou Y, Yu KB and Ding LS.** 2006. Two new phthalides from *Ligusticum chuanxiong*. *Planta Medica* 72: 652-656.
- ❖ **Liang MJ and He LC.** 2006. Inhibitory effects of ligustilide and butylidenephthalide on bFGF-stimulated proliferation of rat smooth muscle cells. *Acta Pharmaceutica Sinica* 41(2): 161-165.
- ❖ **Liang Mj, He LC and Yang GD.** 2005. Screening, analysis and *in vitro* vasodilatation of effective components from *Ligusticum chuanxiong*. *Life Sciences* 78: 128-133.
- ❖ **Liang Y, Dian LH, Fan KY, Guo BJ and Song YP.** 2005. GC-MS analysis of volatile constituents of *Glycyrrhiza uralensis*. *Xibeo Yaoxue Zazhi* 20(1): 3-5.
- ❖ **Liberra K, Jansen R and Lindequist U.** 1998. Corollosporine, a new phthalide derivative from the marine fungus *Corollospora maritima* Wederm. 1069. *Pharmazie* 53(8): 578-581.
- ❖ **Lim LS, Shen P, Gong YH and Yong EL.** 2006. Dimeric progestins from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry* 67: 728-734.

- ❖ **Lin G, Chan SS, Chung HS and Li SL.** 2005. Chemistry and biological activities of naturally occurring phthalides. In: Atta-ur-Rahman (ed). *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 32. Part 12. Bioactive Natural Products (part L). Elsevier BV. pp: 611-669.
- ❖ **Lin LZ, He XG, Lian LZ, King W and Elliot J.** 1998. Liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical change of *Z*-ligustilide. *Journal of Chromatography A* 810: 71-79.
- ❖ **Lin S, Xiao Y, Zhang Q, Shi J and Wang Z.** 2004. Studies on chemical constituents in bud of *Artemisia scoparia*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 29(5): 429-431.
- ❖ **Linares E and Bye RA.** 1987. A study of four medicinal plant complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology* 19: 153-183.
- ❖ **Liu YF, Yang XW and Wu B.** 2007. Chemical constituents of the flower buds of *Tussilago farfara*. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 16(4): 288-293.
- ❖ **Liu ZM, Niu J, Wang XM, Fang GZ and Guo YR.** 2006. Analysis of compounds in n-hexane extractives from *Chamaecyparis pisifera* heartwood. *Shengwuzhi Huaxue Gongcheng* 40(6): 25-28.
- ❖ **Lo Cantore P, Lacobellis NS, De Marco A, Capasso F and Senatore F.** 2004. Antibacterial Activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(26): 7862-7866.
- ❖ **Loizzo MR, Saab AM, Statti GA and Menichini F.** 2007. Composition and α -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. *Fitoterapia* 78(4): 323-326.
- ❖ **Lopes M, Lago JH, Moreno PR, Anders M and Henriques AT.** 2005. Volatile oil composition of *Aspidosperma cylindrocarpon* Muell. Arg. leaves. *Journal of Essential Oil Research* 17(3): 310-311.
- ❖ **Loyola-Vargas VM and Vázquez-Flota F.** 2006. An introduction to plant cell culture: Back to the future. *Methods in Molecular Biology* 318: 3-8.
- ❖ **Lozano PR, Cadwallader KR and González de Mejía E.** 2007. Identification of characteristic aroma components of mate (*Ilex paraguariensis*) tea. *ACS Symposium Series* 946: 143-152.
- ❖ **Lu J.** 2007. Analysis of volatile and semivolatile components from flower of *Elaeagnus angustifolia*. *Linye Kexue* 43(3): 122-126.
- ❖ **Lu Q, Qiu TQ and Yang H.** 2006. Ligustilide inhibits vascular smooth muscle cells proliferation. *European Journal of Pharmacology* 542: 136-140.
- ❖ **Lu ZG, Guo HZ and Li W.** 2007. Study on aromatic components of coriander root. *Huaxue Yu Nianhe* 29(2): 79-81.
- ❖ **MacLeod AJ, Macleod G and Subramanian G.** 1988. Volatile aroma constituents of celery. *Phytochemistry* 27(2): 373-375.
- ❖ **MacLeod AJ, Snyder CH and Subramanian G.** 1985. Volatile aroma constituents of parsley leaves. *Phytochemistry* 24(11): 2623-2627.
- ❖ **MacLeod G and Ames JM.** 1989. Volatile components of celery and celeriac. *Phytochemistry* 28(7): 1817-1824.
- ❖ **MacLeod G and Ames JM.** 1991. Gas chromatography-mass spectrometry of the volatile components of cooked scorzonera. *Phytochemistry* 30(3): 883-888.

- ❖ **Madigan MT, Martinko JM and Parker J.** 2004. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª Edición. Pearson Prentice Hall. México. pp: 699-711.
- ❖ **Majak W, Bai Y and Benn MH.** 2003. Phenolic amides and isoquinoline alkaloids from *Corydalis sempervirens*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 649-651.
- ❖ **Makunga NP, Jager AK and van Staden J.** 2003. Micropropagation of *Thapsia garganica* - a medicinal plant. *Cell Biology and Morphogenesis* 21: 967-973.
- ❖ **Makunga NP, Jager AK and van Staden J.** 2005. An improved system for the *in vitro* regeneration of *Thapsia garganica* via direct organogenesis – influence of auxins and cytokinins. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 271-280.
- ❖ **Makunga NP, Jager AK and van Staden J.** 2006. Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86: 77-86.
- ❖ **Malizia RA, Cardell DA, Molli JS, González S, Guerra PE and Grau RJ.** 2005. Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part I: *B. racemosa* (Ruiz et Pav.) DC and *B. linearis* (Ruiz et Pav.) Pers. Species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research* 17: 103-106.
- ❖ **Mantell SH, Pearson DW, Hazell LP and Smith H.** 1983. The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Reports* 2: 73-33.
- ❖ **Marie DE, Dejan B and Quetin-Leclercq J.** 2007. GC-MS analysis of the leaf essential oil of *Ipomea pes-caprae*, a traditional herbal medicine in Mauritius. *Natural Product Communications* 2(12): 1225-1228.
- ❖ **Martin KP.** 2004. *In vitro* propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO₂ enrichment. *Scientia Horticulturae* 102: 277-282.
- ❖ **Martin KP.** 2004. Plant regeneration through somatic embryogenesis in medicinally important *Centella asiatica* L. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 40:586-91.
- ❖ **Martínez MA, Evangelista V, Mendoza M, Morales G, Toledo G y Wong A.** 1995. Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. Cuadernos 27. Instituto de Biología. UNAM. México. p: 303.
- ❖ **Matasyoh JC, Kiplimo JJ, Karubiu NM and Hailstorks TP.** 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Satureja biflora* (Lamiaceae). *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 21(2): 249-254.
- ❖ **Mathias ME and Constance L.** 1944. Umbelliferae. *North American Flora* 28B(1): 143-148.
- ❖ **Matsumoto K, Kohno SI, Qjima K, Tezuka Y, Kadota S and Watanabe H.** 1998. Effect of methylenechloride-soluble fraction of Japanese angelica root extract, ligustilide and butyldenephtalide, on pentobarbital sleep in group-housed and socially isolated mice. *Life Sciences* 62(23): 2073-2082.
- ❖ **McCarroll NE, Protzel A, Ioannou Y, Stack HF, Jackson MA, Waters MD and Dearfield KL.** 2002. A survey of EPA/OPP and literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutation Research* 512: 1-35.
- ❖ **Meechaona R, Sengpracha W, Banditpuritat J, Kawaree R and Phutdhawong W.** 2007. Fatty acid content and antioxidant activity of Thai bananas. *International Journal of Science and Technology* 1(2): 222-228.

