

03072
6
20j



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO DE
Mammillaria huitzilopochtli
PARA LA OBTENCION DE METABOLITOS
SECUNDARIOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A:

RAMON ENRIQUE ROBLES ZEPEDA

0273019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se realizó con la colaboración y ayuda de varias personas e instituciones.

Un agradecimiento especial al Dr. Abraham Rubluo Islas, mi asesor principal, por haberme brindado la confianza de recibirme en su laboratorio, pero sobre todo por el apoyo otorgado tanto material como académicamente en estos años de estudio.

A los Doctores Irma Bernal Lugo y Manuel Estrada Jiménez, que con toda su experiencia hicieron siempre contribuciones valiosas al trabajo de investigación y que fueron una guía para encontrar una solución a los problemas.

A los miembros del Jurado, por sus atinadas recomendaciones para una mejor presentación de este escrito.

A mis amigos cM.C. Liza Covantes, M.C. Isabel Saad, M.C. Mabel Hernández, M.C. Julia Cassani, Biol. Daniel López, M.C. Sergio Fco. Moreno S. y Dr. Arturo Navarro Ocaña, que siempre formaron parte cercana de este esfuerzo con su apoyo moral y su amistad estimuladora.

Igualmente a mis amigos y compañeros del Jardín Botánico de la UNAM, especialmente a Ana Laura, Paty, Bárbara, Ingrid, Mario, Martín, Marcos y a los Doctores Alejandro y Víctor Manuel, con quienes los días de trabajo se hicieron mucho mas amenos.

Al apoyo brindado por el Instituto del Medio Ambiente y el Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora (IMADES) durante el desarrollo de este trabajo y a la confianza brindada, especialmente, al Dr. Hector M. Arias Rojo.

Al CONACYT, por la ayuda otorgada para la realización de este trabajo.

Por último, a todas aquellas personas que en estos momentos escapan a mi memoria, pero que de alguna u otra forma contribuyeron en este trabajo, mi mas sincero reconocimiento.

DEDICATORIA

A MARIA ELENA Y DARIEN

Por el esfuerzo compartido
bajo el estímulo de una familia.
Mi único motivo.

A MIS PADRES

Por lo que hoy reflejo.

A MIS HERMANOS

Todos diferentes, todos iguales.
Todos uno solo.

A DOÑA COYITO Y DON JESUS

Por la confianza brindada.

A COYITO Y GIUSEPPE

Ustedes saben.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
<i>Mammillaria huitzilopochtli</i>	4
Descripción Botánica	5
Distribución Geográfica.....	6
Cultivo <i>in vitro</i>	7
Metabolitos Secundarios de Plantas.....	8
Betalainas.....	13
Fitoalexinas.....	16
Los Hongos como Elicitores.....	17
Los Sistemas Inducidos con Hongos	17
Mecanismo de Acción del Proceso de Inducción.....	19
OBJETIVOS.....	23
General	23
Específicos.....	23
MATERIALES Y METODOS.....	24
Plan de Trabajo.....	24
Material Biológico.....	24
Medios de Cultivo	24
Extracción de Pigmentos.....	29
Inactivación Enzimática.....	29
Extracción con Metanol.....	29
Homogenización de Células.....	30
Extracción con Solventes de Diferente Polaridad.....	31
Extracción Combinada Acetato de Etilo-Acetona:Metanol (1:1).....	31

Contenido
(continuación)

	Página
Extracción con Proteasa.	32
Extracción con una Mezcla de las Enzimas: Celulasa, Hemicelulasa y Pectinasa.	32
Extracción con NaOH 4N.	32
Método para la Liberación de Lignina.....	33
Crecimiento Celular.	33
Inducción, Extracción y Pruebas de Actividad Biológica de Fungicidas Elicitados.....	34
Cultivos en Suspensión para la Inducción de Fungicidas	34
Material Elicitor.	34
Extracción de Compuestos Inducidos con Elicitores.	35
1) <i>Compuestos liberados al medio de cultivo</i>	35
2) <i>Compuestos presentes al interior de las células</i>	35
Purificación de Compuestos Elicitados.	36
Pruebas de Actividad Biológica.	36
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
Inducción de Pigmentos.....	38
Extracción de Pigmentos Inducidos en Cultivo en Suspensión..	39
Cultivos en Suspensión para la Inducción de Fungicidas.	55
Inducción de Fungicidas.	55
Extracción de Fungicidas Elicitados.	59
Separación por Cromatografía de Fungicidas.	63
Pruebas de Actividad Biológica de Fungicidas Inducidos.	63
CONCLUSIONES	75
BIBLIOGRAFIA.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	<i>Mammillaria huitzilopochtli</i> en su hábitat natural en el Estado de Oaxaca.	5
2	Ruta Metabólica para la Formación de Betalainas	14
3	Diagrama de flujo que muestra la estrategia desarrollada para obtener betalainas por efecto de reguladores de crecimiento	25
4	Diagrama de flujo que muestra la estrategia desarrollada para obtener metabolitos secundarios por efecto de elicitores biológicos (homogenado fúngico).	26
5	Curvas de crecimiento de células de <i>M. huitzilopochtli</i> en medio sólido MS adicionado con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP.	40
6	Espectro de absorción UV-VIS para el extracto obtenido de células en suspensión (MS + 0.1 mg de 2,4-D) de <i>M. huitzilopochtli</i> por el método de Inactivación enzimática (Rodríguez et al, 1994).	43
7	Microfotografía de células pigmentadas enteras y homogenizadas de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> obtenidas en cultivo en suspensión (MS + 0.1 mg/l de 2,4-D)	46
8	Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> homogenizadas y extraídas con el solvente acetonitrilo	47
9	Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> homogenizadas y extraídas con el solvente benceno	49
10	Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> homogenizadas y extraídas con acetato de etilo y una mezcla acetona:metanol (1:1).	50
11	Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> utilizando proteasas para la liberación del pigmento y extraídas con una mezcla de acetona:metanol (1:1).	51

LISTA DE FIGURAS
(continuación)

Figura		Pag.
12	Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> utilizando la mezcla de enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa para la liberación del pigmento y extraídas con acetona:metanol (1:1).	53
13	Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> utilizando el método para liberación de lignina	54
14	Curva de crecimiento de cultivos en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> en el tratamiento 9 (medio MS adicionado con 0.1 mg/l de 2,4-D). Se determinó peso fresco y seco expresado en gramos, el resultado es producto de 3 repeticiones.	56
15	Cultivos en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> en medio MS + 0.1 mg/l de 2,4-D y elicidadas con 100 mg de homogenado fúngico.	58
16	Medio filtrado (amarillo) y sin filtrar (rojo) de cultivos en suspensión (MS + 0.1 mg/l de 2,4-D) de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> elicitados con homogenados fúngicos.	60
17	Espectro UV-VIS del extracto obtenido del medio de cultivo (MS + 0.1 mg/l 2,4-D) en suspensión de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> inducido con elicitores biológicos (homogenado fúngico) y extraído con acetato de etilo	61
18	Espectro UV-VIS del extracto obtenido de las células en suspensión (MS + 0.1 mg/l 2,4-D) de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> inducido con elicitores biológicos (homogenado fúngico) y extraído con diclorometano:metanol (9:1).	61
19	Cinética de producción de fitoalexinas, extraídas del medio de cultivo en suspensión (MS + 0.1 mg/l de 2,4-D) de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> inducidas con homogenados fúngicos y leída a una λ de 444 nm, los resultados son el promedio de 3 repeticiones.	62
20	Cinética de producción de fitoalexinas, extraídas de las células filtradas del cultivo en suspensión (MS + 0.1 mg/l de	

LISTA DE FIGURAS
(continuación)

Figura		Pag.
	2,4-D) de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i> inducidas con homogenados fúngicos y leída a una λ de 444 nm, los resultados son el promedio de 3 repeticiones.	62
21	Curvas de crecimiento de los hongos <i>Cladosporium sp.</i> , <i>Phoma sp.</i> y <i>Alternaria sp.</i> en medio agar papa-dextrosa adicionado con 100 ppp de extracto total, comparado contra sus respectivos controles.	64
22	Curvas de crecimiento de los hongos <i>Rhizoctonia sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i> y <i>Fusarium moniliforme</i> en medio agar papa-dextrosa adicionado con 100 ppm de extracto total, comparado contra sus respectivos controles	65
23	Curvas de crecimiento de los hongos <i>Helminthosporium sp.</i> y <i>Phaeoacremonium sp.</i> en medio agar papa-dextrosa adicionado con 100 ppp de extracto total, comparado contra sus respectivos controles	66
24	Efecto de inhibición del extracto total (100 ppm) obtenido de cultivos en suspensión de <i>M. huitzilopochtli</i> sobre los hongos: a) <i>Phoma sp.</i> y b) <i>Rhizoctonia sp.</i>	69
25	Efecto de inhibición del extracto total (100 ppm) obtenido de cultivos en suspensión de <i>M. huitzilopochtli</i> sobre los hongos: a) <i>Fusarium sp.</i> y b) <i>Fusarium moniliforme</i>	70
26	Curvas de crecimiento del hongo <i>Phoma sp.</i> contra distintas concentraciones del extracto total.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pag.
1	Clasificación Taxonómica de <i>Mammillaria huitzilopochtli</i>	6
2	Productos Secundarios Obtenidos por Cultivo de Tejidos Vegetales (> 200)	8
3	Tratamientos Utilizados para Evaluar el Efecto de 2,4-D y BAP Sobre la Inducción de Pigmentos en <i>M. huitzilopochtli</i> , y su Biomasa	27
4	Composición del Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog; 1962)	28
5	Hongos Fitopatógenos Utilizados en las Pruebas Biológicas.	36
6	Resultados de los 16 Tratamientos Utilizados para Evaluar el Efecto de 2,4-D y BAP Sobre la Inducción de Pigmentos en <i>M. huitzilopochtli</i> , y su Biomasa	38
7	Absorbancias y Cuantificación de Betaxantinas, Betacianinas y Betalaina Total de Extractos Obtenidos por el Método de Inactivación Enzimática	41
8	Absorbancias y Cuantificación de Betaxantinas, Betacianinas y Betalaina Total de Extractos Obtenidos por el Método de Metanol al 80% y Modificaciones	44
9	Pruebas de Separación de Medias de Tukey (Nivel de Significancia de 0.05) para Evaluar el Efecto del Extracto Total Sobre el Crecimiento Radial de 8 Hongos Fitopatógenos, en Medio Agar Papa-Dextrosa Adicionado con 100 ppm.	67
10	Porcentaje de Inhibición del Hongo <i>Phoma sp.</i> por Efecto de Diferentes Concentraciones de Extracto Total, Comparados Contra un Control sin Extracto.	71
11	Pruebas de Separación de Medias de Tukey (Nivel de Significancia de 0.05) para Evaluar el Efecto de Diferentes Concentraciones del Extracto Total sobre el Crecimiento Radial del Hongo <i>Phoma sp.</i> en Medio Agar Papa-Dextrosa	74

RESUMEN

Mammillaria huitzilopochtli es una cactácea endémica del Estado de Oaxaca, México. En trabajos previos se logró su micropropagación y adaptación exitosa en invernadero. Las Cactáceas producen en forma natural pigmentos rojos y amarillos pertenecientes al grupo de las betalainas. Las plantas, como parte de su sistema de defensa, producen compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular denominados fitoalexinas, mismos que son acumulados en tejidos vegetales. En los sistemas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, las fitoalexinas pueden ser inducidas por diversas vías, entre éstas se encuentran los elicitores biológicos que son moléculas que promueven la síntesis de fitoalexinas en la planta como respuesta de defensa a su presencia. Considerando lo anterior, en el presente estudio, se desarrolló un trabajo de investigación con el objeto de evaluar el efecto de reguladores de crecimiento y elicitores biológicos, sobre la producción de pigmentos y fitoalexinas, respectivamente, en cultivos en suspensión de la cactácea *Mammillaria huitzilopochtli*. Se logró inducir la producción de un pigmento rojo en cultivo en suspensión en presencia de 0.1 mg/l de 2,4-D, sin embargo, no se logró la extracción de estos pigmentos usando distintas metodologías reportadas para pigmentos en cactáceas. La adición de homogenados fúngicos (100 mg), como elicitores biológicos, a los cultivos en suspensión, favoreció la producción y secreción extracelular de compuestos químicos. La actividad biológica fue evaluada en los extractos contra 8 hongos fitopatógenos, observándose que de éstos, el hongo *Phoma* sp. inhibió en un 50% su crecimiento a una concentración de 100 ppm. En una evaluación adicional, se logró establecer que este mismo hongo es inhibido en un 100% a 400 ppm. Se obtuvieron cinéticas de crecimiento de los 8 hongos evaluados contra las fitoalexinas presentes en el medio, así como una cinética de la producción de fitoalexinas. En la parte química se estableció la metodología para la purificación de los compuestos inducidos.

INTRODUCCIÓN

Mammillaria huizilopochtli es una cactácea endémica del Valle de Cuicatlán localizado al noroeste del Estado de Oaxaca, México, su población cubre una área aproximada de 80 Km², la especie crece en lugares escarpados, en suelos de acrisol (rojo), con acumulación de arcilla, ácidos ó muy pobres en nutrientes.

En trabajos previos se logró su micropropagación y adaptación exitosa en invernadero (Arriaga, 1994). Sin embargo, durante el desarrollo de estos trabajos, y específicamente en la evaluación de tratamientos con distintas combinaciones de reguladores de crecimiento, se observó en los callos generados, pigmentos de color púrpura. Es conocido que los colores rojos y amarillos encontrados en cactáceas son causados por una clase de pigmentos conocidos como betalainas. Este fenómeno sugirió un estudio más detallado de las características de estos pigmentos y la hipótesis de que eran producto del metabolismo secundario, debido quizás a que fueron sometidas a alguna condición de estrés durante su cultivo *in vitro*.

Generalmente, la obtención de metabolitos secundarios se realiza por extracción directa de la planta, sin embargo, en muchos casos la cantidad de metabolito producido es tan pequeña que requiere de grandes volúmenes de planta para alcanzar cantidades económicamente redituables. Esta realidad promueve una extracción masiva de material vegetal para lograr cantidades importantes de algún metabolito de interés. Tal es el caso del árbol *Taxus brevifolia*, productor del antitumorante Taxol que en periodos que van de meses a décadas produce sólo pequeñas cantidades de este compuesto (Dicosmo y Misawa, 1995). Este hecho está generando una sobreexplotación de algunos recursos naturales que pudiera eventualmente ponerlos en riesgo.

Actualmente, una herramienta de la ciencia que en un futuro cercano parecería evitar la sobreexplotación de los recursos naturales, es la Biotecnología Vegetal, a través del Cultivo de Tejidos Vegetales, esta técnica, que aglutina diversas metodologías como biotransformación, células inmovilizadas e inducción

vía elicitores biológicos, podría incluso en algunos casos aumentar la producción de los metabolitos en un tiempo menor (Dicosmo y Misawa, 1995).

Considerando lo anterior, en el presente estudio, se desarrolló un trabajo de investigación con el objeto de establecer el cultivo de células en suspensión de la cactácea *Mammillaria huitzilopochtli* para la obtención de metabolitos secundarios, evaluando el efecto de reguladores de crecimiento y elicitores biológicos, sobre la producción de betalainas y fitoalexinas, respectivamente.

ANTECEDENTES

Mammillaria huitzilopochtli

Entre las plantas que caracterizan el paisaje de las zonas áridas en México se encuentran las pertenecientes a la familia Cactaceae. Las cactáceas, originarias del continente americano, se localizan distribuidas especialmente en zonas áridas y semiáridas con aproximadamente 1600-3100 especies, de las cuales existen reconocidas en el territorio mexicano 738 y de éstas 540 son endémicas, lo que significa que tres cuartas partes de la cactoflora de nuestro país sea única, por lo que resulta preocupante que la mayoría de las especies mexicanas con algún grado de amenaza de extinción sean endémicas (Hernández y Godínez, 1994). Estas plantas sorprenden por las formas de sus tallos y belleza de sus flores, son también interesantes por la anatomía de sus estructuras y las modalidades de su fisiología, indicadoras ambas de su adaptación a la sequía. La historia registra que las cactáceas adquirieron importancia entre las tribus prehispánicas, según se deduce de sus tradiciones, teogonías, códices antes de su destrucción y de los numerosos nombres con que las designaron y que aún persisten en nuestros días (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1991). También intervinieron en prácticas religiosas, se usaron con frecuencia en la magia y herbolaria (Nobel, 1988). Las propiedades medicinales que se encuentran en las sustancias químicas de estas plantas son tan diversas como ellas mismas, ya que son el mejor ejemplo de poderosos mecanismos de adaptación a un medio hostil. También proveen materiales para la construcción, y se utilizan como alimento y bebida (Nobel, 1988). A pesar de la riqueza de cactáceas en la flora mexicana éstas se enfrentan a graves problemas de conservación (Hernández y Godínez, 1994). Entre los principales factores que están afectando esta conservación se encuentran: a) sobrecolecta de individuos, b) destrucción de sus hábitats y, c) factores naturales.

Mammillaria huitzilopochtli, (Figura 1) es una cactácea que está considerada como vulnerable por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN) (1987); ésto significa que de seguir operando los factores que la amenazan puede pasar a la categoría: en peligro de extinción en un futuro cercano. Ante este hecho fue propagada *in vitro* (Arriaga, 1994) por lo que al menos se cuenta ya con la metodología para garantizar su producción por técnicas biotecnológicas.