- ❖ **Meekijjaroenroi A, Bessiere JM and Anstett MC.** 2007. Chemistry of floral scents in four *Licuala* species (Arecaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 22(4): 300-310.
- ❖ **Meepagala KM, Sturtz G, Wedge DE, Schrader KK and Duke SO.** 2005. Phytotoxic and antifungal compounds from two Apiaceae species, *Lomatium californicum* and *Ligusticum hultenii*, rich sources of Z-ligustilide and apiol, respectively. *Journal of Chemical Ecology* 31(7): 1567-1578.
- ❖ **Melkani AB, Javed MS, Melkani KB, Dev V and Beauchamp PS.** 2006. Terpenoid composition of the essential oil from *Pimpinella acuminata* (Edgew.) CB Clarke. *Journal of Essential Oil Research* 18(3): 312-314.
- ❖ **Meng X, Li X, Zhang H and Han Y.** 2001. Analysis of the volatile oils in the flower buds of *Panax quinquefolium* L. *Fenxi Huaxue* 29(5): 542-545.
- ❖ **Meng-Hsin L, Jing-Jy C, Cha-Yui L, Yi-Jyun C and Mei-Kuang L.** 2007. Precursor-feeding strategy for the production of solanine, solanidine and solasodine by cell culture of *Solanum lyratum*. *Process Biochemistry* 42: 899-903.
- ❖ **Menut C, Mve-Mba CE, Lamaty G, Zollo PH, Tchoumboungnag F and Bessiere JM.** 1995. Aromatic plants of tropical central Africa. XVIII. Essential oils of leaf and rhizome of *Peucedanum zenkeri* Engl. from Cameroon. *Journal of Essential Oil Research* 7: 77-79.
- ❖ **Merle H, Ferriol M, Boira H and Blázquez A.** 2006. Composition of the essential oil of *Dictamnus hispanicus* from Spain. *Journal of Essential Oil Research* 18(5): 483-485.
- ❖ **Mevy JP, Bessiere Jm, greff S, Zombre G and Viano J.** 2006. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 34(7): 549-553.
- ❖ **Miguel MG and Barroso JG.** 1994. Accumulation of stress metabolites in cell suspension cultures of *Hyoscyamus albus*. *Phytochemistry* 35(2): 371-375.
- ❖ **Ming-Jiang W, Xian-Jun S, Yuan-Hui D, Fang-Qiu G, Lan-Fang H and Yi-Zeng L.** 2005. Determination of constituents of essential oil from *Angelica sinensis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Central South University of Technology* 12(4): 430-436.
- ❖ **Mitsubishi H, Muramatsu T, Nagai U, Nakano T and Ueno K.** 1963. Studies on the constituents of Umbelliferae plants. VIII. Distribution of alkyphthalides in Umbelliferae plants. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 11(10): 1317-1319.
- ❖ **Mitsubishi H, Nagai U, Muramatsu T and Tashiro H.** 1960. Studies on the constituents of Umbelliferae plants. II. Isolation of active principles of *Ligusticum* root. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 8(3): 243-245.
- ❖ **Mittermeier R y Goettsch C.** 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. En: Sarukhán, J. Y R. Dirzo (comps.). *México ante los retos de la biodiversidad*. CONABIO. México.
- ❖ **Miura Y, Fukui H and Tabata M.** 1988. Reduced inhomogeneity of *Angelica acutiloba* plants propagated clonally through somatic embryogenesis. *Planta Medica* 54(1): 79-81.
- ❖ **Miyazawa M, Tsukamoto T, Anzai J and Ishikawa Y.** 2004. Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4401-4405.

- ❖ **Mohamed-Yasseen Y.** 2002. *In vitro* regeneration, flower and plant formation from petiolar and nodal explants of culantro (*Eryngium foetidum* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 38: 423-426.
- ❖ **Mojab F, Javidnia K, Nickavar B and Yazdani D.** 2007. GC-MS analysis of the essential oils of roots and leaves of *Foeniculum vulgare* Mill. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 10(1): 36-40.
- ❖ **Mole B, Séller W and Wellmann E.** 1985. UV-induced biosynthesis of quercetin 3-*O*- β -D-glucuronide in dill cell cultures. *Phytochemistry* 24(3): 465-467.
- ❖ **Molleken U, Sinnwell V and Kubeczka KH.** 1998(a). The essential oil composition of fruits from *Smyrniium perfoliatum*. *Phytochemistry* 47(6): 1079-1083.
- ❖ **Molleken U, Sinnwell v and Kubeczka KH.** 1998(b). Essential oil composition of *Smyrniium olusatrum*. *Phytochemistry* 49(6): 1709-1714.
- ❖ **Momin RA and Nair MG.** 2001. Mosquitocidal, nematicidal and antifungal compounds from *Apium graveolens* L. seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 142-145.
- ❖ **Motto MG and Secord NJ.** 1985. Composition of the essential oil from *Asarum canadense*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 789-791.
- ❖ **Mpondo E, García J and Chulia AJ.** 1987. New phthalides from *Gentiana pedicellata*. *Planta Medica* 53: 297-298.
- ❖ **Mulabagal V and Tsay HS.** 2004. Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2(1): 29-48.
- ❖ **Mulabagal V, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CY and Tsay HS.** 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 45: 1-22.
- ❖ **Murakoshi I, Kubo A, Saito JI and Haginiwa J.** 1964. Shihunine: a new phthalide-pyrrolidine alkaloid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 12(6): 749-750.
- ❖ **Murashige T and Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- ❖ **Myazawa M, Kawata J and Yamafuji C.** 2005. Composition of the essential oil from *Nuphar pumilum* (Timm.) DC. growing in Russia. *Journal of Essential Oil Research* 17(6): 619-621.
- ❖ **Nadjafi F, Bannayan M, Tabrizi L and Rastgoo M.** 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments* 64: 542-547.
- ❖ **Naill MC and Roberts SC.** 2005. Culture of isolated single cells from *Taxus* suspensions for the propagation of superior cell populations. *Biotechnology Letters* 27: 1725-1730.
- ❖ **Naito T, Ikeya Y, Okada M, Mitsuhara H and Maruno M.** 1996. Two phthalides from *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry* 41(1): 233-236.
- ❖ **Naito T, Katsuhara T, Niitsu K, Ikeya Y, Okada M and Mitsuhashi H.** 1992(a). Two phthalides from *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry* 31(2): 639-642.
- ❖ **Naito T, Niitsu K, Ikeya Y, Okada M and Mitsuhashi H.** 1992(b). Phthalide and 2-farnesyl-6-methyl benzoquinone from *Ligusticum chuanxiong*. *Phytochemistry* 31(5): 1787-1789.

- ❖ **Nath S and Buragohain AK.** 2003. *In vitro* method for propagation of *Centella asiatica* L. urban by shoot tip culture. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 12: 167-169.
- ❖ **Nath S and Buragohain AK.** 2005. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Centella asiatica*. *Biologia Plantarum* 49(3): 411-413.
- ❖ **Navarro LC y Avendaño S.** 2002. Flora útil del municipio de Astacinga, Veracruz, México. *Polibotánica* 14: 67-84.
- ❖ **Nazemiyeh H, Razavi SM, Delazar A, Hajiboland R, Mozaffarian V, Nahar L and Sarker SD.** 2007. Essential oil composition of the umbels and fruit of *Prangos uloptera* DC. *Natural Product Communications* 2(1): 89-91.
- ❖ **Neyra L y Durand L.** 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de País. Parte II Recursos Naturales. Biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México. pp: 62-96.
- ❖ **Nguyen DT, Nguyen CB and Phan VK.** 2007. Study on the chemical composition of *Asarum petelotii* O. C. Schmidt. Of Tam Dao (Vinh Phuc). *Tap Chi Duoc Hoc* 47(9): 30-33.
- ❖ **Nik ZB and Mirza M.** 2006. Chemical composition of the essential oils of *Stachys pubescens* Ten. *Flavour and Fragrance Journal* 21(5): 757-759.
- ❖ **Nishiwaki M, Fujino K, Kosa Y, Masuda K and Kikuta Y.** 2000. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211: 756-759.
- ❖ **Nitz S, Spraul MH and Drawert F.** 1990. C₁₇ polyacetylenic alcohols as the major constituents in roots of *Petroselinum crispum* Mill. ssp. *tuberosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1445-1447.
- ❖ **Nivinskiene O, Butkiene R and Mockute D.** 2007. The seed (fruit) essential oils of *Angelica archangelica* L. growing wild in Lithuania. *Journal of Essential Oil Research* 19(5): 477-481.
- ❖ **Noé W, Langebartels C and Ulrich H.** 1980. Anthocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. *Planta* 149(3): 283-287.
- ❖ **Nogueira T, Marcelo-Curto ML, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Rubiolo P and Bicchi C.** 2008. Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linarifolium* and *Hypericum pulchrum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 36(1): 40-50.
- ❖ **O'Dowd NA, McCauley PG, Richardson DH and Wilson Graham.** 1993. Callus production, suspension culture and *in vitro* alkaloid yields of *Ephedra*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34(2): 149-155.
- ❖ **Ogawa Y, Hosaka K, Chin M and Mitsuhashi H.** 1989. Synthesis of (-)-3-butyl-4-hydroxyphthalide. *Heterocycles* 29(5): 865-872.
- ❖ **Ogunwande IA, Walker TM, Setzer WN and Essien E.** 2006. Volatile constituents from *Samanea saman* (Jacq.) Merr. Fabaceae. *African Journal of Biotechnology* 5(20): 1890-1893.
- ❖ **Ohlsson AB, Bjork L and Gatenbeck S.** 1983. Effect of light on cardenolide production by *Digitalis lanata* tissue cultures. *Phytochemistry* 22: 2447-2450.
- ❖ **Okoh OO, Sadimenko AA and Afolayan AJ.** 2007. The effects of age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinales*. *Journal of Applied Sciences* 7(23): 3806-3810.

- ❖ **Okorie DA.** 1976. A new phthalide and xanthenes from *Anthocleista djalonensis* and *Anthoclesita vogelli*. *Phytochemistry* 15: 1799-1800.
- ❖ **Okuno M, Kameoka H, Yamashita M and Miyazawa M.** 1993. Components of volatile oil from plants of Polypodiaceae. *Yukagaku* 42(1): 44-48.
- ❖ **Oncina R, Botía JM, Del río JA and Ortuño A.** 2000. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry* 70: 489-492.
- ❖ **Orav A, Kailas T and Jegorova A.** 2003. Composition of the essential oil of dill, celery, and parsley from Estonia. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry* 52(4): 147-154.
- ❖ **Orihara Y and Furuya T.** 1990. Production of theanine and other γ -glutamyl derivatives by *Camellia sinensis* cultured cells. *Plant Cell Reports* 9: 65-68.
- ❖ **Orozco Segovia Alma (Dra.).** Departamento de Ecología Funcional, Laboratorio de Ecología Fisiológica, Instituto de Ecología, UNAM.
- ❖ **Ortíz BI, Shields KM, Clauson KA and Clay PG.** 2007. Complementary and alternative medicine use among Hispanics in the United States. *The Annals of Pharmacotherapy* 41: 994-1004.
- ❖ **Oskman-Caldentey KM and Inze D.** 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9(9): 433-440.
- ❖ **Ozek G, Ozek T, Basser KH, Duran A, Sagiroglu M and Duman H.** 2006. Comparison of the essential oils of *Prangos turcica* A. Duran, M. Sagiroglu et H. Duman fruits obtained by different isolation techniques. *Journal of Essential Oil Research* 18(5): 511-514.
- ❖ **Ozek T, Kurkcuoglu M, Baser K, Husnu C and Tosun A.** 2007. Composition of the essential oils of *Tordylium trachycarpum* (Boiss.) Al-Eisawi et Jury and *Tordylium hasselquistiae*. DC. growing in Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 19(5): 410-412.
- ❖ **Palá-Paúl J, García-Jiménez R, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A and Sanz J.** 2004. Essential oil of the leaves and stems of *Meum athamanticum* Jacq. from Spain. *Journal of Chromatography A* 1036: 245-257.
- ❖ **Palá-Paúl J, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Vadaré J, Villa AM, Sanz J and Brophy JJ.** 2005(a). Essential oil composition of the different parts of *Eryngium bougatii* Gouan from Spain. *Journal of Chromatography A* 1074: 235-239.
- ❖ **Palá-Paúl J, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Vadaré J, Villa AM, Sanz J and Brophy JJ.** 2005(b). Analysis of the essential oil composition from the different parts of *Eryngium glaciale* Boiss. from Spain. *Journal of Chromatography A* 1094: 179-182.
- ❖ **Pant B, Kohda H and Namera A.** 1996. Clonal propagation of *Cnidium officinale* by shoot tip culture. *Planta Medica* 62: 281-283.
- ❖ **Panter KL, Ashley RE, Guernsey KM and Johnson CM.** 2004. Preliminary studies on propagation of osha. *Hort Technology* 14(1): 141-143.
- ❖ **Paramageetham C, Babu GP and Rao JV.** 2004. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. an important medicinal and nutraceutical plant of India. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79: 19-24.
- ❖ **Parr AJ.** 1989. The production of secondary metabolites by plant cell cultures. *Journal of Biotechnology* 10: 1-26.

- ❖ **Passreiter CM, Akhtar Y and Isman MB.** 2005. Insecticidal activity of the essential oil of *Ligusticum mutellina* roots. *Zeitschrift für Naturforschung* 60: 411-414.
- ❖ **Pavlovic M, Kovacevic N, Tzakou O and Couladis M.** 2007. Composition of the essential oils from the aerial parts of five wild growing *Valeriana* species. *Journal of Essential Oil Research* 19(5): 433-438.
- ❖ **Pawlus AD, Su BN, Keller WJ and Kinghorn AD.** 2005. An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). *Journal of Natural Products* 68(12): 1720-1722.
- ❖ **Pei Y, Li YB, Wang D and Fan F.** 2006. GC-MS analysis of volatile oils from fruits of *Viburnum sargentii* Koehne. *Zhongcaoyao* 37(9): 1320-1321.
- ❖ **Pen R.** 2002. Effects of hormone proportion on different adventitious buds explant of *Ligusticum chuanxiong*. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 25(3): 160-161.
- ❖ **Peng HY and Yang XE.** 2005. Volatile constituents in the flowers of *Elsholtzia argyi* and their variation: a possible utilization of plant resources after phytoremediation. *Journal of Zhejiang University Science* 6B(2): 91-95.
- ❖ **Peng HY, Du JR, Zhang GY, Kuang X, Liu YX, Qian ZM and Wang CY.** 2007. Neuroprotective effect of Z-ligustilide against permanent focal ischemic damage in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30(2): 309-312.
- ❖ **Pepalla SB, Jammula SR, Telikepalli H, Bhattiprolu KR and Rao KV.** 1991. A naphthalene glucoside lactone from *Rhamnus wightii*. *Phytochemistry* 30(12): 4193-4194.
- ❖ **Pérez-Silva A, Odoux E, Brat P, Ribeyre F, Rodríguez-Jimenes G, Robles-Olvera V, García-Alvarado MA and Günata Z.** 2006. GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. *Food Chemistry* 99(4): 728-735.
- ❖ **Peterson A.** 1962. Larvae of insects. An introduction to nearctic species. Part I Lepidoptera and plant infesting Hymenoptera. Edwards Brothers. Columbus, Ohio, USA.
- ❖ **Phillipson JD.** 1973. Alkaloids from *Papaver fugax* of turkish origin. *Phytochemistry* 12(10): 2431-2434.
- ❖ **Piao XL, Park JH, Cui J, Kim DH and Yoo HH.** 2007. Development of gas chromatographic/mass soectrometry-pattern recognition method of the quality control of Korean Angelica. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44: 1163-1167.
- ❖ **Pimenov MG and Leonov MV.** 1993. The genera of the Umbelliferae. A nomenclator. Royal Botanic Gardens Kew, UK and Botanical Garden of Moscow University, Russia. pp: 70.
- ❖ **Pino JA, Marbot R, Bello A and Urquiola A.** 2004. Essential oils of *Piper peltatum* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 16(2): 124-126.
- ❖ **Pino JA, Marbot R, Marti MP.** 2006. Leaf oil of *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* CV. Duke grown in Cuba. *Journal of Essential Oil Research* 18(4): 440-442.
- ❖ **Plunkett GM and Downie SR.** 1999. Major lineages within Apiaceae subfamily Apioideae: a comparison of chloroplast restriction site and DNA sequence data. *American Journal of Botany* 86(7): 1014-1026.
- ❖ **Plunkett GM, Soltis DE and Soltis PS.** 1997. Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *matK* and *rbcL* sequence data. *American Journal of Botany* 84(4): 565-580.