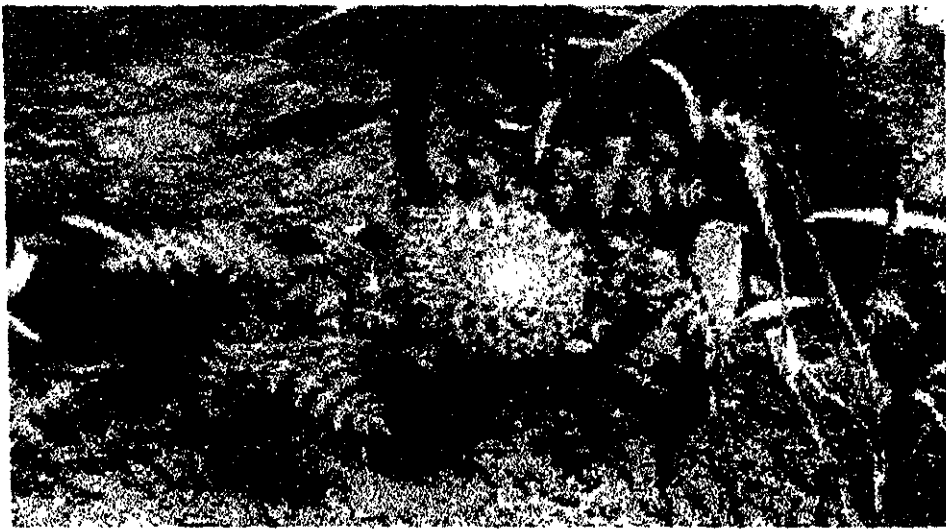


Figura 1.- *Mammillaria huitzilopochtli* en su hábitat natural en el Estado de Oaxaca.

Descripción Botánica

Planta simple o eventualmente ramificada; tallo esférico hasta claviforme-cilíndroide, de 13 cm de altura y 8-9 cm de diámetro, verde oscuro. Tubérculos dispuestos en 13 y 21 series espiraladas de 6 mm de longitud y 5 mm de espesor en la base, obtusamente cónicos-cilíndricos, algo comprimidos lateralmente, con jugo acuoso. Axilas desnudas salvo las floríferas, éstas con densa lana blanquecina caduca. Areolas elípticas, de 2 mm de longitud y 1.5 mm de ancho, al principio con lana corta, después desnudas. Espinas radiales 15-30, de 2.5 a 3.5 mm de largo; rara vez 2 espinas de 4 mm de longitud, finalmente aciculares, brotando del borde superior de la areola, al principio de

color castaño oscuro; los ejemplares maduros desarrollan una espina central adicional, subulada, con color desde castaño oscuro hasta negra. Flores tubular infundibuliformes, de 12-15 mm de longitud y de 7 mm de diámetro (no abren ampliamente), rojo carmesí o más o menos intenso. Fruto claviforme de cerca de 15 mm de longitud, rojo, conservando adheridos los restos del perianto. Semillas piriformes, de 1.4 mm de longitud por 0.75 mm de espesor, con el hilo muy pequeño (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1991).

Distribución Geográfica

Muchas de las especies del género *Mammillaria* tienen su centro de diversidad genética en México, creciendo desde las costas a las montañas (elevación de 3000 metros sobre el nivel medio del mar). *Mammillaria huitzilopochtli* es endémica del Valle de Cuicatlán localizado al noroeste del Estado de Oaxaca, su población cubre una área aproximada de 80 Km², la especie crece en lugares escarpados, en suelos de acrisol (rojo), con acumulación de arcilla, ácidos ó muy pobres en nutrientes. El tipo de vegetación es selva baja caducifolia mezclada con matorral micrófilo (Bravo y Sánchez-Mejorada, 1991).

Mammillaria huitzilopochtli es una especie ornamental, con importancia taxonómica, poco estudiada y pertenece al subgénero *Mammillaria*, cuya ubicación taxonómica se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.- Clasificación Taxonómica de *Mammillaria huitzilopochtli*.

Reino:	Vegetal
División:	Embryophyta
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotyledonae
Orden:	Centrospermae
Familia:	Cactaceae
Subfamilia:	Cactoideae
Tribu:	Cacteae
Género:	Mammillaria
Subgénero:	Mammillaria
Especie:	<i>Mammillaria huitzilopochtli</i>

(Tomado de Arriaga, 1994)

Cultivo *In vitro*

El establecimiento de los principios biológicos del cultivo de órganos y tejidos vegetales ha sido acreditado al alemán Haberlandt, fisiólogo vegetal, quien los enunció por primera vez en 1902. (Murashige, 1997).

En 1927, Rehwald fue el primero en obtener callo indiferenciado en cultivo estéril, sin embargo fue hasta 1934 cuando White describió un método capaz de desarrollar en un sistema de cultivo estéril el crecimiento rápido de raíces de tomate, basado en esto se considera que el cultivo *in vitro* en plantas tiene a la fecha más de 60 años de iniciado. Aún cuando en un inicio su uso se limitaba a la micropropagación de plantas, en la actualidad tiene entre otras aplicaciones: a) propagar masivamente especies de interés económico (principalmente ornamentales u otras) b) remover enfermedades, particularmente virus, c) conservar lotes de plantas libres de enfermedades (germoplasma), particularmente plantas alimenticias, d) utilizar este sistema para el manejo de ingeniería genética en plantas y e) la producción y extracción de productos químicos de interés producidos en células vegetales cultivadas *in vitro*, evitando obtenerlas directamente de plantas del campo.

Existen una variedad de técnicas modernas para el cultivo de células vegetales *in vitro* como la clonación, el cultivo y la fusión de protoplastos, el cultivo de meristemos y anteras, embriogénesis somática y técnicas de ingeniería genética, entre otras, que han suscitado expectativas en diversos campos de la ciencia (Sánchez de Jiménez, 1985; Rodríguez y Rubluo, 1992). Además, algunos de los problemas más importantes en el avance de la bioquímica y la genética molecular pueden ser resueltos satisfactoriamente por medio de las técnicas de cultivo *in vitro* (Sánchez de Jiménez, 1985). Como ejemplo, la selección directa de mutantes, una ventaja experimental antes restringida a los microorganismos, puede ahora lograrse con células vegetales en cultivo.

Por último, los metabolitos secundarios pueden ser sintetizados mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* e inclusive ser inducidos

estimulando la actividad biosintética de las células con técnicas como la biotransformación y el uso de elicitores biológicos, entre otros (Dicosmo y Misawa, 1995; Saad, 1996). En la Tabla 2 se enlistan una serie de metabolitos secundarios de una gran variedad química que han sido obtenidos por cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Tabla 2.- Metabolitos Secundarios Obtenidos por Cultivo de Tejidos Vegetales.

• Cafeína	• Diosgenina
• Berberina	• Vinblastina
• Shikonina	• Vincristina
• Antraquinonas	• Scopolamina
• Acido rosmarínico	• Morfina
• Nicotina	• Codeina
• Ubiquinona	• Catarantina

(Constabel, F. 1987; Dicosmo y Misawa, 1995)

Metabolitos Secundarios de Plantas

Normalmente, los procesos que generan compuestos en plantas han sido separados en metabolismo primario y secundario. La definición más concensada de metabolito secundario dice que es "aquel compuesto biosintetizado por la planta que no tiene una función indispensable en ella", sin embargo, ahora se conoce que estos compuestos son necesarios para la vida de la planta, muchos de ellos proveen un mecanismo de defensa contra el ataque de bacterias, virus y hongos en una analogía al sistema inmune de los animales (Vickery y Vickery, 1981).

Además, otras definiciones sugerían que los metabolitos secundarios son compuestos sin función conocida en los procesos más importantes de la planta, es decir moléculas que se sintetizan bajo condiciones especiales y regulados por condiciones externas a éstas. En la actualidad se conoce más de su función fisiológica en las plantas. Así, se plantea la unión del metabolismo primario o general con el secundario o especial, sin embargo, en plantas superiores la presencia de ciertas vías del metabolismo secundario puede

depender del desarrollo general de la planta y/o del desarrollo de órganos simples, tejidos y células especializadas (Wierman, 1981). Recientemente se ha sugerido, contrario a lo que se creyó durante mucho tiempo, que el metabolismo secundario es igualmente importante que el primario para la vida de la planta (Gottlieb, 1990).

Lo anterior basado, quizás, en el hecho de que los metabolitos secundarios pueden cumplir varias funciones como: detener depredadores potenciales, competir con otras plantas, defenderse de patógenos, protección contra los agentes estresantes del ambiente o atraer polinizadores y simbiosis (Bell, 1981). Pero más que el interés en conocer estas funciones biológicas el conocimiento del metabolismo secundario ha sido impulsado por la creciente demanda de nuevas sustancias en las áreas química, farmacéutica, agrícola y alimentaria. Como ejemplo de esto, los colores rojos y amarillos encontrados en las cactáceas son causados por una clase de pigmentos conocidos como betalainas (Gibson y Nobel, 1990). Los pigmentos rojos se les denomina betacianinas y los amarillos son llamados betaxantinas. Actualmente el uso dado a los pigmentos betalainas está incrementando debido a la desventaja que presentan los colorantes artificiales, los mayores usos para betalainas se encuentran en helados, yoghurts de frutas, leches saborizadas y mezclas secas (Robles-Zepeda, 1997). El mercado mundial para colorantes alimenticios está creciendo alrededor del 10% anualmente de acuerdo con la Asociación de Colorantes Alimenticios Naturales de los Estados Unidos. Sólo para los Estados Unidos, el mercado en 1978 fué de 135 millones de dolares (Ilker, 1987).

Por otra parte, debido a que la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA), prohibió el uso de varios pigmentos rojos artificiales en la industria alimentaria como resultado de sus efectos tóxicos, el uso de colorantes naturales ha cobrado mayor interés. Dentro de estos colorantes sintéticos se encuentra el tartrazina, el cual ha sido asociado con ciertos desordenes de riñón, varias formas de cancer y ha demostrado ser el causante de hiperactividad en niños (Leathers, et al, 1992). Una buena posibilidad sería producir colorantes

naturales, no tóxicos, de plantas vía cultivo de tejidos, que sustituyeran en el mercado a colorantes tales como el tartrazine.

La producción de metabolitos secundarios de plantas *in vitro* puede ser posible utilizando técnicas de cultivo de tejidos vegetales, que puedan dar ventajas antes restringidas a los microorganismos: la disponibilidad de material homogéneo de diversas poblaciones, con tiempos de generación cortos, en sistemas de cultivo reproducibles que ocupan espacios reducidos (Payne, et al, 1991). No obstante, alcanzar niveles industriales a sido una meta difícil.

Por otra parte, los metabolitos secundarios presentes en las plantas son producto o consecuencia de los obtenidos en el metabolismo primario. Se considera que en el sitio metabólico en donde las rutas secundarias se enlazan con las primeras, compiten por el mismo sustrato. Entonces al ser el metabolismo secundario mucho más complejo que el primario, se dificulta tener altos niveles de productividad en las plantas *in vivo*, por lo que generalmente éstos son muy bajos, del orden de 0.01% del peso fresco (Jiménez Estrada, comunicación personal). Basados en ésto, el incremento en la producción de la mayoría de los productos naturales, obtenidos por cultivo *in vitro*, requeriría una modificación en la estrategia de inducción, por ejemplo, establecer las vías metabólicas y fisiológicas bajo las cuales las plantas disparan su mecanismo de defensa y por lo tanto la biosíntesis de metabolitos secundarios. Esto implicaría, la modificación genética, utilización de precursores de los metabolitos de interés, entre otros aspectos para mejorar los niveles de producción, sobre todo si consideramos que los productos del metabolismo secundario son consecuencia de la interacción genética y su biosíntesis está regulada de una manera compleja que, hoy en día, comprendemos de manera incipiente, por eso el aprovechamiento empírico ha sido limitado (Payne, et al, 1991; Taticek, et al, 1991).

En el cultivo de células vegetales existen dificultades inherentes al manejo de células vegetales, a diferencia del cultivo de microorganismos. Por ejemplo en células vegetales, dependiendo de la especie y condiciones de

cultivo, se favorece la formación de agregados y son muy sensibles al daño físico, características que hacen muy difícil el escalamiento de cultivos de células vegetales. Además, una vez que se ha logrado producir los metabolitos secundario, el proceso de recuperación de los mismos resulta costoso, debido a que en la mayoría de las ocasiones los vegetales mantienen sus productos en compartimientos celulares como las vacuolas (Payne, et al, 1991). En esta línea, se sabe que los reguladores de crecimiento o fitohormonas también influyen en la síntesis, sin embargo, como nuestro conocimiento acerca del mecanismo de acción de los reguladores de crecimiento es pobre, dificulta una buena elección de los tipos y niveles de adecuados para favorecer una mayor productividad. El cultivo en suspensión, la técnica más adecuada para un proceso industrial, generalmente involucra desdiferenciación o diferenciación parcial, en donde pueden actuar los reguladores, y existen muchos productos cuya síntesis está asociada con algún grado de organización celular (Taticcek, et al, 1991). Pero tal vez, el mayor obstáculo para la producción de metabolitos secundarios vía cultivo de células vegetales *in vitro*, comparada con la de bacterias, sea su lento crecimiento (Payne, et al, 1991)

A pesar de la complejidad del problema, se está avanzando de forma acelerada. La variación inherente de los cultivos de plantas *in vitro*, ha sido aprovechada para seleccionar líneas sobreproductoras. La optimización del medio por el manejo de nutrientes, reguladores de crecimiento y la adición de precursores es una estrategia conveniente para aumentar rendimientos. Cuando es necesario cierto nivel de organización para que la síntesis del metabolito se presente, se ha sugerido el cultivo de órganos, el cultivo de raíces y en especial de raíces pilosas son opciones cada vez más empleadas (Payne, et al, 1991; Taticcek, et al, 1991; Buitelaar y Tramper, 1992).

Dentro de las estrategias para incrementar la síntesis de un metabolito secundario, se encuentra: a) generación de plantas con alto grado de poliploidía, b) regulación de las condiciones físicas del cultivo, c) aplicación de condiciones de estrés, como choque osmótico, iones pesados y cambios

bruscos de temperatura, d) utilización de técnicas especializadas, como la inmovilización celular y por último; d) la utilización de elicitores. La presencia en los mercados de algunos metabolitos vegetales producidos con técnicas biotecnológicas (shikonina y berberina) se debe al hecho de utilizar la combinación de al menos tres de estas estrategias (Payne, et al, 1991; Dicosmos y Misawa, 1995). Por una parte, la regulación negativa de la síntesis puede ser inhibida creando un sitio de acumulación artificial, esto favorece el incremento del producto y su extracción. Por otra parte, las técnicas de inmovilización celular permiten reutilizar las células, minimizando la desventaja antes mencionada de que las células vegetales presentan una velocidad de crecimiento lenta. Por último, el uso de elicitores facilita la especificidad del sistema al inducir en forma selectiva la producción de los metabolitos, con una disminución en los costos de extracción y purificación porque en determinados casos favorece la excreción de los metabolitos al medio de cultivo (Mulder-Kieger, et al, 1988; Payne, et al, 1991)

Por último, mencionaremos, que el uso coordinado de la química sintética y el cultivo de células vegetales es una de las áreas de más futuro en la biotecnología, esta es conocida como biotransformación. Actualmente se aplica tanto en la biotransformación de sustancias exógenas como en el estudio de rutas biosintéticas del metabolismo secundario. El uso de análogos sintéticos a los sustratos naturales puede resultar en la producción de compuestos completamente nuevos con uso muy diverso. La información generada en los estudios de rutas metabólicas se utiliza para desarrollar procesos de síntesis altamente eficiente de productos naturales (Kutney, 1993).

Por otra parte, las cactáceas difieren de otras plantas del desierto por que abren los estomas durante la noche y los cierran durante el día, este hecho es característico de plantas con metabolismo del ácido crasuláceo (metabolismo CAM) que las hace resistir condiciones ambientales extremas, principalmente falta de agua. En el metabolismo secundario, las cactáceas producen una variedad de compuestos, entre los que se encuentran pigmentos

(betalaínas), alcaloides, triterpenos, mucilagos y otros compuestos de defensa (Gibson y Nobel, 1990).

Betalainas.

Los colores amarillo y rojo brillante encontrados en cactáceas son producidos por una clase de pigmentos conocidos como betalainas, éstas son abundantes en raíces frescas de betabel cultivado. El betabel pertenece al género *Beta* (de aquí el nombre de betalainas).

Las betalainas, especialmente las betacianinas (de color rojo), han recibido mucha atención durante las pasadas dos décadas de parte de químicos y biólogos (Mabry, 1980; Piatelli, 1981), al igual que por la industria alimenticia. Aunque, se ha logrado la síntesis de las betacianinas (Hermann, y Dreiding, 1977), la obtención de fuentes naturales pudiera ser la forma más económica de obtener estos pigmentos, además del menor riesgo para la salud y cuidado del medio ambiente. Estos colorantes son sintetizados vía un proceso biosintético que inicia con tirosina (Figura 2). En forma interesante, la síntesis inicia con un compuesto que está presente en todos los organismos vivos, el aminoácido tirosina. De la tirosina se forma un compuesto llamado L-DOPA (forma L de β -(3,4-dihidroxifenil)- α -alanina) y de éste se forman dos compuestos, uno de ellos es el S-ciclo-DOPA y simultáneamente en otra vía el L-DOPA es abierto para formar el ácido betalámico, posteriormente, el ácido betalámico es ligeramente modificado y esta molécula es ligada al nitrógeno de S-ciclo-DOPA para formar betanidina. Cuando una molécula de azúcar es adicionada a betanidina, se produce una betacianina. Las betaxantinas (de color amarillo) se forman por la combinación de una molécula de ácido betalámico con un imino o aminoácido diferente a S-ciclo-DOPA (Gibson, y Nobel, 1990).

Por otra parte, el uso de colorantes como aditivos en alimentos y bebidas es un factor importante para la industria alimenticia y consumidores en la determinación de la aceptabilidad de los alimentos procesados (Spears, 1988).