- ❖ **Potterat O and Hamburger M.** 2007. *Morinda citrifolia* (noni) fruit – Phytochemistry, pharmacology, safety. *Planta Medica* 73: 191-199.
- ❖ **Prakash E, Khan SV, Meru E and Rao KR.** 2001. Somatic embryogenesis in *Pimpinella tirupatiensis* Bal. and Subr., an endangered medicinal plant of Tirumala hills. *Current Science* 81(9): 1239-1242.
- ❖ **Pushan W, Xuanliang G, Yixiong W, Fukuyama Y, Miura I and Sugawara M.** 1984. Phthalides from the rhizome of *Ligusticum wallichii*. *Phytochemistry* 23(9): 2033-2038.
- ❖ **Pyun MS and Shin S.** 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13(6): 394-400.
- ❖ **Quiroz-García B, Figueroa A, Cogordan JA and Delgado G.** 2005. Phoyocyclodimers from *Z-ligustilide*. Experimental results and FMO analysis. *Tetrahedron Letters* 46: 3003-3006.
- ❖ **Quiroz-García B, Hernández-Ortega S, Sterner O and Delgado G.** 2004. Transformations of the natural dimeric phthalide diligustilide. *Tetrahedron* 60: 3681-3688.
- ❖ **Radusiene J, Juzentiene A, Peciulyte D and Janulis V.** 2007. Essential oil composition and antimicrobial assay of *Acorus calamus* leaves from different wild populations. *Plant Genetic Resources* 5(1): 37-44.
- ❖ **Raina VK, Kumar A, Tadv A, Gupta AK and Aggarwal KK.** 2004. Composition of commercial fennel seed oils. *Indian Perfumer* 48(4): 433-436.
- ❖ **Raina VK, Srivastava SK and Syamasunder KV.** 2003. Essential oil composition of *Acorus calamus* L. from the lower region of the Himalayas. *Flavour and Fragrance Journal* 18(1): 18-20.
- ❖ **Rajasekaran T, Rajendran L, Ravishankar GA and Venkataraman LV.** 1991. Influence of nutrient stress on pyrethrin production by cultured cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Current Science* 60(12): 705-707.
- ❖ **Ramanoelina PA, Rasoarahona JR and Gaydou AM.** 2006. Chemical composition of *Ravensara aromatica* Sonn. leaf essential oils from Madagascar. *Journal of Essential Oil Research* 18(2): 215-217.
- ❖ **Randrianarivelosia M, Langlois A and Mulholland DA.** 2006. Investigations of the Malagasy species *Tachadenus longiflorus* Grisebach (Gentaniaceae): linking chemical finding and traditional usage. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 456-458.
- ❖ **Rao LJ, Nagalakshmi S, Naik JP and Shankaracharya NB.** 2000. Studies on chemical and technological aspects of celery (*Apium graveolens*. Linn) seed. *Journal of Food Science and Technology* 37(6): 631-635.
- ❖ **Rao SR and Ravishankar GA.** 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- ❖ **Rashmi DR.** 2007. Essential oil constituents of *Achyranthes aspera* leaves. *Indian Perfumer* 51(1): 33-34.
- ❖ **Razzaghi-Abyaneh M, Yoshinari T, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee MB, Nagasawa H and Sakuda S.** 2007. Dillapiol and apiol as specific inhibitors on the biosynthesis of aflatoxin G₁ in *Aspergillus parasiticus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71(9): 2329-2332.
- ❖ **Reichling J, Martin R and Kemmerer B.** 1995. Biosynthesis of pseudoisoeugenol-derivatives in liquid tissue cultures of *Pimpinella anisum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43(2): 131-136.
- ❖ **Ren P, Shen XW and Zheng SZ.** 2002. Studies on the chemical components and application of essential oils of *Elsholtzia blanda* Benth. *Xibei Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 38(3): 58-60.

- ❖ **Reza GH, Ebrahim S and Hossien H.** 2007. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of essential oil from seeds and aerial parts of *Ferulago angulata* (Schlecht.) Boiss gathered in Nevakoh and Shahoo, Zagross Mountain, west of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(5): 814-817.
- ❖ **Reza-Garduño RG.** 1987. Aislamiento y caracterización de los ftálicos de *Ligusticum porteri* C & R (Umbelliferae). Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- ❖ **Ríos MY, Delgado G and Toscazo RA.** 1998. Chemical reactivity of phthalides. Relay synthesis of diligustilide, *Rel*-(3'R)-3',8'-dihydrodilgustilide and wallichide. *Tetrahedron* 54: 3355-3366.
- ❖ **Robbins C.** 1999. Medicine from U.S. wildlands: An assessment of native plant species harvested in the United States for medicinal use and trade and evaluation of the conservation and management implications. TRAFFIC North America, The Nature Conservancy, July 1999.
- ❖ **Robbins WW, Harrington JP and Freire-Marreco B.** 1916. Ethnobotany of the Tewa Indians. Smithsonian Institution. Bureau of American Ethnology. Bulletin 55.
- ❖ **Roberts EH.** 1972. Viability of seeds. Chapman and Hall Ltd London. pp: 197-200.
- ❖ **Robins R, Payne J and Rhodes M.** 1986. Cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*; I. Growth and quinoline alkaloid production. *Planta Medica* 52(3): 220-226.
- ❖ **Robinson RW.** 1954. Seed germination problems in the Umbelliferae. *The Botanical Review* 20(9): 531-550.
- ❖ **Roca WM y Mroginski LA.** 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. pp: 19-40.
- ❖ **Romo de Vivar A.** 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa. México. pp: 59.
- ❖ **Rosselli S, Maggio A, Formisano C, Napolitano F, Senatore F, Spadaro V and Bruno M.** 2007. Chemical composition and antibacterial activity of extracts of *Helleborus bocconei* Ten. *subsp. intermedius*. *Natural Product Communications* 2(6): 675-679.
- ❖ **Rosselli S, Simmonds BM, Senatore MS, Rigano F and Formisano C.** 2007. Volatile constituents of *Scutellaria rubicunda* Hornem subsp. *linnaeana* (Caruel) Rech. (Lamiaceae) endemic in Sicily. *Biochemical Systematics and Ecology* 35(11): 797-800.
- ❖ **Ruberto G, Renda A, Amico V and Tringali C.** 2008. Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology* 99(2): 260-268.
- ❖ **Rycroft DS, Cole WJ, Aslam N, Lamont YM and Gabriel R.** 1999. Killarniensolide, methyl orsellinates and 9,10-dihydrophenanthrenes from the liverwort *Plagiochila killarniensis* from Scptland and the Azores. *Phytochemistry* 50(7): 1167-1173.
- ❖ **Sabulal B, Dan M, John A, Kurup R, Pradeep NS, Valsamma RK and George V.** 2006. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: chemical characterization and antimicrobial activity. *Phytochemistry* 67: 2469-2473.
- ❖ **Saiki Y, Akahora Y, Morinaga K, Taira T, Noro T, Fukushima S and Harada T.** 1967. Gas chromatography of natural volatile oils. III. Gas chromatography of the volatile oils of plants belonging to the *Heterotropa* genus. *Yakugaku Zasshi* 87(12): 1535-1538.
- ❖ **Saleh MM, Zwaving JH, Malingré TM and Bos R.** 1985. The essential oil of *Apium graveolens* var. *secalinum* and its cercaricidal activity. *Pharmacy World & Science* 7(6): 277-279.