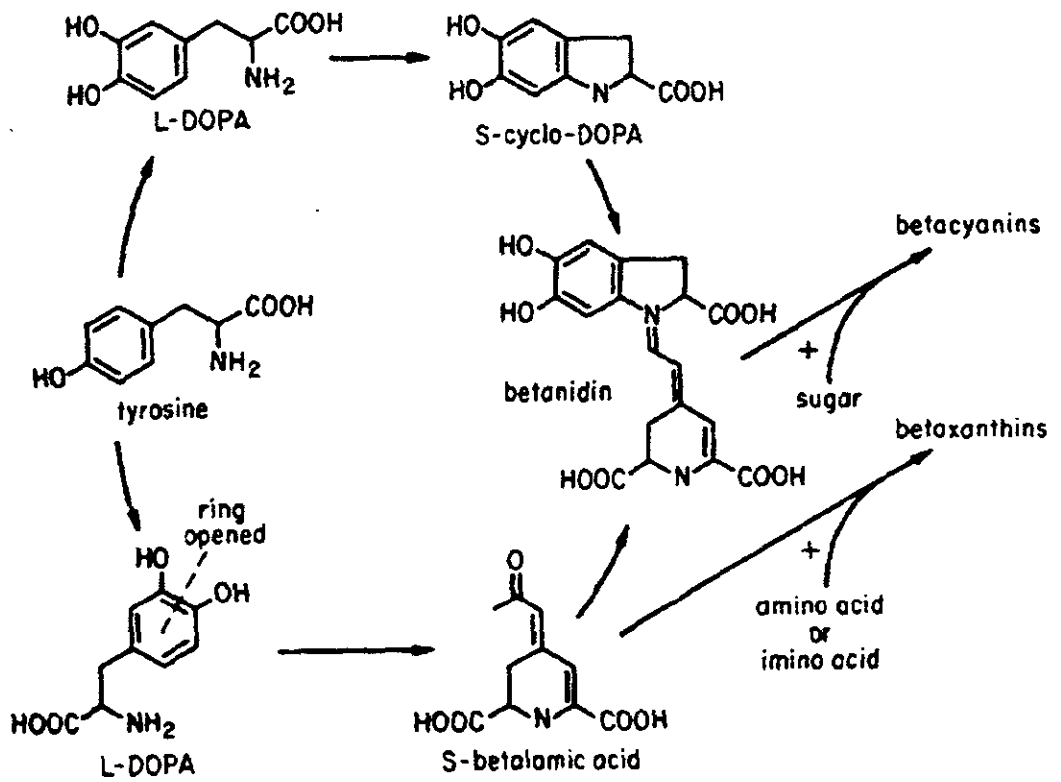


Figura 2.- Ruta Metabólica para la Formación de Betalainas (Gibson y Nobel, 1990).

En este sentido, investigadores de dos compañías japonesas han estudiado la acumulación de betacianinas en *Phytolacca americana*, *Beta vulgaris*, *Chenopodium album* y *Spinacia oleracea* (Misawa, 1980).

Una variedad de factores físicos y químicos están implicados en la regulación de la biosíntesis de betalainas en plantas. En relación a los reguladores de crecimiento (hormonas), se ha reportado que en *Beta vulgaris*, cambios en la composición de los reguladores de crecimiento en la composición del medio pueden ser usados para modular la dirección y frecuencia de la biosíntesis (Girod, y Zrýd, 1991). Por otra parte, el factor luz ha demostrado ser un regulador importante de la formación de betalainas en cultivos de células en suspensión y en plantas de diversas especies. Cultivos de células altamente pigmentados de *Beta vulgaris* (Girod, y Zrýd, 1987) y de *Portulaca grandiflora* (Böhm, et al, 1991) perdieron color al ser cambiados a la obscuridad, por el contrario, el callo de *Chenopodium rubrum* acumuló mayores niveles de betacianinas en la obscuridad que en luz, sin embargo cuando se transfirió a medio líquido en la obscuridad los niveles disminuyeron marcadamente (Berlin, et al, 1986) De acuerdo a lo anterior, en términos de crecimiento y de producción de betalainas, el efecto de la luz parece ser especie dependiente. Por último, otros factores tales como la concentración de nitrógeno y fosfato han demostrado influir en la producción de metabolitos secundarios en cultivo de tejidos vegetales (Knobloch y Berlin, 1981) y por lo tanto pueden tener también un papel importante en la regulación de la biosíntesis de betalainas. En *B. vulgaris* y en *C. rubrum*, se observó que incrementando los niveles de nitrato y de amonio arriba del original de los medios B5 y MS, incrementaba la velocidad de crecimiento del cultivo pero no el contenido de betalainas (Constabel y Nassif-Makki, 1971; Berlin, et al, 1986). Sin embargo, el cambio del contenido de amonio del medio MS por nitrato resultó en un marcado incremento en el contenido de betacianina en cultivo de células en suspensión de *Portulaca grandiflora* (Böhm y Rink, 1988). En cultivos de *C. rubrum* (Berlin, et al, 1986) y de *Phytolacca americana*

(Sakuta, et al, 1987), los niveles de betalainas incrementaron con un aumento en la concentración de fosfato, sin embargo, la eliminación del fosfato del medio de cultivo para *B. vulgaris* resultó en un incremento en la acumulación de betalainas (Constabel y Nassif-Makki, 1971).

Fitoalexinas.

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular acumulados mediante un complejo sistema de defensa en tejidos vegetales después de exponerse a microorganismos. En plantas como papa, arroz y algodón ha sido reportado desde hace tiempo que producen fitoalexinas en respuesta a la infección o elicitación (Harborne, 1988). En diversos artículos se ha sugerido que la acumulación de estos compuestos puede ser un factor importante en la resistencia a patógenos (Cartwright, et al, 1977; Mansfield, 1982) En la mayoría de las leguminosas, las fitoalexinas más potentes son productos de la vía biosintética de los flavonoides, en estos productos se incluyen isoflavonoides tales como la medicarpina, phaseolina y gliceolina, mucho se conoce en relación a su síntesis y las enzimas de las que dependen (Dixon, et al, 1983).

Por el contrario, muy poco se conoce acerca de la respuesta química a la infección microbiana por parte de las plantas del desierto. Recientemente, en investigaciones con *Cephalocereus senilis* (cabeza de viejo), una especie del centro de México, se estableció que una aurona acumulada después de la elicitación del cultivo en suspensión con quitina inhibió el crecimiento de bacterias gram negativo (Paré, et al, 1991), también se observó que esta aurona, cephalocerona, inhibe el crecimiento de la bacteria *Erwinia cacticida* (Paré, y Mabry, 1993), un patógeno de cactáceas, el cual parece ser el responsable de la enfermedad conocida como "putrefacción suave" que destruyó entre 1942-1961 alrededor del 30% de un lote de saguaros en Texas (Bruh, 1971).

Los Hongos como Elicitores.

Las primeras definiciones que se conocieron del término elicitor, establecían que eran compuestos de origen biológico que inducían la acumulación de fitoalexinas, causando el mismo efecto de defensa en la planta como en el patógeno. En la actualidad se conoce como elicitores a las moléculas de origen biológico que pueden inducir la síntesis de compuestos secundarios en una planta, como una respuesta a su presencia.

Los hongos forman parte de los denominados elicitores bióticos. Otros tratamientos para inducir compuestos secundarios son denominados estresantes abióticos e incluyen algún tipo de estrés físico y/o químico tal como la luz UV, exposición al frío o calor, etileno, fungicidas, antibióticos, sales de metales pesados, o altas concentraciones de sal (Eliert, 1987).

La naturaleza química de los elicitores biológicos se debe a que han sido aisladas sustancias tales como: polisacáridos, oligosacáridos, polipéptidos, proteínas, glicoproteínas, enzimas, lípidos y ácidos grasos

Los Sistemas Inducidos con Hongos

Las ventajas que ofrecen los sistemas de cultivo de células elicitadas son varias. Con elicitores se pueden alcanzar los niveles de síntesis de los reactores microbianos, con producciones de gramos por litro en menos de una semana de tiempo total de cultivo (Buitelaar y Tramper, 1992). El proceso de síntesis generalmente involucra un pequeño número de reacciones y como los metabolitos son excretados al medio, las células pueden reutilizarse, en procesos semicontinuos de cultivo (Payne, et al, 1991).

Además, es posible emplear células elicitadas para biotransformaciones porque la elicitación aumenta la actividad de varias enzimas, esto lleva a un proceso más rápido y eficiente de transformación que el observado en células sin tratar (Eliert, 1987). Los cultivos elicitados resultan además adecuados para el análisis detallado, bioquímico y molecular de rutas metabólicas y sus

productos finales: por los altos niveles de enzimas, por la disponibilidad de material y porque son inducibles (Eilert, et al, 1987; Payne, et al, 1991).

Estudios de reconocimiento planta-microorganismo han llevado a la identificación de cuatro diferentes tipos de interacciones que desencadenan la síntesis de sustancias relacionadas con la defensa: 1) el microorganismo excreta una sustancia elicitora (del metabolismo secundario) que es reconocida por las células de la planta; 2) enzimas microbianas liberan componentes de la pared celular de la planta, los cuales actúan como elicitors; 3) las células de la planta secretan una enzima que degrada al microorganismo y los componentes de éste, inducen la formación de fitoalexinas en las células de la planta y 4) compuestos endógenos y constitutivos son activados o liberados por las células de la planta como respuesta a distintos estímulos como daño mecánico, fotooxidación y déficit hídrico (Albersheim, y Valent, 1974; Albersheim, y Anderson-Prouty, 1975; Eilert, 1987; Creelman, y Mullet, 1995).

En el diseño de la estrategia para el uso de un sistema de inducción de metabolitos secundarios, es necesario considerar la especie fúngica a utilizar la cual dependerá de la naturaleza del elicitor. Si es un componente de la pared celular de la planta, cualquier cepa con enzimas hidrolíticas que la degraden puede desencadenar la respuesta; si es un componente de la pared de los hongos, ampliamente distribuido en ese reino, como la quitina, cualquier organismo que la tenga desencadena el proceso. Sólo si se trata de un metabolito secundario fúngico o un constituyente restringido a un pequeño grupo de hongos, se necesitarán especies asociadas con la planta.

La concentración del elicitor es un factor que influye fuertemente en la intensidad de la respuesta (Eilert, 1987; Barz y Mackenbrock, 1994). Usualmente se requieren entre 50 y 100 mg de elicitor para matraces de 250 ml con 50 ml de células en suspensión (Deverall, 1972; Bruce y West, 1982; Chappell, y Nable, 1987; Facchini, y Chappell, 1992; Bohlmann y Eilert, 1994). La cantidad adecuada debe determinarse experimentalmente en cada caso.

La etapa de crecimiento en la cual es elicitado el cultivo tiene influencia sobre la respuesta. A diferencia de los cultivos sin tratar, no se presenta mayor producción en la fase estacionaria, sino en la exponencial, cuando las células están en crecimiento activo (Eilert, 1987).

Mecanismo de Acción del Proceso de Inducción.

Cuando una planta detecta la presencia de un patógeno desencadena una serie de señales para iniciar el proceso de defensa. Este incluye toda una maquinaria bioquímica iniciada por la interacción entre los elicitores y la células vegetales. Se sabe, que las señales son de diverso tipo, sin embargo, éstas dependen del entorno en el que se desarrolle el ataque y por consecuencia la respuesta de defensa, también dependerá de esto. (Cooper, 1983; Ayres, 1990; Afek, 1995). La expresión genética por efecto de elicitores es complicada, se sabe que se presenta una inducción coordinada de enzimas tanto en la etapa de transcripción como en la de transducción, sin embargo cada enzima es estimulada en forma diferencial (Barz, y Mackenbrock, 1994; Bohmann y Eilert, 1994). El proceso de defensa, es en sí un sistema que inicia localmente y en forma secuencial se extiende a toda la planta (Eilert, 1987; Barz y Mackenbrock, 1994).

De acuerdo con Kuhn y Hargreaves, (1987), cuando la planta requiere del sistema de defensa, lo hace utilizando dos sistemas distintos pero coordinados: por una parte, a) la defensa constitutiva y; b) la defensa activa. La defensa constitutiva, siempre se encuentra activa; mientras que la segunda se activa únicamente cuando existe la infección de un organismo patógeno.

La defensa constitutiva está conformada por las llamadas sustancias antifúngicas preinfeccionales. Dentro de las sustancias preinfeccionales se encuentran las conocidas como inhibitinas, mismas que se encuentran sólo en bajas concentraciones. Cuando existe una infección se presenta un incremento

considerable en la concentración de estas sustancias antifúngicas preinfeccionales (Bell, 1981; Kuhn y Hargreaves, 1987).

Por otra parte, cuando se detecta la presencia de organismos externos, en los tejidos de las plantas se dispara la defensa activa, conformada por una serie de mecanismos en tres líneas de defensa (Hahlbrock, et al, 1995; Terras, et al, 1995).

La primera línea de defensa es una respuesta inmediata, el objetivo es reforzar la pared celular y ayudarla contra la infección. La lesión y su entorno, son encapsulados por la agregación de compuestos sintetizados como respuesta, entre éstos se incluyen, calosa, lignina, fenoles y fitoalexinas (Allen y Friend, 1983; Eilert, 1987; Messner y Boli, 1993; Hahlbrock, et al, 1995; Terras, et al, 1995).

La segunda etapa de la defensa activa, lo conforma la denominada segunda línea de defensa, este es un sistema local que se da en el área de infección, en ésta, la velocidad de respuesta, a diferencia de la primera línea de defensa, es intermedia y tiene como objetivo producir proteínas de defensa (PR), además de la síntesis de sustancias antimicrobianas que disminuyan el crecimiento de micelio e impidan el avance de la infección a otras células de la planta. Una vez conformadas, la primera y segunda líneas de defensa se forma lo que se conoce como respuesta hipersensible (Hahlbrock, et al, 1995; Terras, et al, 1995). Aún cuando la planta monta estas dos líneas de defensa, las células que las generan mueren ya sea por efecto de los invasores o bien por efecto de los compuestos tóxicos de defensa sintetizados.

Cuando se inducen diferentes especies con un mismo tipo de elicitor, las plantas pueden producir distintos tipos de compuestos químicos (fitoalexinas). Las características y estructura química de estos compuestos es muy diverso de familia a familia y en ocasiones de género a género en las plantas, favoreciendo que exista una gran cantidad de fitoalexinas diferentes. Se conoce, que en las plantas éstas pueden ser sintetizadas por tres vías metabólicas diferentes: a) acetato-malonato b) acetato-mevalonato y; c)

shikimato (Deverai, 1972; Bell, 1981; Wierman, 1981; Bestwick, et al, 1995). También se ha observado que algunos de estos compuestos secundarios pueden ser producidos por la planta como respuesta a otros tipos de estrés como luz UV (Ensminger, 1993). En la defensa local de la planta, las fitoalexinas actúan como retardantes de crecimiento de las hifas o como inhibidores de enzimas hidrolíticas fúngicas (Messner y Boll, 1993).

Una planta, produce varias fitoalexinas (Buitelaar y Tramper, 1992; Kokubun, et al, 1995), debido a que se acumulan metabolitos secundarios derivados de diferentes puntos de la vía metabólica.

Por último, la llamada tercera línea de defensa que es una respuesta lenta, adicional a las otras dos y conocida como resistencia sistémica adquirida. Se da en órganos e incluso en todo el vegetal y tiene como objetivo la expresión genética para inducir la aparición de enzimas hidrolíticas específicas, mismas que actúan sobre las paredes de los hongos, comunmente quitinasas y 1,3 β -glucanasas (Eilert, 1987; Messner, y Boll, 1993; Hahlbrock, et al, 1995; Terras, et al, 1995).

Según Peters y Verma (1990), el proceso de interacción elicitor-planta incluye un modelo con dos componentes: 1) un receptor del elicitor ubicado en la membrana de la planta y 2) una molécula reguladora que activa el proceso de transcripción.

Una vez que la membrana detecta la presencia de un elicitor modifica la condición de la membrana plasmática incrementando el intercambio de iones dentro y fuera de la membrana en dos sentidos: a) entran Ca^{2+} y el ión H^+ y salen K^+ y Cl^- (Tomiya, et al, 1983). Aumenta la demanda de oxígeno y se genera poder reductor.

Es conocido (Creelman, y Mullet, 1995), que el ácido jasmónico es el regulador del crecimiento que induce los genes que codifican la formación de proteínas relacionadas con la defensa (PR). Cuando se altera la membrana, como respuesta, la planta libera ácido linolénico, uno de los ácidos grasos más abundante de la membrana de la mayoría de las plantas. Posteriormente, este

ácido es transformado en ácido jasmónico mediante un proceso que requiere de la enzima lipooxigenasa y por lo tanto se favorece la inducción de proteínas de defensa (PR).

Otro factor importante en la transducción de señales del elicitor, lo es la fosforilación regulada por señales fisiológicas intracelulares: ATP, AMPc, y adenilación (Payne, et al, 1991; Hahlbrock, et al, 1995). La actividad de la quinasa incrementa el factor de unión con ADN y estimula a las fosfolipasas a la liberación de ácido linolénico para su posterior conversión en ácido jasmónico (Chasan, 1995).

Por último, el ácido salicílico desempeña un papel principal en la defensa de las plantas contra patógenos. Se encuentra normalmente en las células una forma inactiva de almacenamiento, el ácido salicílico β -glucosido. Ante la presencia del elicitor, este ácido es activado e inmediatamente se une a la enzima catalasa, inhibiéndola. Al inhibirse la enzima catalasa se acumula H_2O_2 , este peróxido favorece la transcripción del gen PR-1, se produce la proteína y se incrementa la resistencia sistémica y la local en la planta. (Payne, et al, 1991; Chen, et al, 1995; Hahlbrock, et al, 1995,).

OBJETIVOS

General

Establecer el cultivo de células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* (Cactaceae) para la obtención de metabolitos secundarios, evaluando el efecto de reguladores de crecimiento y elicitores biológicos.

Específicos

- a) Establecer el cultivo de células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli*.
- b) Inducir, extraer y cuantificar los pigmentos betalainas inducidos por efecto de reguladores de crecimiento.
- c) Inducir, extraer y cuantificar las fitoalexinas inducidas por efecto de elicitores biológicos.
- d) Evaluar mediante pruebas biológicas el efecto de las fitoalexinas sobre hongos fitopatógenos.

MATERIALES Y METODOS

Plan de Trabajo.

El trabajo realizado para lograr los objetivos que se propusieron para esta investigación se desarrolló de acuerdo con los esquemas de las figuras 3 y 4. Esta se dividió en dos etapas:

- 1) Inducción de pigmentos por efecto de reguladores de crecimiento y extracción de los mismos.
- 2) Inducción de compuestos producidos por efecto de elicitores biológicos, su extracción, así como su evaluación en pruebas de actividad biológica contra hongos fitopatógenos.

Material Biológico

El material vegetal utilizado para esta investigación fue callo de *Mammillaria huitzilopochtli*, el cual había sido obtenido en un trabajo anterior (Arriaga, 1994), mantenido en cultivo *in vitro* por 2-3 años, y que fue subcultivado durante este tiempo en medio Murashige y Skoog, 1962 (MS). Este callo sirvió como inóculo para iniciar el cultivo en medio sólido MS.

Medios de Cultivo

En todos los cultivos vegetales realizados durante esta investigación se empleó el medio básico Murashige y Skoog 1962 (MS), en el cual, se evaluaron distintas concentraciones de las hormonas, 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y benzilaminopurina (BAP), para la inducción de pigmentos (Ver Tabla 3). La composición del medio se detalla en la Tabla 4. En todos los casos, se ajustó el pH del medio a 5.7 con HCl y KOH 1N y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 1.5 kg/cm² de presión.

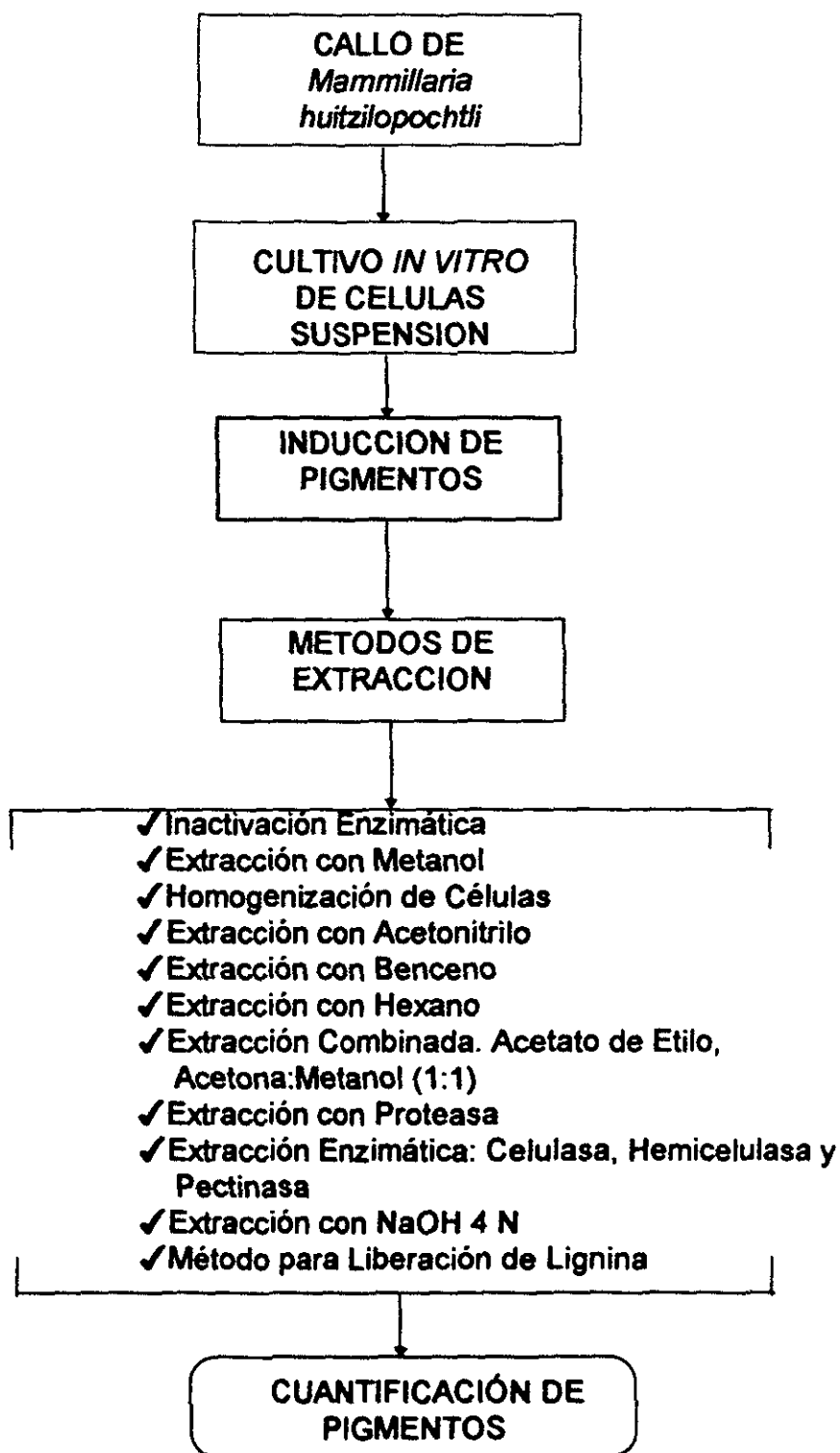


Figura 3.- Diagrama de flujo que muestra la estrategia desarrollada para obtener pigmentos por efecto de reguladores de crecimiento.

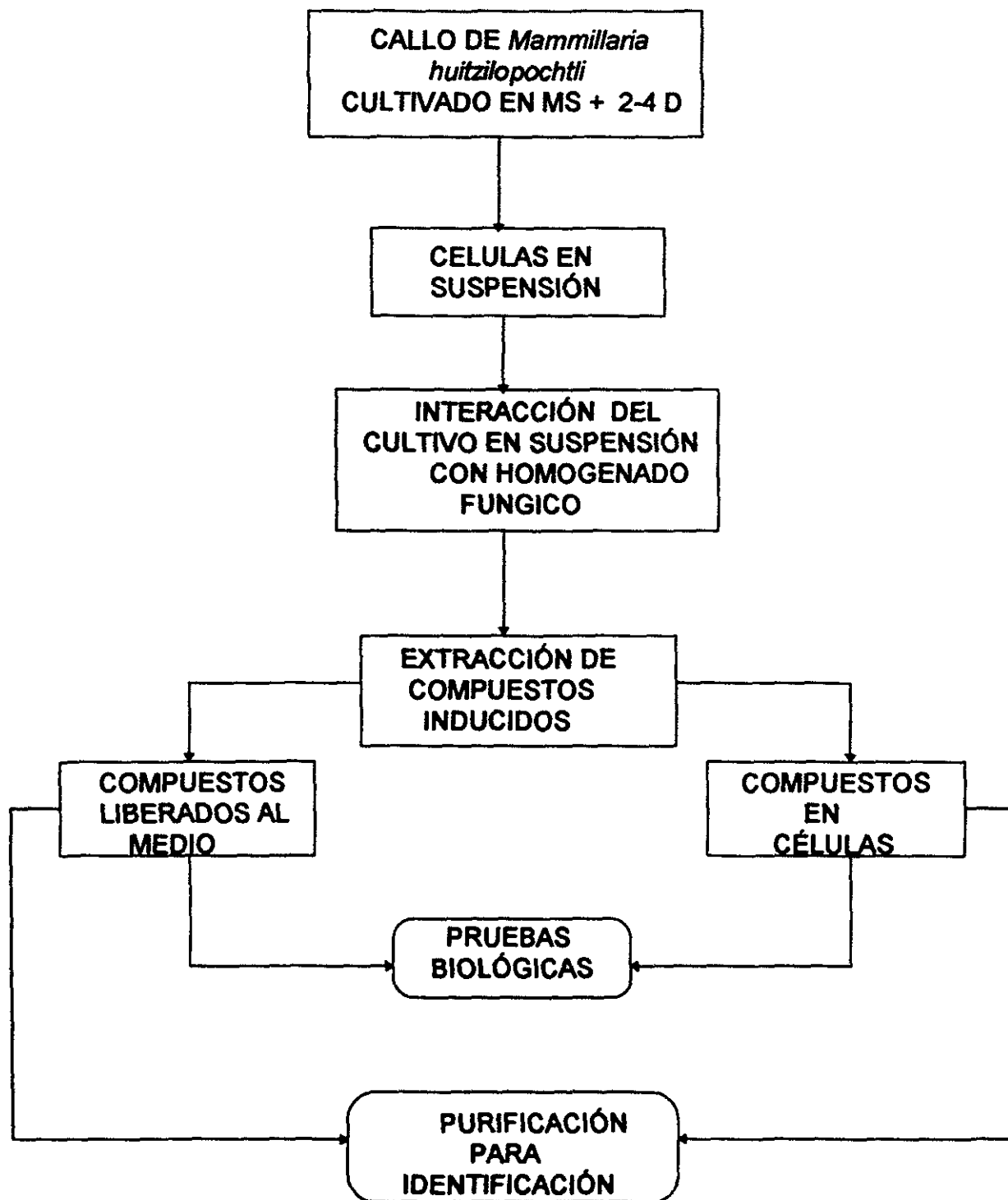


Figura 4.- Diagrama de flujo que muestra la estrategia desarrollada para obtener metabolitos secundarios por efecto de elicitors biológicos (homogenado fúngico).

Tabla 3: Tratamientos Utilizados para Evaluar el Efecto de 2,4-D y BAP Sobre la Inducción de Pigmentos en *M. huitzilopochtli*, y su Biomasa.

Tratamiento	Concentración de 2,4-D mg/l	Concentración de BAP mg/l
1	0	0
2	0	1
3	0	5
4	0	10
5	0.01	0
6	0.01	1
7	0.01	5
8	0.01	10
9	0.1	0
10	0.1	1
11	0.1	5
12	0.1	10
13	1	0
14	1	1
15	1	5
16	1	10

En el caso del medio MS sólido se diferenció del líquido en el contenido de agar, 8 g por litro de agar bacteriológico para el sólido, omitiéndose en el medio líquido. Además, se adicionó 30 g/l de sacarosa, como fuente de energía, en ambos casos.

Tabla 4.- Composición del Medio de Cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

Componentes*					
Macronutrientes					
KNO ₃	NH ₄ NO ₃	CaCl ₂ ·2H ₂ O	MgSO ₄ ·7H ₂ O	KH ₂ PO ₄	
1900	1650	440	370	170	
Micronutrientes					
MnSO ₄ ·4H ₂ O	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	H ₃ BO ₃	KI	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
22.3	8.6	6.2	0.8	25 µg	250 µg
Otros Micronutrientes					
CoCl ₂ ·6H ₂ O		FeSO ₄ ·7H ₂ O		Na ₂ EDTA·2H ₂ O	
25 µg		27.8 µg		37.6	
Vitaminas					
Myo-inositol		Tiamina-HCl		Acido nicotínico	
100		0.1		0.5	

* Todas las concentraciones son en mg, excepto donde se indica otra unidad.

Para el cultivo de los hongos utilizados en la inducción de fitoalexinas y en las pruebas biológicas se usó el medio Papa Dextrosa Agar (PDA), preparado de la siguiente manera: 200 g de papa pelada se rebanaron y lavaron varias veces con agua corriente, se hirvieron en 500 ml de agua destilada, durante 15 minutos a 1.5 kg/cm² de presión, después el agua se filtra con una malla de acero inoxidable de 200 mesh y se le adicionan 14g de dextrosa y 16 g de agar, la mezcla se afora a un litro con agua destilada y se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 1.5 kg/cm² de presión. Cuando el medio alcanza alrededor de 60°C se vierte en cajas petri 25 ml de medio, bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar.

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

Extracción de Pigmentos.

Debido a la dificultad que representó la inducción, extracción y cuantificación del colorante presente en las células de *M. hutzilopochtli*, hubo la necesidad de probar una serie de métodos reportados en la bibliografía para llevar a cabo esta parte de la investigación. Estos se describen a continuación.

Inactivación Enzimática

Se utilizó la metodología propuesta por Rodríguez et al, (1994) para la extracción de betalainas usando inactivación enzimática a 80 °C. El material vegetal se homogenizó en un mortero de porcelana, posteriormente el pigmento se extrajo en agua en un matraz Erlenmeyer mediante el calentamiento en baño maría hasta alcanzar los 80 °C, se mantuvo en esta temperatura por dos minutos, se filtró en papel Whatman N° 1 y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160A) a 480 y 540 nm para betaxantinas y betacianinas, respectivamente. Este método se realizó en el Centro de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI).

Extracción con Metanol

La extracción con metanol de betalainas en una variedad de plantas ha sido reportada por varios autores.

Berlin et al (1986), utilizaron una metodología para la extracción de betalainas en cultivos en suspensión de *Chenopodium rubrum*. Cantidades celulares de 5 gramos de *M. hutzilopochtli*, se molieron en un mortero de porcelana, se liofilizaron (Labconco), posteriormente se extrajo dos veces en metanol al 100 % (lo suficiente para cubrir la biomasa celular) se colocó en agitación continua por 30 minutos a temperatura ambiente, se filtró en papel Whatman. En este punto de la metodología se obtuvo un extracto amarillo, característico de las betaxantinas. El residuo celular fue entonces extraído dos veces con metanol acuoso al 50%, en esta parte se extrajeron las betacianinas presentes.

Sakuta et al, (1987), utilizaron un método para la extracción de betalaínas en cultivos en suspensión de *Phytolacca americana* basado en la extracción con metanol acuoso. Cantidades celulares de 2 gramos de *M. hutzilopochtli*, se molieron en un mortero, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50 ml se le adicionó 5 ml de metanol acuoso al 80% para llevar a cabo la extracción, posteriormente se filtró en embudo Buchner con papel filtro Whatman, el sobrenadante se leyó en el mismo espectrofotómetro a 480 y 540 nm.

Con el objetivo de mejorar la extracción de las betalaínas, a esta última metodología, se le realizaron diversas modificaciones, entre las que se encuentran: un mayor tiempo de agitación (10, 20 y 60 minutos), mayor cantidad de metanol al 80% y sonicación de las células (Bransonic, tipo baño maria).

Homogenización de Células.

Para la homogenización de las células se utilizó un homogenizador tipo Ultraturrax. Este proceso consistió en la colocación del material celular en tubos especiales para manejo de material en el homogenizador, el rompimiento celular se llevó a cabo por el choque de las cuchillas de acero inoxidable del homogenizador con el material vegetal. El proceso tuvo una duración en tiempo de 5 minutos al máximo de velocidad (no especificada en este equipo).

Para la confirmación del rompimiento de las células homogenizadas se tomaron diversas microfotografías en un fotomicroscopio Carl Zeiss, en el Departamento de Microcine de la Facultad de Ciencias. Las microfotografías se realizaron sobre células: 1) enteras pigmentadas, 2) Homogenizadas y, 3) homogenizadas-extraídas, a una amplitud de 40X en un sistema de campo claro.

Extracción con Solventes de Diferente Polaridad.

Cuando se trabaja con material desconocido en procesos de extracción, es común realizar un barrido con solventes de diferente polaridad con la finalidad de encontrar el mas apto para los compuestos que se desean extraer y suponer sus posibles características químicas. De acuerdo con un rango de polaridad de diferentes solventes y buscando cubrir un espectro de polaridad (alta-media-baja), para la extracción de los pigmentos de células en *suspensión M. huitzilopochtli*, se seleccionaron los siguientes

- 1) Acetonitrilo (polaridad alta)
- 2) Acetato de Etilo (polaridad intermedia)
- 3) Benceno (polaridad intermedia)
- 4) Hexano (polaridad baja)

Para la aplicación de cada uno de estos solventes se utilizó el mismo procedimiento en donde, células en suspensión de *M. huitzilopochtli* (10 g) fueron homogenizadas por 5 minutos en un homogenizador Ultraturrax, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se le adicionó 100 ml de acetonitrilo y se mantuvo en agitación constante (parrilla de agitación, con magneto) por un tiempo aproximado de 16 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró y analizo según se describe en el método de Inactivación Enzimática.

Extracción Combinada Acetato de Etilo-Acetona:Metanol (1:1).

De acuerdo con los resultados observados con el acetato de etilo, se decidió probar una combinación entre este solvente y una mezcla acetona:metanol (1:1).

Células en suspensión de *M. huitzilopochtli* (10 g) fueron homogenizadas por 5 minutos en un homogenizador Ultraturrax, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se le adicionó 100 ml de acetato de etilo y se mantuvo en agitación constante (parrilla de agitación, con magneto) por un tiempo

aproximado de 16 h, a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró en papel Whatman. El residuo fue re-extraído con 100 ml de una mezcla de acetona-metanol (1:1) por 4 horas en agitación constante (parrilla de agitación, con magneto) a temperatura ambiente. El sobrenadante se leyó a 480 y 540 nm en el mismo espectrofotómetro.

Extracción con Proteasa.

Se desarrolló una extracción utilizando una enzima proteolítica. Se disolvieron aproximadamente 5 mg de proteasa en 5 ml de agua destilada, a esta solución se le agregaron 50 mg de células de *M. huitzilopochtli* homogenizadas (homogenizador Ultraturax, 5 min.) (comunicación personal, Dra. Irma Bernal Lugo). Esta mezcla se mantuvo en agitación suave (parrilla de agitación, 60 rpm) a temperatura ambiente por un tiempo de 24 h. Se realizó evaluación visual a las 12 y 24 h posteriores.

Extracción con una Mezcla de las Enzimas: Celulasa, Hemicelulasa y Pectinasa.

Se realizó una extracción usando una mezcla de enzimas degradativas de pared celular. En 5 ml de agua destilada se mezclaron 10 Unidades de cada una de las siguientes enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa. A esta solución se le adicionó 50 mg de células homogenizadas (homogenizador Ultraturax, 5 min.). Esta mezcla se mantuvo en agitación suave (parrilla de agitación, 60 rpm) a temperatura ambiente por un tiempo de 24 h (comunicación personal, Dra. Irma Bernal Lugo). Se realizó evaluación visual a las 12 y 24 h posteriores.