- ❖ **Salehi H and Khosh-Khui M.** 1997. A simple procedure for disinfection of “Baby Masquerade” miniature rose explants. *Scientia Horticulturae* 68: 145-148.
- ❖ **Salisbury FB y Ross CW.** 1992. Plant physiology. 4th Edition. Wadsworth, Belmont, CA.
- ❖ **Samiee K, Reza M, Rustaiyan A and Masoudi S.** 2006. Composition of the volatiles of *Ferulago carduchorum* Boiss. et Hausskn. and *Levisticum officinale* Koch. obtained by hydrodistillation and extraction. *Journal of Essential Oil Research* 18(1): 19-22.
- ❖ **Sandoval E, Bye R, Ríos G and Aguilar I.** 2005. Microscopic analysis and histochemical observations of the medicinal root of *Iostephane heterophylla* (Cav.) Benth. ex Hemsl. (Asteraceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 77:65-73.
- ❖ **Sanhaji O, Faid M and Kalalou I.** 2006. Étude du pouvoir antifongique de l’huile essentielle de cannelle. *Phytothérapie* 1: 24-30.
- ❖ **Santos PA, Figueiredo AC, Oliveira MM, Barroso JG, Pedro LG, Deans SG and Scheffer JJ.** 2005. Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). *Plant Science* 168: 1089-1096.
- ❖ **Sari A and Sanyer KG.** 1997. Isolation of triniifoline, miltanthaline and some medicinally important alkaloids from *Papaver triniifolium*. *Planta Medica* 63(6): 575-576.
- ❖ **Sariyar G and Shamma M.** 1986. Six alkaloids from *Papaver* species. *Phytochemistry* 25(10): 2403-2406.
- ❖ **Sarukhán J, Soberón J y Larson-Guerra J.** 1996. Biological Conservations in a High Beta-diversity Country. In: Di Castri, F. y T. Younès (eds.). *Biodiversity Science and Development: Towards a New Partnership*. CAB International.
- ❖ **Savikin-Fodulovic KP, Zdunic GM and Tasic SR.** 2006. Essential oil of *Seseli rigidum* Waldst. et Kit. var. *rigidum*. *Journal of Essential Oil Research* 18(2): 156-157.
- ❖ **Schmeda-Hirschmann G, Jordan M, Gerth A, Wilken D, Hormazabal E and Tapia AA.** 2004. Secondary metabolite content in *Fabiana imbricata* plants and *in vitro* cultures. *Zeitschrift für Naturforschung* 59: 48-54.
- ❖ **Schmidt L.** 2000. Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed. Danida Forest Seed Centre. Hoersholm, Denmark.
- ❖ **Scott AI, Mizukami H, Hirata T and Lee SL.** 1980. Formation of catharanthine, akuammicine and vindoline in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Phytochemistry* 19: 488-489.
- ❖ **Sedy KA and Koschier EH.** 2003. Bioactivity of carvacril and thymol against *Frankliniella occidentalis* and *Tharpis tabaci*. *Journal of Applied Entomology* 127(6): 313-316.
- ❖ **Segebrecht S and Schilcher H.** 1989. Ligustilide: guiding component for preparations of *Levisticum officinale* roots. *Planta Medica* 55: 572-573.
- ❖ **Seigo F, Yukio A and Tomoyuki T.** 1969. Studies on the essential oil of green tea. I.: isolation of dihydroactinidiolide and p-vinylphenol. *The Pharmaceutical Society of Japan* 89(12): 1729-1731.
- ❖ **Senatore F, Apostolides A and Bruno M.** 2005. Volatile components of *Centaurea eryngioides* Lam. and *Centaurea iberica* Trev. var. *hermonis* Boiss. Lam., two Asteraceae growing wild in Lebanon. *Natural Product Research* 19(8): 749-754.

- ❖ **Senatore F, Formisano C, Rigano D, Piozzi F and Rosselli S.** 2007. Chemical composition of the essential oil from aerial parts of *Stachys palustris* L. (Lamiaceae) growing wild in Southern Italy. *Croatica Chemica Acta* 80(1): 135-139.
- ❖ **Sener B, Gozler B, Minard RD and Shamma M.** 1983. Alkaloids of *Fumaria vaillantii*. *Phytochemistry* 22(9): 2073-2075.
- ❖ **Sharma RK y Wakhlu AK.** 2003. Regeneration of *Heracleum candicans* Wall plants from callus cultures through organogenesis. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology* 12: 71-72.
- ❖ **Sharma RK, Wakhlu AK and Boleria M.** 2004. Micropropagation of *Anethum graveolens* L. through axillary shoot proliferation. *Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology* 13: 157-159.
- ❖ **Shi Y, He L and Wang S.** 2006. Determination of ligustilide in rat blood and tissues by capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* 20: 993-998.
- ❖ **Shi Y, Li D and Min Z.** 2006. Chemical constituent of *Zanthoxylum dimorphophyllum*. *Zhongcaoyao* 37(1): 13-15.
- ❖ **Shibano M, Okuno A, Taniguchi M, Baba K and Wang NH.** 2005. Bisabolene-type sesquiterpenes: liginvolones A-D from *Ligusticum involucreatum*. *Journal of Natural Products* 68(10): 1445-1449.
- ❖ **Shibasaki-Kitakawa N, Takeishi J and Yonemoto T.** 2003. Improvement of catechin productivity in suspension cultures of tea callus cells. *Biotechnology Progress* 19: 655-658.
- ❖ **Shields R, Robinson SJ and Anslow PA.** 1984. Use of fungicides in plant tissue culture. *Plant Cell Reports* 3: 33-36.
- ❖ **Shi-Yu Z and Kuo-Chang C.** 1989. *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels.: *In vitro* culture, regeneration and the production of medicinal compounds. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 7. Medicinal and Aromatic Plants II. Springer-Verlag. Berlin. pp: 1-22.
- ❖ **Shode FO, Mahomed AS and Rogers CB.** 2002. Typhaphtalide and typharin, two phenolic compounds from *Typha capensis*. *Phytochemistry* 61: 955-957.
- ❖ **Silva DA, Silva TM, Lins AC, Alburquerque D, Sobral JM, Neves W e Vanderlei MF.** 2006. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). *Química Nova* 29(6): 1250-1254.
- ❖ **Simionatto E, Bonano VF, Farias A, Ré N, Raposo JL, Stuker CZ, Peruzzo GM, Peres MT and Hess SC.** 2007. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18(5): 879-885.
- ❖ **Simon JE and Quinn J.** 1988. Characterization of essential oil of parsley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 467-474.
- ❖ **Singh G, Marimuthu P, De H-Helvani CD, Catalan CA.** 2006. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oeloresin, and their selected components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(1): 174-181.
- ❖ **Smitt UW, Jager AK and Nyman U.** 1996. *Thapsia garganica* L.: *In vitro* culture, somatic embryogenesis and the production of thapsigargin. In: YPS Bajaj. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 37. Medicinal and Aromatic Plants IX. Springer-Verlag. Berlin. pp: 402-409.

- ❖ **Solet JM, Simon-Ramiasa A, Cosson L and Guignard JL.** 1998. *Centella asiatica* L. Urban. (Pennywort): Cell culture, production of terpenoids and biotransformation capacity. In: YPS Bajaj. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 41. Medicinal and Aromatic Plants X. Springer-Verlag. Berlin. pp: 81-96.
- ❖ **Sondeno BJ and Panter KL.** 2004. Effects of media and mycorrhizal inoculants on osha (*Ligusticum porteri*) rooting. *Hort Science* 39(4): 860.
- ❖ **Sondeno BJ and Panter KL.** 2005. Rooting osha crown cuttings using IBA and NAA. *Hort Science* 40(4): 1120.
- ❖ **Song G, Deng C, Wu D and Hu Y.** 2004. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the essential oils of two traditional Chinese medicines, *Angelica pubescens* and *Angelica sinensis*. *Chromatographia* 59(5-6): 343-349.
- ❖ **Song L, Zhang W, Wu JR and Zhou XJ.** 2006. Chemical constituents study of *Clematis apiifolia* DC. volatile oil. *Shanghai Zhongyiyao Daxue Xuebao* 20(4): 83-84.
- ❖ **Sorensen NA.** 1968. The taxonomic significance of acetylenic compounds. In: Recent Advances in Phytochemistry. Proceedings of the Sixth Annual Symposium of the Phytochemical Society of North America. Vol. 1. Appleton-Century-Crofts. New York. pp: 186-227.
- ❖ **Spraul MH, Nitz S, Drawert F, Duddeck H and Hiegemann M.** 1992. Crispane and crispanone, two compounds from *Petroselinum crispum* with a new carbon skeleton. *Phytochemistry* 31(9): 3109-3111.
- ❖ **Stahl E and Bohrmann H.** 1967. Phthalide als Hauptbestandteile des ätherischen Öls der Früchte von *Meum athamanticum* Jacq. *Naturwissenschaften* 54(5): 118.
- ❖ **Stahl-Biskup E and Wichtmann EM.** 1991. Composition of the essential oils from roots of some Apiaceae in relation to the development of their oil duct systems. *Flavour and Fragrance Journal* 6: 249-255.
- ❖ **Staniszewska M, Kula J, Wiczorkiewicz M and Kusewicz D.** 2005. Essential oils of wild and cultivated carrots – the chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research* 17(5): 579-583.
- ❖ **Staniszewska M, Kula J, Wiczorkiewicz M and Kusewicz D.** 2005. Essential oils of wild and cultivated carrots – the chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Essential Oil Research* 17: 579-583.
- ❖ **Stebbins GL.** 1974. Flowering Plants – Evolution above the species level. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press. p: 399.
- ❖ **Steinbeck C, Schneider C, Rotscheidt K and Breitmaier E.** 1995. A 4-methyl-7-hydroxyphthalide glycoside and other constituents from *Quillaja saponaria molina*. *Phytochemistry* 40(4): 1313-1315.
- ❖ **Stevens KI and Merrill GB.** 1981. Dihydroactinidiolide – a potent growth inhibitor from *Eleocharis coloradoensis* (spikerush). *Cellular and Molecular Life Sciences* 37(11): 1133.
- ❖ **Steward FC, Ammirato PV and Mapes MO.** 1970. Growth and development of totipotent cells. Some problems, procedures and perspectives. *Annals of Botany* 34: 761-787.
- ❖ **Street HE.** 1977. Plant tissue and cell culture. 2nd edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.