Extracción con NaOH 4N.

Otra alternativa para la degradación de pared celular es una solución de NaOH 4N. A 50 mg de células homogenizadas (homogenizador Ultraturax, 5 min) de *M. huitzilopochtli*, se le adicionaron 5 ml de una solución de NaOH 4N y se mantuvo en agitación suave (parrilla de agitación, 60 rpm) a temperatura

ambiente por un tiempo de 24 h (comunicación personal, Dra. Irma Bernal Lugo). Se realizó evaluación visual a las 12 y 24 h posteriores.

Método para la Liberación de Lignina.

Este método se basa en el utilizado para la obtención de taninos en sorgo. A 50 mg de células homogenizadas de *M. huitzilopochtli*, se le adicionó 10 ml de una solución de ácido ascórbico 10 mM disuelta en etanol, se mantuvo dos horas a temperatura ambiente sin agitación y posteriormente se centrifugó en una centrifuga Labconco (3000 rpm), se decantó y después el residuo fue extraído nuevamente (tres veces) ahora en una solución de ácido ascórbico 10 mM en metanol (Bernal Lugo, comunicación personal).

Crecimiento Celular.

El crecimiento de las células pigmentadas se siguió en el tiempo por diferencia de peso de la biomasa durante 25 días. Esto se llevo a cabo cuantificando peso fresco y seco en intervalos de 5 días. El medio utilizado fué MS adicionado con 0.1 mg/l de la hormona 2,4-D. El peso fresco se cuantificó filtrando al vacío las células en suspensión y su posterior pesado, este material se utilizó para cuantificar peso seco en una estufa de secado a 50-60°C por 16 h. La evaluación se realizó con 5 repeticiones de cada una, los resultados son el promedio de éstas.

Además, paralelamente, se obtuvieron muestras, también por triplicado, de células que fueron sometidas a un proceso de liofilización para su posterior análisis de los pigmentos contenidos en este material.

Inducción, Extracción y Pruebas de Actividad Biológica de Fungicidas Elicitados.

Como parte de la estrategia para la inducción de metabolitos secundarios en *M. huitzilopochtli*, se probó el efecto de elicitores biológicos, para lo cual se aplicó el esquema de la figura 4.

Cultivos en Suspensión para la Inducción de Fungicidas

Los cultivos en suspensión se realizaron en matraces erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio MS, adicionado con 0.1 mg/l del regulador de crecimiento 2,4-D. Este medio, en experimentos previos favoreció la producción de biomasa. El inóculo fue de 2 g/matraz de callo obtenido previamente por el método descrito por Arriaga, E. (1994). Las condiciones de cultivo *in vitro* fueron de: agitación de 80 rpm (mesa de agitación rotatoria), fotoperiodo largo (16 horas luz/ 8 horas oscuridad) con iluminación de (0.01 watt/m²), en una cámara de incubación con una temperatura controlada de 27 ± 2 °C.

Material Elicitor.

Como elicitores biológicos se probaron 2 hongos (*Fusarium sp.* y *F. moniliforme*) aislados originalmente de la planta *Piqueria trinervia*. (Saad, 1996.).

Primeramente se hicieron crecer en medio agar papa-dextrosa y posteriormente en medio MS, (1962), sin agar hasta lograr tener una cantidad de 15-20 g, suficiente para ser homogenizado.

La homogenización de estos hongos se llevó a cabo de la siguiente manera: primeramente se filtró el medio con hongo a través de una malla de acero inoxidable de 200 mesh y se lavo con agua destilada, posteriormente se le agregó acetona para eliminar el agua y hacerlo más manejable, después se molió en mortero hasta formar una pasta homogénea. Se colocó en tubos de ensayo con rosca una cantidad de 100 mg por tubo y por último se esterilizó durante 20 minutos, en autoclave a 1.5 kg/cm² de presión.

Además de hongo homogenizado, se utilizó quitina, quitosan y hongo seco finamente molido, todos en una cantidad de 20 mg, esto con el objeto de verificar cual es la parte del hongo que posiblemente esté causando el efecto y basado en observaciones hechas por otros investigadores (Bonness, et al, 1993). Estos se pesaron, se colocaron en tubos de ensaye y se esterilizaron, en las condiciones previamente mencionadas.

Extracción de Compuestos Inducidos con Elicitores.

Los métodos de extracción probados dependieron del origen del material a ser extraído:

1) Compuestos liberados al medio de cultivo.

El medio se separó de las células por filtración, a través de una malla de acero inoxidable de 200 mesh, una posterior centrifugación por 15 minutos a 3000 rpm y decantación para obtener un volumen considerable de medio líquido color amarillo producto de la sustancia liberada por las células.

Este líquido fue extraído con acetato de etilo al 100% (3 veces). Por cada 100 ml de medio extraído se adicionaron para la extracción en total 300 ml de acetato de etilo (100 ml por repetición), posteriormente al extracto obtenido se le adicionó 10-15 g de la sal tiosulfato de sodio pura para la eliminación de residuos de agua, después de lo cual se concentró en un rotavapor Buch a 80°C.

2) Compuestos presentes al interior de las células.

El pigmento presente al interior de las células se extrajo después de ser homogenizadas en un homogenizador Ultraturrax por 5 minutos. A 30-40 g de células homogenizadas de *M. hutzilopochtli*, se le adicionó 100 ml de una mezcla de diclorometano:metanol (9:1) (3 veces), al extracto obtenido posteriormente se le adicionó 10-15 g de la sal tiosulfato de sodio pura para la eliminación de residuos de agua, después de lo cual se concentró en un rotavapor Buch a 80°C. El color de esta mezcla de pigmentos fue rojo-café antes de su concentración en el rotavapor.

A los dos extractos anteriores se les realizó el análisis UV-Visible para observar los picos de mayor incidencia. Además, se probaron diferentes solventes resultando ser estos los de mejores resultados.

Purificación de Compuestos Elicitados.

Los extractos obtenidos se eluyeron para su separación primeramente en placas de silicagel para observar la presencia de compuestos, no obstante, no se logró separar adecuadamente por lo que se probó en placas de celulosa microcristalina (Sigma), obteniendo mejores resultados. Posteriormente y por la imposibilidad de contar con placas preparativas de celulosa, se utilizó una columna de celulosa microcristalina para la obtención de las fracciones conteniendo los compuestos de interés, se eluyeó en ambos casos (extracto del medio y de las células) con una mezcla de metanol:agua (8:2). Las fracciones se analizaron por resonancia magnética nuclear (Varian Gemini/2000) e infrarojo (Nicolet, BFT/IR55X) del Laboratorio de Espectrometría del Instituto de Química de la UNAM.

Pruebas de Actividad Biológica.

Debido a que la producción del pigmento puede ser del tipo respuesta-fitoalexina, procedimos a realizar una prueba de actividad biológica. Esta prueba se realizó contra 8 hongos fitopatógenos, éstos se enlistan en la Tabla 5:

Tabla 5: Hongos Fitopatógenos Utilizados en las Pruebas Biológicas.

Número de Hongo	Grupo Taxonómico
1	<i>Cladosporium sp.</i>
2	<i>Phoma sp.</i>
3	<i>Alternaria sp.</i>
5	<i>Rhizoctonia sp.</i>
6	<i>Fusarium sp.</i>
7	<i>Fusarium moniliformes</i>
8	<i>Helminthosporium sp.</i>
9	<i>Phaeoacremonium sp.</i>

La prueba se realizó de la siguiente manera:

Se preparó, por una parte, medio agar papa-dextrosa sin adición y adicionado con extracto total obtenido del medio de cultivo de células de *M. huitzilopochtli* inducido con elicitores. La adición del extracto se realizó en la campana de flujo laminar después de disolverlo en etanol al 95%, no tóxico para los hongos (Saad,1996) y filtrarlo a través de una membrana milipore de 0.45 micras. Las concentraciones probadas del extracto total fueron: a) 100 ppm, con tres repeticiones, en los hongos enlistados en la Tabla 5 y; b) posteriormente para ampliar el espectro de evaluación se probaron concentraciones de: 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 ppm, con 4 repeticiones, sobre el hongo *Phoma sp.* en el se observaron los mejores resultados a 100 ppm.

Este proceso se llevó a cabo, colocando un pequeño inóculo de cada hongo en el centro de cada placa, con su respectivo tratamiento. Los resultados se evaluaron midiendo crecimiento radial del hongo en milímetros, tanto en el control como en el adicionado con el extracto total. Los resultados se promediaron de sus respectivas repeticiones para cada caso.

En estas pruebas biológicas se determinó el porcentaje de inhibición al final de cada experimento, la fórmula que se utilizó para calcularlo fue la siguiente:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{LC-LE}{LC} \times 100$$

Donde:

LC: Longitud en milímetros del control.

LE: Longitud en milímetro del adicionado con extracto.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó para las dos pruebas biológicas: a) con los 8 hongos fitopatógenos y b) con el hongo *Phoma sp.* Este incluyó un análisis de varianza y una prueba de separación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 5% y se realizó con la ayuda del programa de computación Statgraphics Plus versión 4.21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de Pigmentos.

El primer intento por inducir los pigmentos se llevó a cabo en medio MS sólido utilizando los reguladores de crecimiento en donde *M. huitzilopochtli* había presentado, en trabajos previos, una coloración rojo-púrpura (Arriaga, 1994). El tejido generado de estos experimentos mostró una coloración púrpura similar a la ya reportada. No obstante la presencia del pigmento, la biomasa obtenida fue de alrededor de 0.5-1 g/explante después de un periodo de evaluación de 30 días, cantidad muy pequeña como para ser considerada como una alternativa viable para seguir con la investigación.

Con este antecedente, se decidió utilizar una combinación diferente de reguladores de crecimiento para inducir el colorante y a la vez aumentar la producción de biomasa. En base a un análisis en la bibliografía se utilizó una combinación de la auxina 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y la citocinina (BAP) para la inducción de betalainas que ya había sido probada con buenos resultados en otras especies pertenecientes al orden de las *Centrospermae*, mismo al que pertenecen la familia de las cactáceas (Berlin, et al, 1986; Sakuta, et al, 1987; Villegas-Garrido, et al, 1992). En la Tabla 6, se observan los resultados obtenidos en la evaluación de los 16 tratamientos probados con la combinación de 2,4-D y BAP, sobre la producción de betalainas.

Los tratamientos que mejor respondieron a la síntesis del pigmento fueron el 9, 14, 15 y 7, en un orden de mayor a menor, esta evaluación se realizó en forma visual. En la figura 5, se muestran las gráficas para las curvas de crecimiento de estos 4 tratamientos y el control. En ella se observa un incremento considerable en la producción de biomasa para los 4 tratamientos. De éstos el que mostró mejor efecto sobre la producción de biomasa fue el tratamiento 7 con un biomasa promedio de 21.54 g. Sin embargo desde el punto de vista de producción del colorante, el que mejores resultados mostró fue el tratamiento 9.

Tabla 6: Resultados de los 16 tratamientos utilizados para evaluar el efecto de 2,4-D y BAP sobre la Inducción de pigmentos en *Mammillaria huitzilopochtli*, y su biomasa.

Tratamiento	Concentración de 2,4-D mg/l	Concentración de BAP mg/l	Color^a	Biomasa^b
1	0	0	V	+
2	0	1	V	-
3	0	5	V	-
4	0	10	V	-
5	0.01	0	V	++
6	0.01	1	V	+++
7	0.01	5	RP	+++
8	0.01	10	V	+++
9	0.1	0	RI	++
10	0.1	1	V	+++
11	0.1	5	V	+++
12	0.1	10	V	+++
13	1	0	RP	-
14	1	1	RP	++
15	1	5	V	+
16	1	10	V	-

a= V: Predominantemente verde; RP: Predominantemente rojo pálido; RI: Predominantemente rojo intenso.

b= - (2-4.5 g); + (4.6 - 6.5 g); ++ (6.6 - 13 g); +++ (13.1 - 22 g).

En ninguna repetición del tratamiento control (sin reguladores de crecimiento) apareció la coloración del pigmento observado en los demás tratamientos adicionados con hormonas.

A la luz de estos resultados, el tratamiento 9 (MS, adicionado con 0.1 mg/l de 2,4-D) fue utilizado para todos los demás experimentos realizados, tanto para la inducción de betalainas como para la inducción de fitoalexinas por efecto de elicitores.

Extracción de Pigmentos Inducidos en Cultivo en Suspensión.

El método de inactivación enzimática ha sido utilizado por varios investigadores para la extracción de betalainas en plantas (Villegas-Garrido, et al, 1992; Rodríguez et al, 1994). Los resultados obtenidos con este método

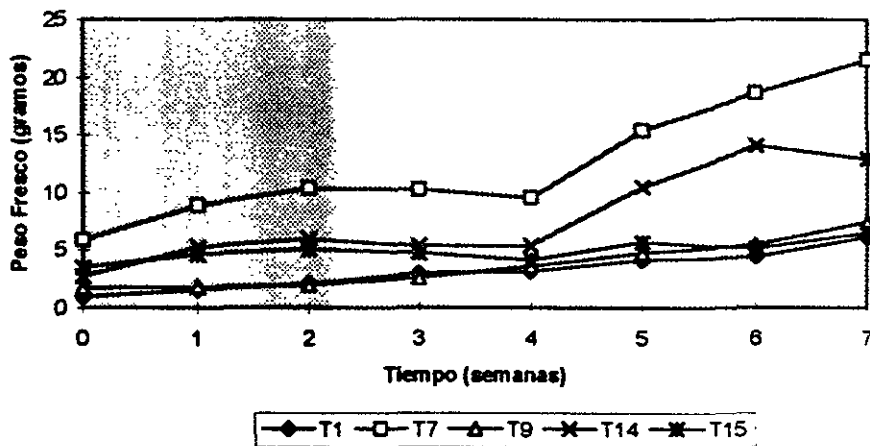


Figura 5.- Crecimiento celular de *Mammillaria huitzilopochtli* en medio sólido MS adicionado con diferentes concentraciones de 2,4-D y BAP (ver tabla 6 y texto para detalles).

(Tabla 7) se consideran insatisfactorios debido a que después de aplicarlo, no se logró extraer gran parte del pigmento presente en las células, ya que al observarlas al microscopio se confirmó la presencia del pigmento al interior de éstas. A diferencia de lo encontrado por Rodríguez, et al. (1994), en donde se logró obtener buenos resultados, al extraer y cuantificar las betalainas presentes en cultivos celulares de betabel (*Beta vulgaris*), que en *M. huitzilopochtli*, la extracción fue incipiente, esto pudiera deberse a las características de la pared celular que tienen cada especie, como lo mencionan Gibson y Nobel (1990), en cactáceas y suculentas en general, la pared celular es gruesa y de poca flexibilidad (Gibson y Nobel, 1990).

Tabla 7.- Concentración de betaxantinas (480 nm), betacianinas (540 nm) y betalaina total en extractos obtenidos por el método de inactivación enzimática en células de *Mammillaria huitzilopochtli*.

Extracto*	Betaxantina mg/ml	Betacianinas mg/ml	Betalaina Total mg/ml
1	0.19	0.28	0.47
2	0.30	0.43	0.73
3	0.17	0.38	0.55
Promedio	0.22	0.36	0.58

* Los extractos 1, 2 y 3, representan las tres repeticiones realizadas.

En 1995, Ontiveros y Rodríguez, reportaron para *Beta vulgaris* una extracción de hasta 10 mg/ml para betaxantinas y de 8 mg/ml de betacianinas, dependiendo de la línea celular extraída, resultados superiores a los obtenidos en *M. huitzilopochtli* (Tabla 7). Esto supone que la extracción de estos pigmentos en células de *M. huitzilopochtli* sean insatisfactorios debido a: 1) la cantidad extraída del colorante no es representativa del total al interior de la célula y; 2) de acuerdo con reportes de extracción y cuantificación de betalainas en otras especies (Jiménez-Aparicio, et al, 1992; Rodríguez, et al, 1994; Ontiveros y Rodríguez, 1995), las cantidades que se obtuvieron en *M. huitzilopochtli*, no son lo suficientemente altas para ser considerados como un método de extracción adecuado en este caso.

En la figura 6 se muestra el espectro de absorción obtenido de uno de los extractos y de un sobrenadante. Contrario a lo que esperábamos el mayor pico de absorción se presentó alrededor de los 300 nm y en los dos casos su desarrollo gráfico es idéntico. Este pico de absorción pudiera deberse, a otras sustancias químicas propias de las células, pues es claro que betalaínas no absorben a esa longitud de onda.

Berlin et al (1986) reportaron la extracción de betalaínas con metanol. Adicionalmente también es reportado por otros autores para diversas especies (Impellizzeri, et al, 1973; Alard et al, 1985; Strack, et al, 1988; Rink and Bohm, 1991). El método utilizado en el presente trabajo implica una extracción diferencial, es decir la primera parte extrae las betaxantinas y la segunda las betacianinas. En la primera parte del proceso, se obtuvieron buenos resultados, debido a que a simple vista el extracto mostró una coloración amarilla intensa, lo que significó de la presencia de betaxantinas, mientras que la segunda extracción (metanol 50%) disminuyó fuertemente la extracción, al obtenerse un extracto ligeramente rojo (betacianinas), después de este proceso, las células permanecieron fuertemente pigmentadas. Un método de extracción es considerado como efectivo cuando extrae cerca del 80% de los compuestos de interés en la primera extracción (Bernal Lugo, comn. pers.)

Otro de los métodos evaluados que implicó al metanol fue el reportado por Sakuta et al, (1987), los resultados obtenidos con éste se muestran en la Tabla 8. La cantidad de extracto obtenida fue de 0.124 mg/ml, inferior al extraído con el método de inactivación enzimática (0.58 mg/ml, en Tabla 7) e inclusive inferior a los reportados por otros autores (Ontiveros y Rodríguez, 1995). En éste las células se mantuvieron fuertemente pigmentadas.