- ❖ **Suárez AI, Compagnone RS, Acosta D, Vasquez L, Díaz B and Canelon DJ.** 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from oleoresin of *Protium neglectum* S. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 10(1): 70-75.
- ❖ **Suau R, Cabezudo B, Rico R, Nájera F and López-Romero JM.** 2002. Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochemical Analysis* 13: 363-367.
- ❖ **Suemitsu R, Ohnishi K, Morikawa Y and Nagamoto S.** 1995. Zinnimidine and 5-(3',3')-dimethylallyloxy)-7-methoxy-6-methylphthalide from *Alternaria porri*. *Phytochemistry* 38(2): 495-497.
- ❖ **Suemitsu R, Ohnishi K, Morikawa Y, Ideguchi I and Uno H.** 1994. Porritoxinol, a phytotoxin of *Alternaria porri*. *Phytochemistry* 35(3): 603-605.
- ❖ **Sylvestre M, Longtin AP and Legault J.** 2007. Volatile leaf constituents and anticancer activity of *Bursera simaruba* (L.) Sarg. essential oil. *Natural Product Communications* 2(12): 1273-1276.
- ❖ **Tabanca N, Demirci B, Kirimer N, Baser KH, Bedir E, Khan IA and Wedge DE.** 2005. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella aurea*, *Pimpinella corymbosa*, *Pimpinella peregrina* and *Pimpinella puberula* gathered from Eastern and Southern Turkey. *Journal of Chromatography A* 1097: 192-198.
- ❖ **Tabanca N, Demirci B, Ozek T, Kirimer N, Baser KH, Bedir E, Khan IA and Wedge DE.** 2006. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography A* 1117: 194-205.
- ❖ **Tabanca N, Demirci F, Demirci B, Wedge DE and Can KH.** 2007. Composition, enantiomeric distribution, and antimicrobial activity of *Tanacetum argenteum* subsp. *flabellifolium* essential oil. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45(5): 714-719.
- ❖ **Taiz L and Zeiger E.** 2006. *Plant Physiology*. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. p: 764.
- ❖ **Takeda K, Minato H and Ishikawa M.** 1965. Structure and absolute configuration of oplopanone, from *Oplopanax japonicus* (Nakai) Nakai. *Chemical Communications (London)* 5: 79-81.
- ❖ **Takeoka G.** 2001. Volatile constituents of asafoetida. *ACS Symposium Series* 794: 33-44.
- ❖ **Takeoka GR, Flath RA, Mon TR, Teranishi R and Guentert M.** 1990. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(2): 471-7.
- ❖ **Tal B, Rokem JS and Goldberg I.** 1983. Factors affecting growth and product formation in plant cells growing in continuous culture. *Plant Cell Reports* 2: 219-222.
- ❖ **Tao JY, Ruan YP, Mei QB, Liu S, Tian QL, Chen YZ, Zhang HD and Duan ZX.** Studies on the antiasthmatic action of ligustilide of Dang-Gui, *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 1984. *Acta Pharmaceutica Sinica* 19(8): 561-565.
- ❖ **Tawfik AA and Noga G.** 2002. Cumin regeneration from seedling derived embryogenic callus in response to amended kinetin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 35-40.
- ❖ **Tchuendem MH, Mbah JA, Tsopmo A, Ayafor JF, Sterner O, Okunji CC, Iwu MM and Schuster BM.** 1999. Anti-plasmodial sesquiterpenoids from the African *Reneilmia cincinnata*. *Phytochemistry* 52(6): 1095-1099.

- ❖ **Telci I, Toncer OG and Sahbaz N.** 2006. Yield, essential oil content and composition of *Coriandrum sativum* varieties (var. *vulgare* Alef and var. *microcarpum* DC.) grown in two different locations. *Journal of Essential Oil Research* 18(2): 189-193.
- ❖ **Tesso H, Kubeczka KH and Konig WA.** 2006. A new phthalide from the essential oil of *Meum athamanticum*. *Flavour and Fragrance Journal* 21(4): 622-625.
- ❖ **Tewari M and Mathela CS.** 2003. Compositions of the essential oils from seeds of *Carum carvi* Linn. and *Carum bulbocastanum* Koch. *Indian Perfumer* 47(4): 347-349.
- ❖ **Thakuri BC, Padalia RC, Tewari A, Chanotiya CS and Mathela CS.** 2007. α -Phellandrene rich essential oil from *Ligusticum marginatum* C.B. Clarke. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 10(1): 1-4.
- ❖ **Thappa RK, Kaul P, Chisti AM, Kapahi BK, Suri OP and Agarwal SG.** 2005. Variability in the essential oil of *Angelica glauca* Edgew of different geographical regions. *Journal of Essential Oil Research* 17: 361-363.
- ❖ **Thorpe TA.** 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* 37(2): 169-180.
- ❖ **Tiwari KN, Sharma NC, Tiwari V and Singh BD.** 2000. Micropropagation of *Centella asiatica* L., a valuable medicinal herb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 179-185.
- ❖ **Tkachev AV, Korolyuk EA and Letchamo W.** 2005. Chemical screening of essential oil bearing flora of Siberia. VII. Composition of the essential oil of *Kadenia dubia* (Schkuhr) Lavrova et V.N. Tichom. from Altai region. *Journal of Essential Oil Research* 17(6): 636-637.
- ❖ **Tkachev AV, Korolyuk EA, Köning W, Kuleshova YV and Letchamo W.** 2006. Chemical screening of volatile oil-bearing flora of Siberia VIII.: Variations in chemical composition of the essential oil of wild growing *Seseli buchtormense* (Fisch. ex Sprengel) W. Koch from different altitudes of Altai region. *Journal of Essential Oil Research* 18(1): 100-103.
- ❖ **Touafek O, Nacer A, Kabouche A, Kabouche Z and Bruneau C.** 2004. Chemical composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* cultivated in the Algerian Sahara. *Chemistry of Natural Compounds* 40(1): 28-29.
- ❖ **Triana J, Eiroa JL, López M, Ortega JJ, González AG and Barrera JB.** 2001. Sesquiterpene lactones from *Lugoa revoluta*. *Biochemical Systematics and Ecology* 29(8): 869-871.
- ❖ **Tripathi L and Tripathi JN.** 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2(2): 243-253.
- ❖ **Tsay HS and Huang HL.** 1998. Somatic embryo formation and germination from immature embryo-derived suspension-cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Plant Cell Reports* 17: 670-674.
- ❖ **Tsuchida T, Kobayashi M, Kaneko K and Mitsuhashi H.** 1987. Studies on the constituents of Umbelliferae plants. XVI. Isolation and structures of three new ligustilide derivatives from *Angelica acutiloba*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 35(11): 4460-4464.
- ❖ **Tsujiyama SI and Ueno M.** 2008. Formation of 4-vinyl guaiacol as an intermediate in bioconversion of ferulic acid by *Schizophyllum commune*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72(1): 212-215.
- ❖ **Tsukamoto T, Ishikawa Y and Miyazawa M.** 2005. Larvicidal and adulticidal activity of alkylphthalide derivatives from rhizome of *Cnidium officinale* against *Drosophila melanogaster*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5549-5553.

- ❖ **Tsukasa H and Okutu T.** 1993. Components of essential oil of Medara (*Aralia elata* Seem. var. *subinermis* Ohwi). *Yukagaku* 42(5): 404-6.
- ❖ **Tyler VE, Brady LR and Robbers JE.** 1988. Pharmacognosy. 9th Edition. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. pp: 103-138.
- ❖ **Tzakou O, Said A, Farag A and Rashed K.** 2006. Volatile constituents of *Ailanthus excelsa* Roxb. *Flavour and Fragrance Journal* 21(6): 899-901.
- ❖ **Uden W, Pras NN, Visser JF y Malingre TM.** 1989. Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures derived from *Podophyllum hexandrum* royle. *Plant Cell Reports* 8: 165-168.
- ❖ **Uhlig JW, Chang A and jen JJ.** 1987. Effect of phthalides on celery flavor. *Journal of Food Science* 52(3): 658-660.
- ❖ **Umamo K, Nakahara K, Shoji A and Shibamoto T.** 1999. Aroma chemicals isolated and identified from leaves of *Aloe arborescens* Mill. var. *natalensis* Berger. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(9): 3702-3705.
- ❖ **United States Department of Agriculture (USDA).** 2007. Natural Resources conservation Service. Plants Database. Genus *Ligusticum*.
- ❖ **Up-Dong Y, Jung-Yeun H, Yong-Eui C, Woong-Young S, Nakagawa N and Sakurai N.** 1999. Turnover of cell-wall polysaccharides during somatic embryogenesis and development of celery (*Apium graveolens* L.). *Journal of Plant Biology* 42(1): 8-15.
- ❖ **Vagionas K, Graikou K, Ngassapa O, Runyoro D and Chinou I.** 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry* 103(2): 319-324.
- ❖ **Valencia C.** 1995. Fundamentos de Fitoquímica. Editorial Trillas. México D.F. pp: 11-15.
- ❖ **Vandelook F, Bolle N and Assche JA.** 2007. Seed dormancy and germination of the European *Chaerophyllum temulum* (Apiaceae), a member of a trans-atlantic genus. *Annals of Botany* 100: 233-239.
- ❖ **Vandelook F, Bolle N and van Assche A.** 2007. Seed dormancy and germination of the European *Chaerophyllum temulum* (Apiaceae), a member of a trans-Atlantic genus. *Annals of Botany* 100: 233-239.
- ❖ **Vandermoortele JL, Billard JP, Boucard J and Gaspar TH.** 1996. Micropropagation of parsley through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 25-30.
- ❖ **Vasil IK and Hildebrandt AC.** 1966. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. II. *Petroselinum hortense*. *American Journal of Botany* 53(9): 869-874.
- ❖ **Vázquez L.** 1996. Aislamiento y caracterización de los constituyentes químicos del extracto metanólico de la raíz de *Ligusticum porteri*. Tesis Licenciatura. UNAM. México.
- ❖ **Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Pérez de Paz PL, Palá-Paúl J and Sanz J.** 2005. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oils from the aerial parts of *Pimpinella anagodendron* Bolle and *Pimpinella rupicola* Svent. two endemic species to the Canary Islands, Spain. *Journal of Chromatography A* 1095: 180-184.
- ❖ **Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Pérez de Paz PL, Pála-Paúl J and Sanz J.** 2003. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry of the essential oil from the aerial parts of *Pimpinella junoniae* Ceb. & Ort., gathered in La Gomera, Canary Islands, Spain. *Journal of Chromatography A* 1011: 241-244.

- ❖ **Verma PC, Singh D, Rahman L, Gupta MM and Banerjee S.** 2002. *In vitro*-studies in *Plumbago zeylanica*: rapid micropropagation and establishment of higher plumbagin yielding hairy root cultures. *Journal of Plant Physiology* 159: 547-552.
- ❖ **Vernin G, Lageot C, Ghiglione C, Dahia M and Parkanyi C.** 1999. GC/MS analysis of the volatile constituents of the essential oils of *Pituranthos scoparius* (Coss et Dur.) Benth. et Hook. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* 11(6): 673-676.
- ❖ **Verpoorte R, van der Heijden R and Memelink J.** 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research* 9: 323-343.
- ❖ **Villaseñor JL.** 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 105-135.
- ❖ **Viswanathan MB, Maridass M, Thangadurai D and Ramesh N.** 2002. Chemical constituents of the fruit essential oil of *Diospyros malabarica* (Desr.) Kostel (Ebenaceae). *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)* 52(3): 207-211.
- ❖ **Vollmann C and Schultze W.** 1995. Composition of the essential oil of the underground parts of *Geum montanum* L. (Rosaceae). *Journal of Essential Oil Research* 7: 117-121.
- ❖ **Vrkoc J, Budesinsky M, Dolejs L and Vasickova S.** 1975. Arenophthalide A: a new phthalide glycoside from *Helichrysum arenarium* roots. *Phytochemistry* 14: 1845-1848.
- ❖ **Vrkoc J, Ubik K and Sedmera P.** 1973. Phenolic extractives from the achenes of *Helichrysum arenarium*. *Phytochemistry* 12: 2062.
- ❖ **Wakhlu AK and Sharma RK.** 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Heracleum candicans* Wall. *Plant Cell Reports* 17: 866-869.
- ❖ **Waller GR, MacVean CD and Suzuki T.** 1983. High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Reports* 2: 109-112.
- ❖ **Walter KS and Gillett HJ.** 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitoring Centre. IUCN—The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- ❖ **Wang D, Cui Z, Dong Y, Fu M and Song D.** 2004. Chemical constituents of root barks of *Ulmus pumila*. *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao* 21(6): 426-429.
- ❖ **Wang JY and Tian FL.** 2006. GC-MS analysis of the extracts of the *Tilia mongolica* leaves. *Fenxi Kexue Xuebao* 22(1): 96-98.
- ❖ **Wang Y, Yi L, Liang Y, Li H, Yuan D, Gao H and Zeng M.** 2008. Comparative analysis of essential oil components in *Pericarpum Citri Reticulatae Viride* and *Pericarpum Citri Reticulatae* by GC-MS combined with chemometric resolution method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46(1): 66-74.
- ❖ **Wang Y, Yin J, Qiao Y, Zhang H and Lu X.** 2007. Studies on antioxidant and chemical constituents of *Artemisia halodendron*. *Journal of Traditional Medicines* 2(1): 30-33.
- ❖ **Wang Z, Ding L, Li T, Zhou X, Wang I, Zhang H, Liu L, Li Y, Liu Z, Wang H, Zaneg H and He H.** 2006. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A* 1102: 11-17.
- ❖ **Watanabe I, Yanai T, Awano K, Kogami H and Hayashi K.** 1988. Volatile components of *Wisteria* flower. *Developments in Food Science* 18: 425-437.

- ❖ **Watts MJ, Galpin IJ and Collin HA.** 1984. The effect of growth regulators, light and temperature on flavour production in celery tissue cultures. *New Phytologist* 98(4): 583-591.
- ❖ **Watts MJ, Galpin IJ and Collin HA.** 1985. The effect of greening on flavour production in celery tissue cultures. *New Phytologist* 100(1): 45-56.
- ❖ **Wei G, Lin S, Fang Y and Liu D.** 2005. Study on GC-MS for analysis of volatile oil from *Acorus tatarinowii*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 30(10): 794-796.
- ❖ **Wei YX, Wang JX and Yao HP.** 2007. GC-MS analysis of chemical constituents of volatile oil from *Limonium bicolor*. *Zhongguo Xiandai Yingyong Yaoxue* 24(5): 398-401.
- ❖ **Wenqiang G, Shufen L, Ruixiang Y, Shaokun T and Can Q.** 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chemistry* 10(4): 1558-1564.
- ❖ **White IM.** 1988. Tephritid flies (Diptera: Tephritidae). Handbook for the identification of British insects. Vol. 10. Part 5a. The Royal Entomological Society of London. pp: 134.
- ❖ **Wijaya CH, Hadiprodjo IT and Apriyantono A.** 2002. Identification of volatile compounds and key aroma compounds of andaliman fruit (*Zanthoxylum acanthopodium*). *Food Science and Biotechnology* 11(6): 680-683.
- ❖ **Williams CA y Harborne JB.** 1972. Essential oils in the spiny-fruited Umbelliferae. *Phytochemistry* 11(6): 1981-1987.
- ❖ **Williams L and Collins HA.** 1976(a). Embryogenesis and plantlet formation in tissue cultures of celery. *Annals of Botany* 40: 325-332.
- ❖ **Williams L and Collins HA.** 1976(b). Growth and cytology of celery plants derived from tissue cultures. *Annals of Botany* 40: 333-338.
- ❖ **Wink M.** 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- ❖ **Wong PY y Kitts DD.** 2006. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chemistry* 97: 505-515.
- ❖ **Wu C, Wu G, Chen M, Lin Y and Huang L.** 2006. Studies on chemical components and antibacterial activity of essential oil from *Mosla scabra*. *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing Xuebao* 15(3): 26-30.
- ❖ **Wu PL, Wu TS, He CX, Su CH, and Lee KH.** 2005. Constituents from the stems of *Hibiscus taiwanensis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53(1): 56-59.
- ❖ **Xian Q, Chen H, Liu H, Zou H ad Yin D.** 2006. Isolation and identification of antialgal compounds from the leaves of *Vallisneria spiralis* L. by activity-guided fractionation. *Environmental Science and Pollution Research International* 13(4): 233-237.
- ❖ **Xiao B, Liu Y, Feng S, Huang R, Luo C and Dong J.** 2005. Chemical constituents of leaves from *Chimonanthus nitens* Oliv. (I). *Zhongcaoyao* 36(2): 187-189.
- ❖ **Yamada Y and Endo T.** 1984. Tropane alkaloids in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Reports* 3: 186-188.
- ❖ **Yamamoto O and Yamada Y.** 1986. Production of reserpine and its optimization in cultured *Rauwolfia serpentina* benth. cells. *Plant Cell Reports* 5: 50-53.