Ante esta situación se realizaron adecuaciones a la metodología tratando de mejorar la extracción, modificando: tiempo de agitación, volumen de metanol al 80% y la adición de sonicación celular.

Con respecto al mayor tiempo de agitación y al mayor volumen de metanol, en todos los casos los resultados fueron similares a los ya obtenidos

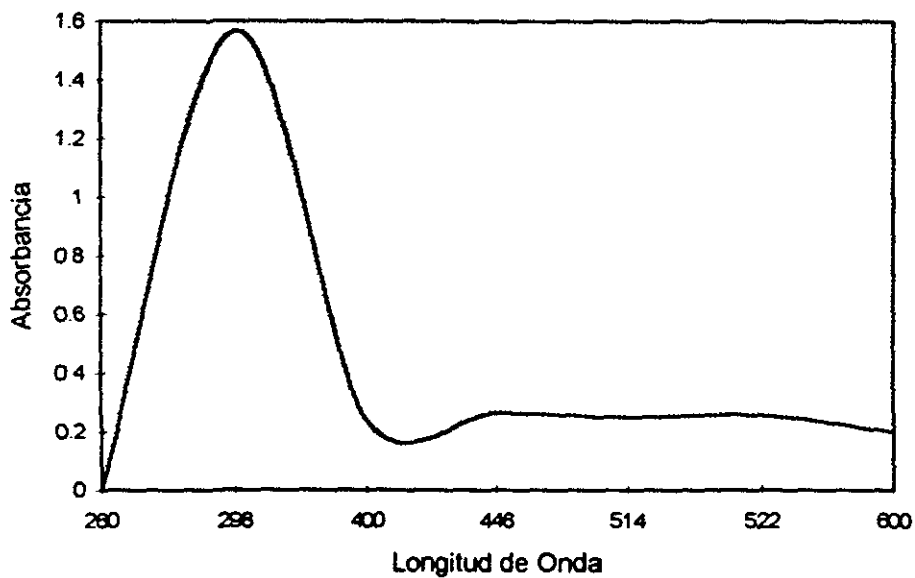


Figura 6.- Espectro de absorción UV-VIS para el extracto obtenido de células en suspensión (MS + 0.1 mg de 2,4-D) de *M. huitzilopochtli* por el método de Inactivación enzimática.

anteriormente, a excepción del caso en donde el tiempo de agitación fue de 60 minutos, con una extracción de 0.72 mg/ml (Tabla 8, extracto 3), resultado superior al obtenido mediante inactivación enzimática, pero inferior a los reportados por otros autores (Ontiveros y Rodríguez, 1995).

En diversos procesos una alternativa viable para favorecer la extracción es la utilización de rompimiento celular por medio de un sonicador y/o un homogenizador (Alard et al, 1985; Strack et al 1988). La sonicación de material celular de *M. huitzilopochtli*, contrario a lo que se esperaba, lo único que realizó fue una separación de los agregados celulares más que un rompimiento de células. No obstante, a este material se le realizó posteriormente una extracción con metanol al 80%, obteniendo resultados similares a los obtenidos con otros métodos (Tabla 8, extracto 2), específicamente una cantidad de 0.43 mg/ml. Estas modificaciones, no proporcionaron los resultados esperados ya que no se logró extraer un porcentaje representativo de los pigmentos presentes al interior de las células de *M. huitzilopochtli*.

Tabla 8.- Concentración de betaxantinas (480 nm), betacianinas (540 nm) y betalaina total en los extractos obtenidos con metanol al 80% y modificaciones* en células de *Mammillaria huitzilopochtli*.

Extracto*	Betaxantina mg/ml	Betacianina mg/ml	Betalaina Total mg/ml
1	0.073	0.051	0.124
2	0.19	0.24	0.43
3	0.32	0.40	0.72

* 1: Extracto obtenido de acuerdo al método de Sakuta et al (1987).

2: Extracto obtenido por sonicación y extraído por el método de Sakuta et al (1987).

3: Extracto obtenido por el método de Sakuta et al (1987) modificado (60 minutos de agitación y doble volumen de metanol al 80%).

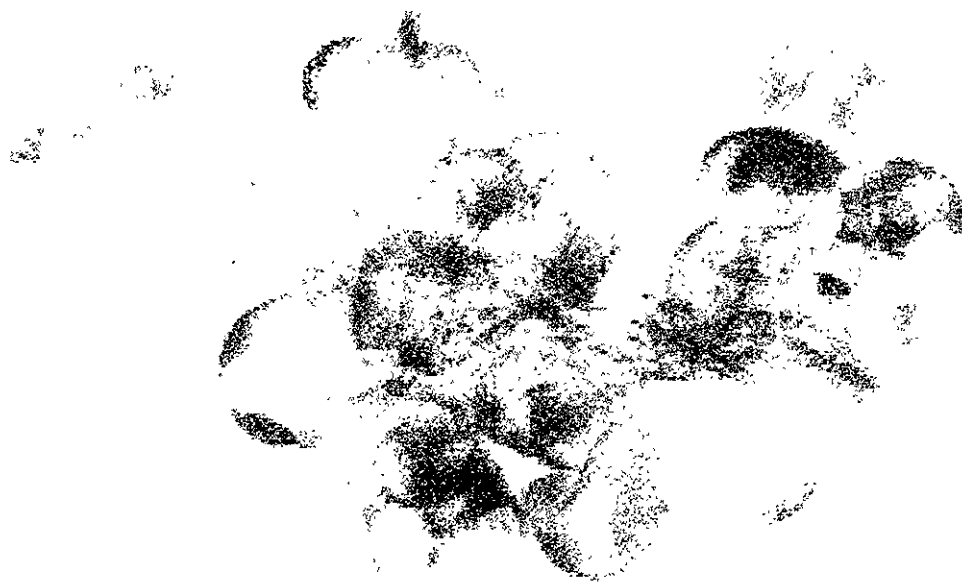
De los resultados observados en la Tabla 8, se concluye que el mejor de los métodos fue el de Sakuta et al, (1987), modificando tiempo de agitación a 60 minutos e incrementando el volumen de metanol para la extracción a 100 ml que representa el doble del propuesto originalmente (50 ml).

La dificultad para extraer los pigmentos inducidos en *M. huitzilopochtli* pudiera deberse al hecho de que en cactáceas, la pared celular es relativamente dura y adicionalmente la membrana celular es una barrera formidable para el movimiento de moléculas especialmente aquellas que están cargadas eléctricamente y son relativamente grandes (Nobel, 1994)

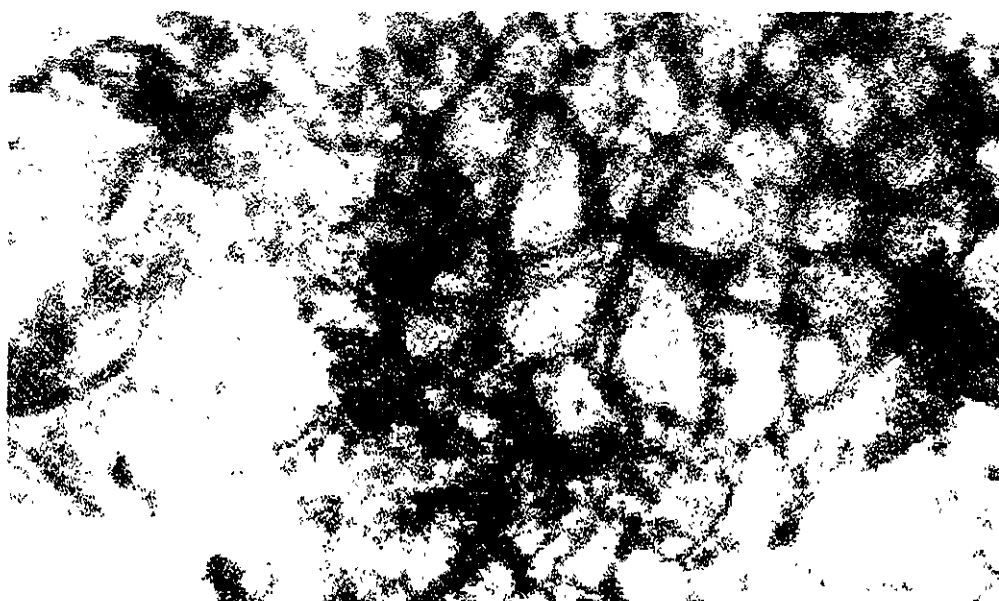
A diferencia del proceso de sonicación, la homogenización resultó una alternativa viable para el rompimiento celular. Se determinó que el tiempo de homogenización suficiente para romper un gramo de células vegetales, fue de 5-6 minutos (Figura 7). Esto se confirmó con observaciones periódicas al microscopio, determinándose que este tiempo es suficiente para la homogenización de alrededor del 95% de las células. En la figura 7 se presenta una microfotografía de células enteras y homogenizadas de *M. huitzilopochtli*.

Ante la dificultad en la extracción de los pigmentos producidos por *M. huitzilopochtli*, por los métodos reportados para betalaínas, se planteó la posibilidad de que pudiera tratarse de pigmentos de otras características químicas, esta búsqueda eliminó la posibilidad de pigmentos del tipo de las antocianinas, debido a que está bien documentado que no existen en cactáceas (Gibson y Nobel, 1990; Arriaga, 1994). La estrategia para solucionar el problema fue realizar un barrido de extracción con diferentes solventes orgánicos que incluyera un espectro amplio en polaridad de los distintos solventes, un proceso común en fitoquímica y que se fundamenta en el desconocimiento de los componentes químicos presentes en la planta.

La figura 8 muestra el espectro UV-VIS para el extracto de acetonitrilo, en éste se observa un ligero pico a una longitud de onda de 540 nm (0.13 de absorbancia), característico de las betacianinas y producto de la lectura de un extracto de color ligeramente rojo-anaranjado. El valor de absorbancia obtenido con este método es inferior al alcanzado con otros previamente evaluados



a)



b)

Figura 7.- Microfotografía de células a) enteras y b) homogenizadas pigmentadas de *Mammillaria huitzilopochtli*, cultivadas en medio MS adicionado con 0.1 mg/l de 2,4-D.

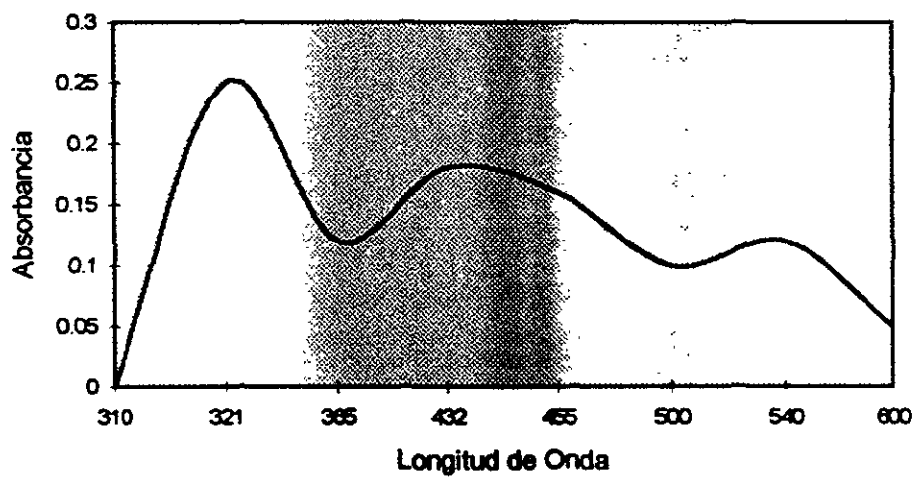


Figura 8.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de *Mammillaria huiwilpochtli* homogenizadas y extraídas con el solvente acetonitrilo.

(inactivación enzimática y extracción con metanol), aún cuando estas células fueron homogenizadas y extraídas en una mayor cantidad (10 g) y en un mayor tiempo de agitación (16 h).

En relación al benceno tampoco logró extraer los pigmento esperados (480 y 540 nm). Se obtuvo un extracto de color amarillo del cual se muestra en la figura 9 el espectro UV-VIS. En éste se observa un ligero pico a 480 nm (0.07 de absorbancia), cantidad muy inferior a cualquier otro resultado obtenido anteriormente; adicionalmente, se observan picos de mayor absorbancia que el de 480 nm, y que de acuerdo con Harborne (1973), pudieran deberse a la presencia de chalconas y auronas (430 y 460 nm) o bien a antraquinonas, que absorben a 365-390 nm y 420-460 nm, respectivamente.

Posteriormente se utilizó hexano y acetato de etilo. Estos solventes no mostraron ningún efecto de extracción que pudieran compararse con los evaluados anteriormente. Con el hexano se precipito el material pigmentado, mientras que con el acetato de etilo, el extracto que se obtuvo fue de un color ligeramente amarillo que se consideró no adecuado para ningún tipo de análisis. Lo único que se consideró de esta extracción fue que el residuo celular pareciera estar conformado únicamente de partículas pigmentadas, es decir cualquier otro material celular posiblemente fue disuelto.

En la figura 10 se muestra el espectro UV-VIS para el extracto, color rojo tenue, obtenido con acetato de etilo y una mezcla acetona:metanol (1:1), en éste se observa un ligero pico entre 530-550 nm (0.15-0.18 de absorbancia), resultado menor a los obtenidos previamente con otros métodos, observándose en el residuo celular una cantidad considerable de pigmentos.

Los resultados obtenidos en la extracción con proteasas se muestran en la figura 11. En este espectro UV-VIS, se observa un comportamiento similar al obtenido con acetato de etilo y una mezcla acetona:metanol (1:1) (530-550 nm), sin embargo las absorbancias se incrementaron aproximadamente al doble (0.38). No obstante el incremento en las absorbancias, las células se

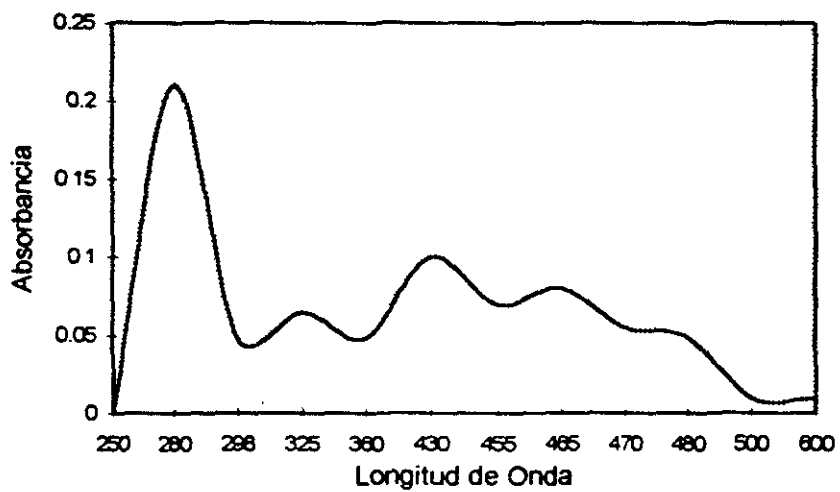


Figura 9.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* homogenizadas y extraídas con el solvente benceno.

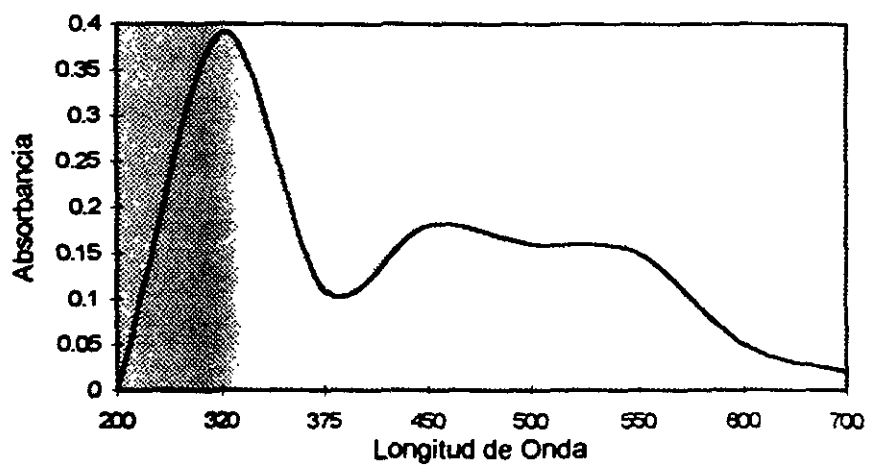


Figura 10.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* homogenizadas y extraídas con acetato de etilo y una mezcla acetona:metanol (1:1).

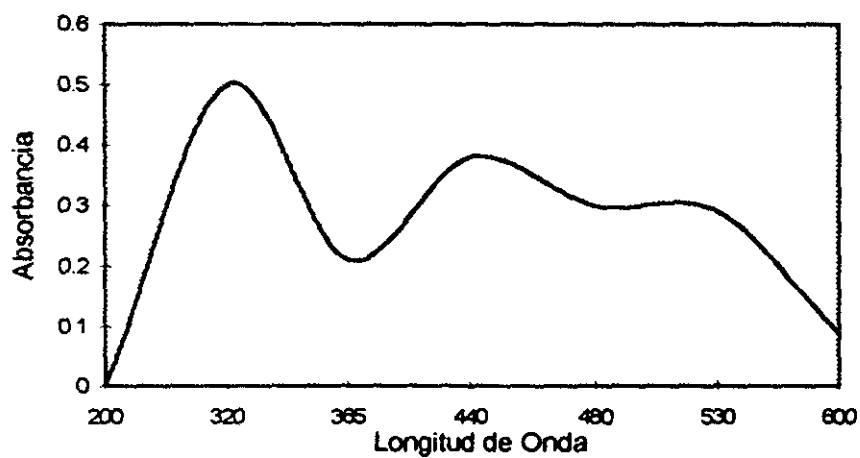


Figura 11.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* utilizando proteasas para la liberación del pigmento y extraídas con una mezcla de acetona:metanol (1:1).

mantuvieron fuertemente pigmentadas. Ante esta observación, se puede afirmar que estos pigmentos no están unidos a proteínas.

Una estrategia alternativa fue degradar pared celular utilizando para la extracción, por una parte, una mezcla de enzimas degradativas (celulasa, hemicelulasa y pectinasa) y por otra parte NaOH 4N. En la figura 12 se muestra el espectro UV-VIS para este extracto, en donde se observa un ligero pico sobre los 530-540 nm (0.14 de absorbancia), característico de betacianinas. Se obtuvo un extracto ligeramente anaranjado y no representativo de la cantidad total de pigmentos al interior de las células de *M. huitzilopochtli*.

En relación al efecto de NaOH 4N, los resultados observados indicaron que posiblemente hubo un efecto de pH, pues las células cambiaron en forma rápida (dos horas) de un color rojo a amarillo. Este, pigmento modificado no fue extraído en cantidades considerables. Se sabe que algunos pigmentos son inestables a los cambios de pH, entre éstos las betalainas que se mantienen en un rango de pH de 3-7.

Una última posibilidad fue aplicar un método utilizado para extraer taninos el cual implica liberar a los pigmentos del complejo lignina. Aún con la aplicación de éste, no se lograron buenos resultados, en este caso se obtuvo un extracto de un color amarillo intenso. La figura 13 muestra el espectro UV-VIS para el extracto obtenido con la solución de ácido ascórbico 10 mM en etanol, en donde se observa un pico entre los 430-460nm, que según Harborne (1973) pudieran deberse a chalconas y auronas que absorben a estas longitudes de onda, sin embargo en el espectro no se observan los picos para betalainas y que absorben a 480 y 540 nm.

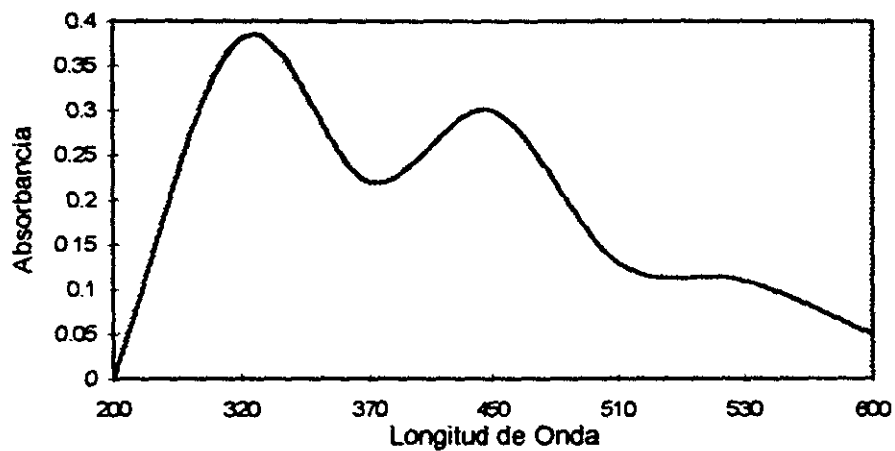


Figura 12.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* utilizando la mezcla de enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa para la liberación del pigmento y extraídas con acetona:metanol (1:1).

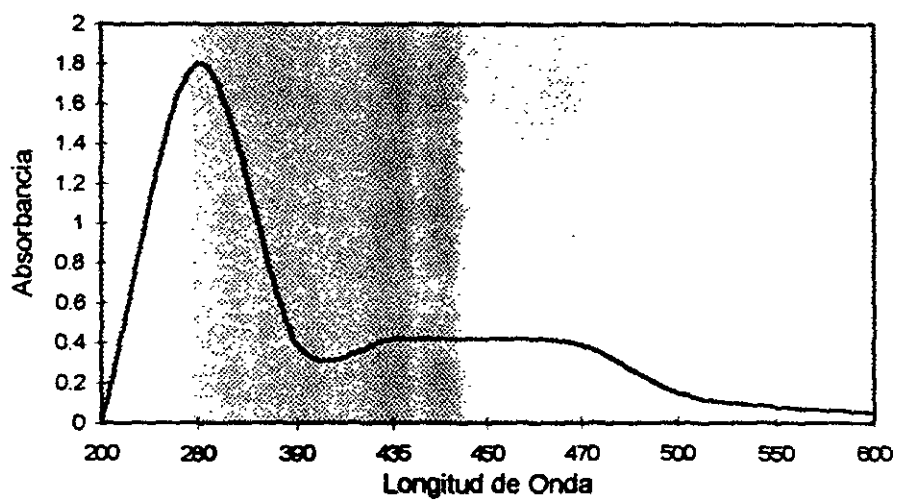


Figura 13.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido de células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* utilizando el método para liberación de lignina.

Cultivos en Suspensión para la Inducción de Fungicidas.

Para el establecimiento del cultivo en suspensión de *M. huitzilopochtli* se utilizó medio MS adicionado con 0.1 mg/l de 2,4-D. En estas condiciones de cultivo se garantizó la producción de biomasa para la realización de los distintos experimentos llevados a cabo con elicitores. En la figura 14 se muestra la curva de crecimiento de *M. huitzilopochtli* en el medio MS adicionado con 0.1 mg/l de 2,4-D.

Inducción de Fungicidas.

Existen diversos reportes (Paré, et al, 1992; Bonness, et al, 1993; Liu et al, 1993; Toivonen, 1993; Marinelli et al, 1994; Saad, 1996) que indican que materiales tales como, hongo fresco homogenizado, hongo seco homogenizado, quitina y quitosan tienen un efecto sobre la producción de fitoalexinas en plantas. Se probó el efecto de estos tipos de elicitores sobre la inducción de fitoalexinas en cultivos en suspensión de *M. huitzilopochtli*, en todos los casos la respuesta (aparición del color por síntesis de nuevos productos en medio y células en suspensión) fue siempre del 100%. La aparición de un color rojo en las células y amarillo en el medio de cultivo se observó entre las 24-48 h después de haber sido inoculado con los elicitores. El color amarillo del medio se mantuvo estable indefinidamente.

Sin embargo, en base a una observación visual, se apreció la aparición de color en mayor intensidad y rapidez en el material inoculado con hongo homogenizado, que en los demás, esto es debido a que posiblemente en el hongo fresco existen varios componentes de la pared celular que están interactuando en forma conjunta, mientras que en el hongo seco, es posible que algunas enzimas sean inactivadas o bien los compuestos inductores sean afectados por la exposición al calor durante el secado. El caso de la quitina y el quitosan ha sido reportado previamente por ser material que induce la presencia de fitoalexinas (Paré, et al, 1992; Bonness, et al, 1993; Liu, et al, 1993), sin embargo en esta ocasión los resultados no fueron mejores que los

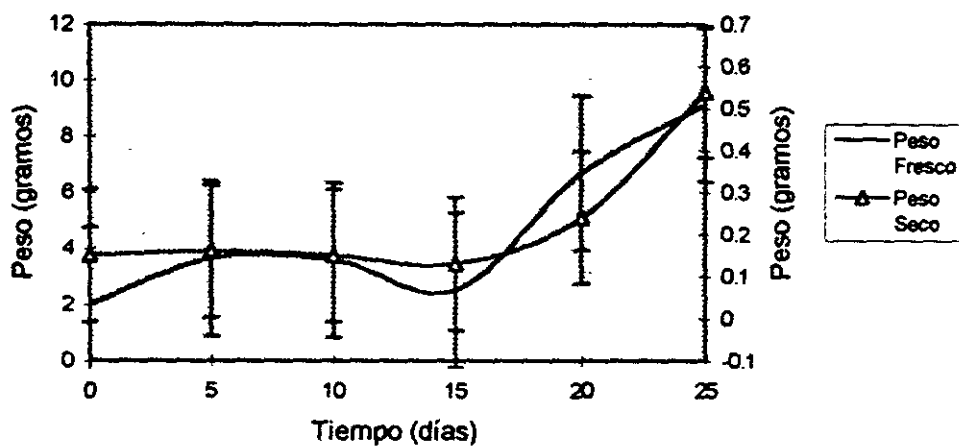


Figura 14.- Curva de crecimiento de cultivos en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* en el tratamiento 9 (medio MS adicionado con 0.1 mg de 2,4-D). Se determinó peso fresco y seco expresado en gramos, el resultado es producto de 3 repeticiones. (Peso fresco SD \pm 2.7505; Peso seco SD \pm 0.1574).

obtenidos con el hongo fresco homogenizado. Bajo esta observación y considerando la disponibilidad de material elicitor, se decidió utilizar hongo fresco homogenizado de las especies *Fusarium sp.* y *moniliforme* para la inducción de los metabolitos secundarios, además estos resultados concuerdan con los observados por Saad (1996). En la figura 15 se observa cultivos en suspensión de *M. huitzilopochtli* inducidos con homogenados fúngicos.

En todos los casos se observa una respuesta muy común a estos tipos de procesos inducidos por elicitores (Chappell y Nable, 1987; Ren y West, 1992), debido a que induce la formación de las sustancias químicas y favorece su liberación al medio de cultivo como un proceso de defensa, en este caso la sustancia es de color amarillo, mientras que las células se tornan de un color rojo. El fenómeno de que las células segregen los metabolitos al medio de cultivo es importante si consideramos las posibles implicaciones biotecnológicas que pudiera tener la adición de hongo fresco homogenizado, sobre todo si en este tipo de procesos se busca disminuir costos, aumentar la producción y lograr su escalamiento industrial. Por otra parte, a diferencia de lo observado en los cultivos sin elicitores, la producción de biomasa es detenida por completo cuando los elicitores son adicionados al cultivo en suspensión, es decir las células concentran todo su mecanismo de defensa a detener al patógeno y producen sustancias de defensa, disminuyendo su crecimiento, estos resultados concuerdan con los observados por Saad (1996) en la producción de metabolitos secundarios por efecto de elicitores en *Piqueria trinervia*.



Figura 15.- Cultivos en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* en medio de cultivo MS con 0.1 mg/l de 2,4-D y 100 mg de homogenado fúngico.

Extracción de Fungicidas Elicitados.

Como se describe en el apartado de materiales y métodos la extracción de los compuestos inducidos con elicitores se realizó tanto en: a) el medio de cultivo como en; b) las células filtradas del medio (Figura 16).

a) El líquido obtenido del medio se extrajo con acetato de etilo, necesitando de 2-3 repeticiones. En la primera de estas repeticiones se obtiene aproximadamente un 80-90% de las sustancias presentes que le dan el color. Adicionalmente, se probó también cloroformo, observándose resultados similares al del acetato de etilo, optándose por este último para las subsecuentes extracciones.

b) En relación con el pigmento de las células, éste se extrajo con una mezcla de diclorometano:metanol (9:1), después de haber probado diferentes proporciones de estos dos solventes, la cantidad extraída es alta, sin embargo las células quedan impregnadas de un color rojo que no se logró extraer.

En las figuras 17 y 18 se muestran los espectros UV-Visible de estos dos extractos. En los dos casos y en todas las ocasiones se obtuvieron picos similares que varían entre los 443-446 nanómetros de longitud de onda, siendo ésta la primera evidencia de que los compuestos del medio y del interior de las células son similares.

En las figuras 19 y 20 se observa la cinética de producción de fitoalexinas tanto de las liberadas al medio de cultivo, así como las presentes en las células de *M. huitzilopochtli*, respectivamente. En la figura 19 se observa que la liberación máxima de compuestos de defensa al medio se presentó a los cuatro días de inoculado, (96 horas, 0.692 de absorbancia a 444 nm). Mientras que en la figura 20, se observa que la mayor producción de fitoalexinas en las células elicidadas, se alcanzó igualmente a los cuatro días después de la inoculación, (96 horas, 2.241 de absorbancia a 444 nm). Nuestros resultados concuerdan con aquellos reportados por Chappell y Nable, 1987; Ren y West, 1992; Afek, 1995; Bestwick, et al, 1995 y Doares, et al 1995, quienes mencionan que la mayor actividad de defensa en células vegetales de

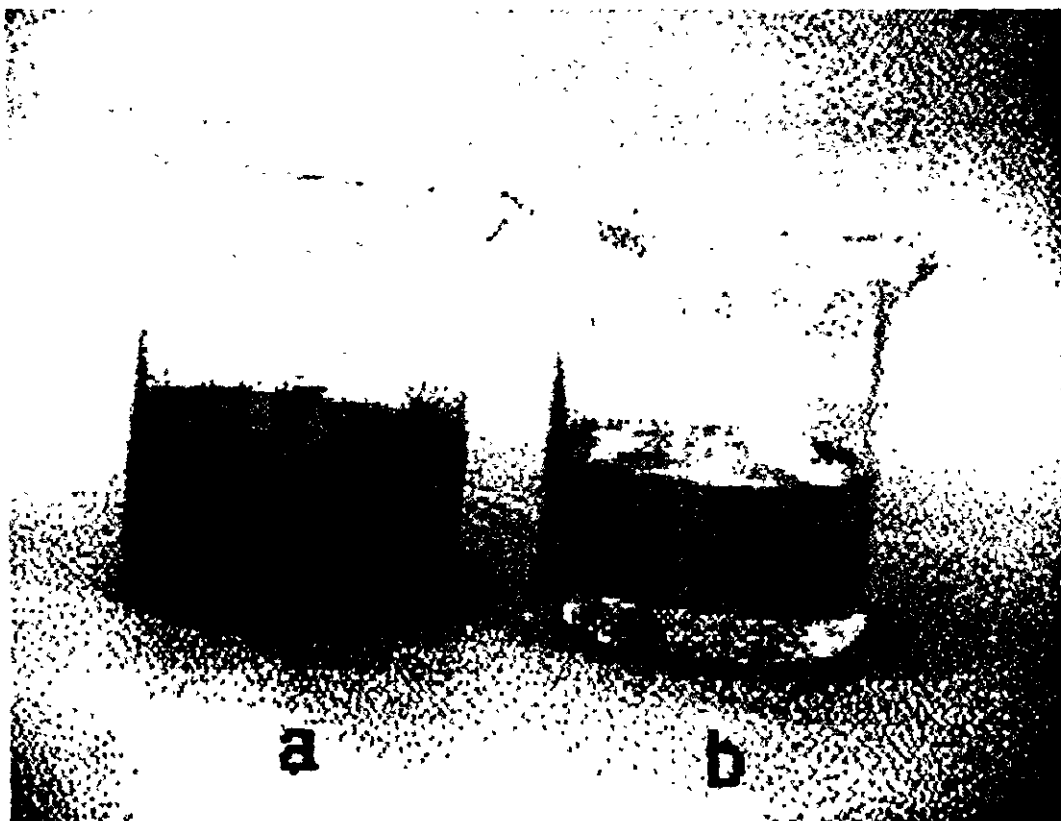


Figura 16.- a) sin filtrar (rojo) y; b) Medio filtrado (amarillo) de cultivos en suspensión (MS + 0.1 mg/l de 2,4-D) de *M. hutzilopochtli* elicitados con homogenados fúngicos.

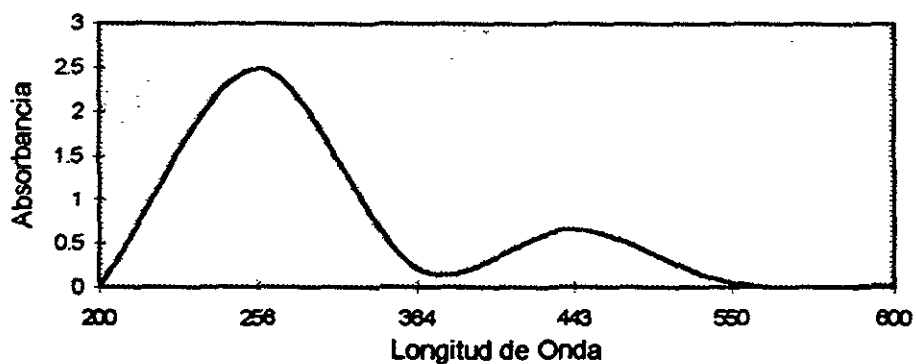


Figura 17.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido del medio de cultivo en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* (MS + 0.1 mg/l 2,4-D) inducido con elicitores biológicos y extraído con acetato de etilo.

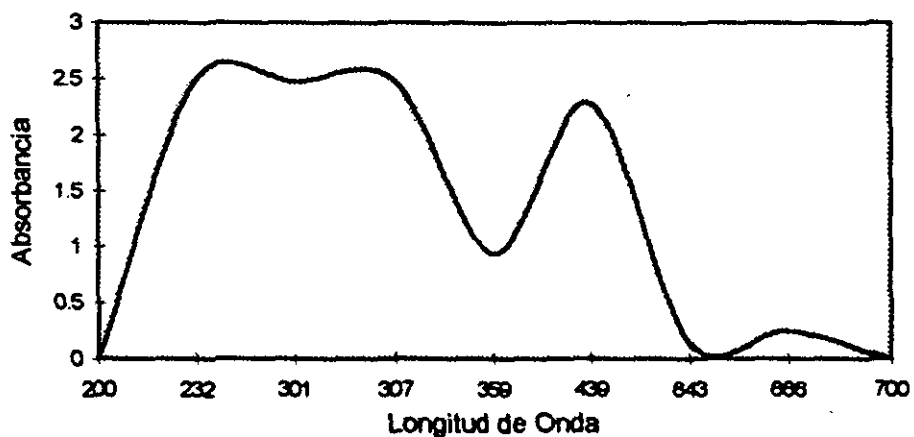


Figura 18.- Espectro UV-VIS del extracto obtenido de las células en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* (MS + 0.1 mg/l 2,4-D) inducido con elicitores biológicos y extraído con diclorometano:metanol (9:1).