- ❖ **Yan R, Li SL, Chung HS, Tam YK and Lin G.** 2005. Simultaneous quantification of 12 bioactive components of *Ligusticum chuanxiong* Hort. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37: 87-95.
- ❖ **Yang H, Cui H and Chen J.** 2005. Analysis of volatile compounds in *Coptis teeta*, *Scutellaria baicalensis*, and *Paeonia lactiflora* decoction by GC-MS. *Zhongguo Yaoye* 14(3): 36-37.
- ❖ **Yang X, Zhao C, Zhou X, Luo B, Yang F and Hao X.** 2002. Constituents of volatile oil from *Ilex kudincha*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu* 24(3): 406-408.
- ❖ **Yayli N, Güleç C, Üüçüncü O, Yasar A, Ülker S, Coskunçelebi K and Terzioğlu S.** 2006. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Minuartia meyeri*. *Turkish Journal of Chemistry* 30: 71-76.
- ❖ **Yi T, Leung K, Lu GH, Zhang H and Chan K.** 2005. Identification and comparative determination of senkyunolide A in Traditional Chinese Medicinal plants *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* by HPLC coupled with DAD and ESI-MS. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53(11): 1480-1483.
- ❖ **Yook CS, Kang CK, Inn MK, Kim KO and Kim CW.** 1997. The essential oils of *Ligusticum tenuissimum* roots. *Yakhak Hoeij* 41(2): 273-276.
- ❖ **Yoon HY, Lim SR, Lee SW and Chung IS.** 1992. Anthocyanin production by *Daucus carota* root cell culture *in vitro*. *HortScience* 27(6): 694.
- ❖ **Yu Y and Fu H.** 2007. The investigation of the chemical component of *Syringa pinnatifolia* Hemsl volatile oil. Abstract of Papers, 234th ACS National Meeting, Boston, MA, August 19-23, ANYL-271. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- ❖ **Yu Y and Guo Z.** 2007. GC/MS analysis of the chemical constituents of mint volatile oil in the country of Shangri-La Yunnan province. Abstracts of Papers, 233rd ACS National Meeting, Chicago, IL, March 25-29. American Chemical Society, Washington DC, USA.
- ❖ **Yu Y, Du JR, Wang CY and Qian ZM.** 2008. Protection against hydrogen peroxide-induced injury by Z-ligustilide in PC12 cells. *Experimental Brain Research* 184: 307-312.
- ❖ **Yuan J, Feng J, Yang J and Miao J.** 2006. GC-MS analysis of essential oils from pericarp and seeds of *Illicium verum* Hook. f. extracted by supercritical CO₂ fluid. *Yaowu Fenxi Zazhi* 26(10): 1380-1384.
- ❖ **Yuan P and Yuan X.** 2007. Analysis on constituents of absolute oil of *Lysimachia foenum-graecum* and study on the insecticidal activity of the absolute oil. *Wuhan Zhiwuxue Yanjiu* 25(4): 417-420.
- ❖ **Zangerl AR, Green ES, La.pman RL and Berenbaum MR.** 1997. Phenological changes in primary and secondary chemistry of reproductive parts in wild parsnip. *Phytochemistry* 44(5): 825-831.
- ❖ **Zeng YX, Zhao CX, Liang YZ, Yang H, Fang HZ, Yi LZ and Zeng ZD.** 2007. Comparative analysis of volatile components from *Clematis* species growing in China. *Analytica Chimica Acta* 595(1-2): 328-339.
- ❖ **Zenk MH, El-Shagi H and Ulbrich B.** 1977. Production of rosmarinic acid by cell suspension cultures of *Coleus blumei*. *Naturwissenschaften* 64: 585-586.
- ❖ **Zhang C, Qi M, Shao Q, Zhou S and Fu R.** 2007. Analysis of the volatile compounds in *Ligusticum chuanxiong* Hort. using HS-SPME-GC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44(2): 464-470.

- ❖ **Zhang H, Chen F, Wang X y Yao HY.** 2006. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. *Food Research International* 39: 833-839.
- ❖ **Zhang X, Xiao H, Xu Q, Li X, Wang J and Liang X.** 2003. Characterization of phthalides in *Ligusticum chuanxiong* by liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 41: 428-433.
- ❖ **Zhang Y and Kong L.** 2006. Study on constituents of *Citrus medica*. *Zhongguo Xiandai Zhongyao* 8(6): 16-17.
- ❖ **Zhang Y, Wei D, Guo S, Zhang X, Wang M and Chen F.** 2007. Chemical components and antioxidant activity of the volatile oil from *Cassia tora* L. seed prepared by supercritical fluid extraction. *Journal of Food Lipids* 14(4): 411-423.
- ❖ **Zhang YN, Yue XF and Wang ZZ.** 2007. GC-MS analysis of chemical constituents of *Acorus calamus* volatile oil. *Zhongchengyao* 29(1): 124-126.
- ❖ **Zhang Z, Cai B, Wu L and Li L.** 2006. A GC-MS analysis on *Lilium lancifolium* and the lipophilic components in its water extract. *Nanjing Zhongyiyao Daxue Xuebao* 22(2): 91-93.
- ❖ **Zhao SK, Lin CW, Ou AJ, Huang KJ and Jian LB.** 2003. Studies on the chemical constituents of the fruit of *Hylocereus costaricensis* (Weler) Britt. *Guangxi Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* 28(3): 199-201.
- ❖ **Zhao YP, Wang XY, Wang ZC, Lu Y, Fu CX and Chen SY.** 2006. Essential oil of *Actinidia macrosperma*, a catnip response kiwi endemic to China. *Journal of Zhejiang University – Science B* 7(9): 708-712.
- ❖ **Zheng W, Zhou C, Zhang S, Weng L and Zhao Yu.** 2006. Studies on the chemical constituents in herb of *Ranunculus japonicus*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 31(11): 892-894.
- ❖ **Zhong-Yi L and Hui-Min C.** 1986. Plant regeneration from protoplasts of *Ligusticum wallichii* Franch. *Journal of Integrative Plant Biology (Acta Botanica Sinica)* 28(1): 50-54.
- ❖ **Zrira S, Menut C, Bessiere JM and Benjilali B-** 2007. Chemical composition of the essential oils of Moroccan *Ormenis mixta* (L.) Dumort. *ssp. multicaulis*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants* 10(5): 378-385.
- ❖ **Zschocke S, Klaiber I, Bauer R and Vogler B.** 2005. HPLC-coupled spectroscopic techniques (UV, MS, NMR) for the structure elucidation of phthalides in *Ligusticum chuanxiong*. *Molecular Diversity* 9: 33-39.
- ❖ **Zschocke S, Liu JH, Stuppner H and Bauer R.** 1998. Comparative study of roots of *Angelica sinensis* and related Umbelliferous drugs by thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 9: 283:290.