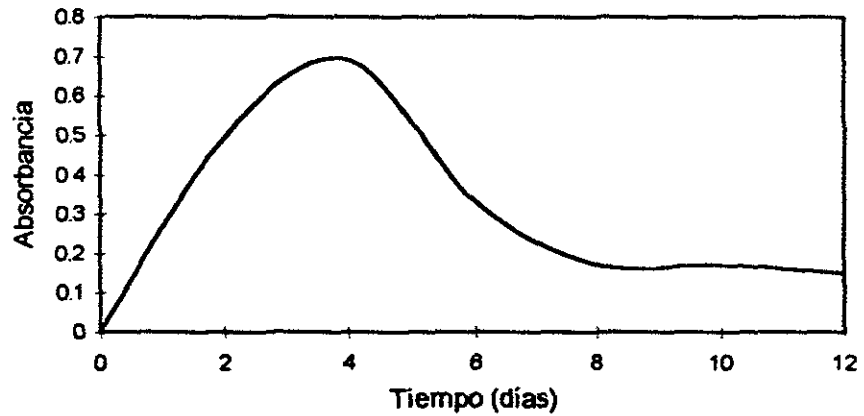


Figura 19.- Cinética de producción de fitoalexinas, extraídas del medio de cultivo en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* (MS + 0.1 mg/l de 2,4-D) inducidas con elicitores biológicos y leída a una λ de 444 nm, los resultados son el promedio de 3 repeticiones.

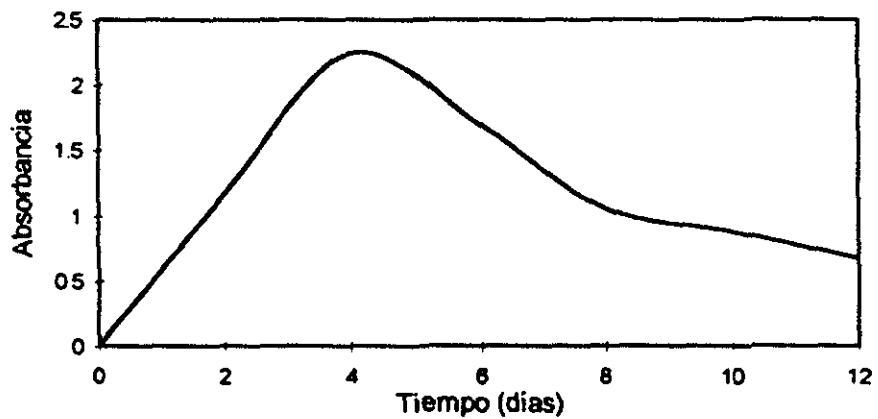


Figura 20.- Cinética de producción de fitoalexinas, extraídas de las células filtradas del cultivo en suspensión de *Mammillaria huitzilopochtli* (MS + 0.1 mg/l de 2,4-D) inducidas con elicitores biológicos y leída a una λ de 444 nm, los resultados son el promedio de 3 repeticiones.

diferentes especies se presenta en las primeras horas posteriores a la inoculación, efecto similar se observó en *M. huitzilopochtli*.

Separación por Cromatografía de Fungicidas.

Los resultados de las placas cualitativas sobre laminas de celulosa microcristalina nos indicaron que en el extracto del medio de cultivo existen 4 compuestos claramente separados, destacando dos de ellos, por la intensidad de la mancha (amarilla), en mayor proporción. Por otra parte, las placas realizadas al extracto de las células nos indicaron la presencia de 5 compuestos claramente definidos. De éstos 4 están presentes (por características y desplazamientos de las manchas) en el extracto del medio de cultivo, siendo ésta otra evidencia de que posiblemente sean los mismos compuestos.

En relación a la cromatografía en columnas de celulosa para la purificación de los compuestos, se observó una buena resolución, sin embargo las cantidades obtenidas de los compuestos no fueron lo suficientemente buenas como para lograr su identificación por los distintos métodos conocidos como resonancia magnética nuclear e infrarrojo, entre otros.

Pruebas de Actividad Biológica de Fungicidas Inducidos.

De acuerdo con Paré y Mabry (1993), la aparición del color en las células y medio de cultivo elicitados supone una respuesta del tipo fitoalexinas. La elicitación del cultivo en suspensión de *M. huitzilopochtli*, presentó este comportamiento. Las pruebas de actividad biológica se llevaron a cabo utilizando el extracto total obtenido de las células y medio de cultivo.

Los resultados del efecto del extracto sobre los hongos fitopatógenos, se muestran en las figuras 21, 22 y 23. En éstas, se observa que en los 8 hongos se presenta algún grado de inhibición utilizando una concentración del extracto de 100 ppm, comparados contra un control sin extracto. Sin embargo, el hongo

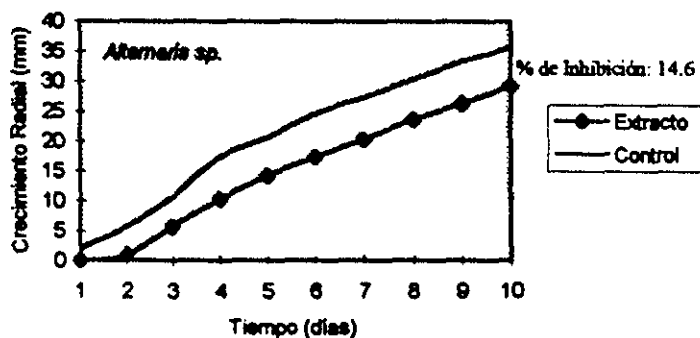
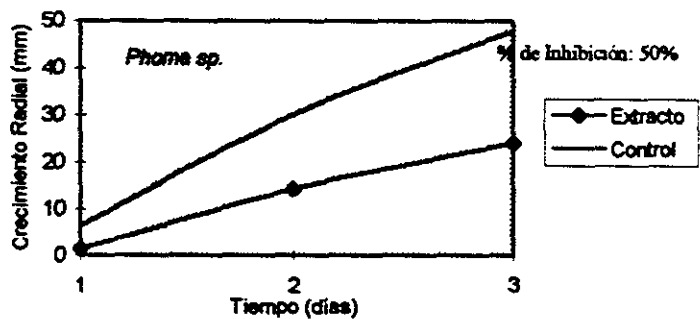
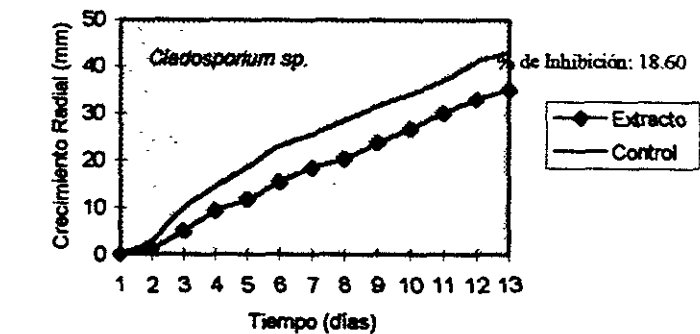


Figura 21.- Curvas de Crecimiento de los hongos *Cladosporium sp.*, *Phoma sp.* y *Alternaria sp.* en medio agar papa-dextrosa adicionado con 100 ppm de extracto total comparado contra sus respectivos controles.

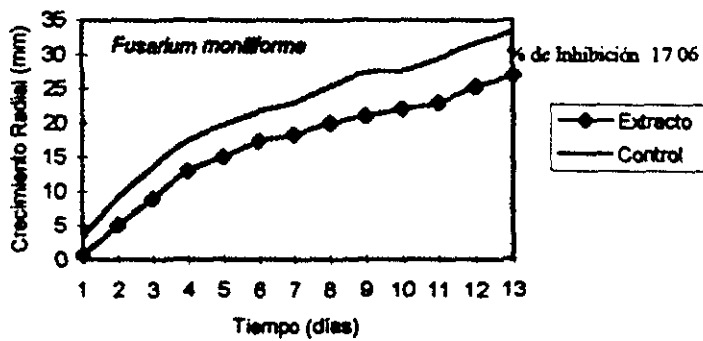
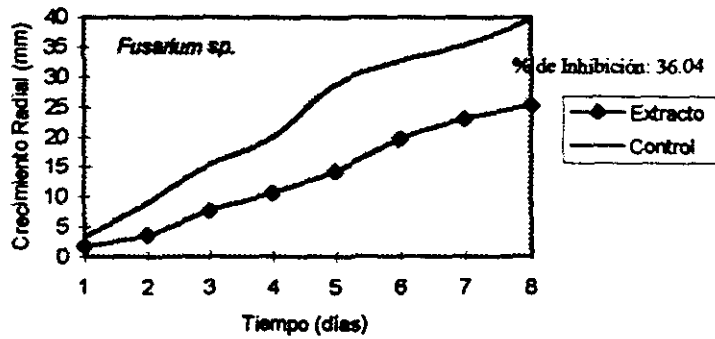
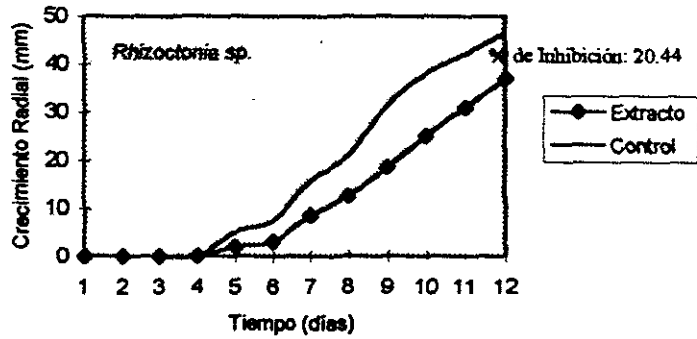


Figura 22.- Curvas de Crecimiento de los hongos *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.* y *Fusarium moniliforme* en medio agar papa-dextrosa adicionado con 100 ppm de extracto total, comparado contra sus respectivos controles.

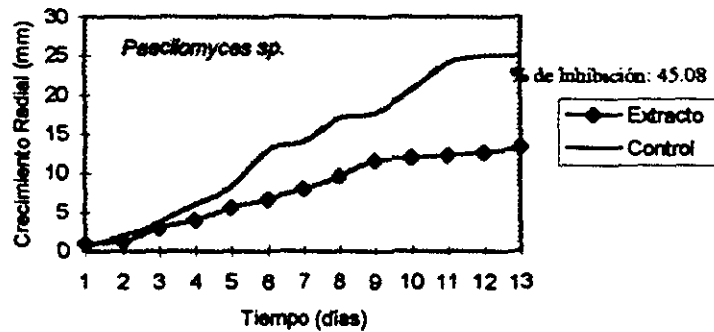
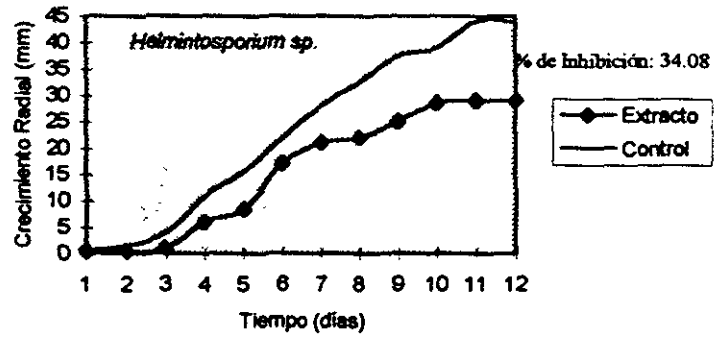


Figura 23.- Curvas de Crecimiento de los hongos *Helmintosporium sp.* y *Phaecilomyces sp.* en medio agar papa-dextrosa adicionado con 100 ppm de extracto total comparado contra sus respectivos controles.

más afectado por el extracto fue el *Phoma sp.* (Nº 2) con un porcentaje de inhibición del 50%, seguido del hongo *Phaecilomyces sp.* (Nº 9) con un 45.11% de inhibición. El menor efecto se presentó sobre el hongo *Alternaria sp.* (Nº 3) con un 14.61% de inhibición. No obstante las diferencias en los porcentajes de inhibición, el análisis estadístico (ver Tabla 9), demuestra que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los hongos: *Cladosporium sp.*, *Phoma sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium sp.*, *Helminthosporium sp.* y *Phaecilomyces sp.* a un nivel de significancia de 0.05.

Morris et al (1995), reportó que el hongo *Rhizoctonia solanis* es inhibido completamente a una concentración de 138 ppm por compuestos elicitados en *Verticillium biguttatum*, en el presente trabajo se observó que a una concentración de 100 ppm, el hongo de este mismo género es inhibido en un 46.06 % con respecto al control sin extracto. En este sentido, en cactáceas los únicos antecedentes conocidos de fitoalexinas inducidas, son los reportados para *Cephalocereus senilis*, y que fueron evaluadas contra bacterias gram negativo, además de *Erwinia cacticida*, una bacteria pectolítica que degrada la pared celular en cactus (Paré et al, 1991). Ante estas consideraciones los resultados aquí obtenidos presentan una perspectiva de estudio interesante.

Tabla 9.- Pruebas de Separación de Medias de Tukey para Evaluar el Efecto del Extracto Total Sobre el Crecimiento Radial de 8 Hongos Fitopatógenos, en Medio Agar Papa-Dextrosa Adicionado con 100 ppm.

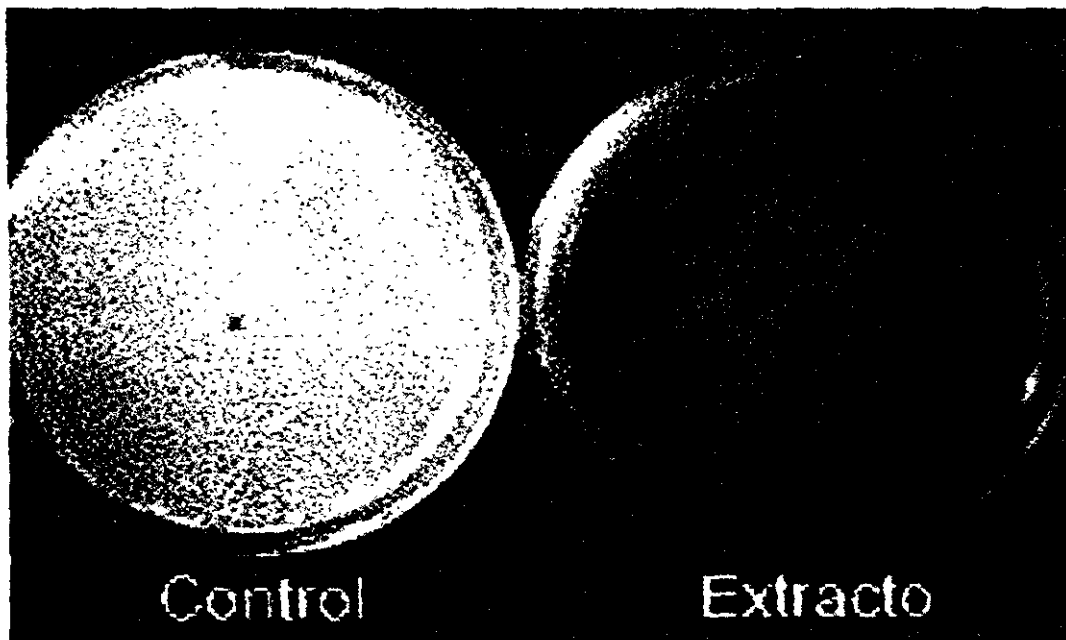
Nº	Hongo	Promedio del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial ^a
1	<i>Cladosporium sp.</i>	18.60 ^{ab}
2	<i>Phoma sp.</i>	50.00 ^b
3	<i>Alternaria sp.</i>	14.60 ^a
5	<i>Rhizoctonia sp.</i>	46.06 ^b
6	<i>Fusarium sp.</i>	36.04 ^b
7	<i>Fusarium moniliforme</i>	17.06 ^a
8	<i>Helminthosporium sp.</i>	34.08 ^{ab}
9	<i>Phaecilomyces sp.</i>	45.08 ^b

^a La media comprende a 3 repeticiones. ab: Letras distintas indican diferencias significantes al α 0.05.

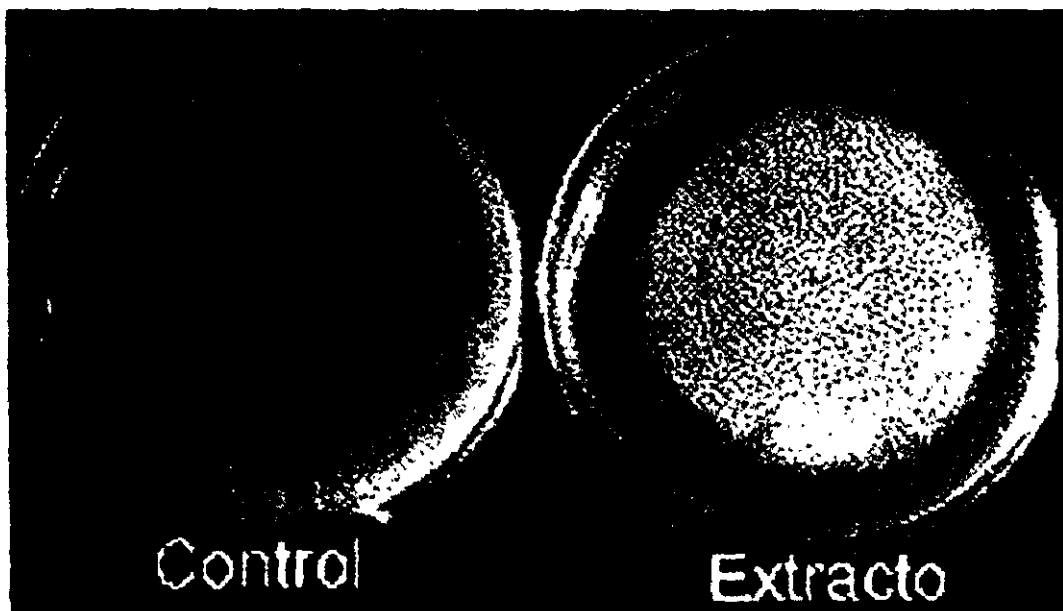
En la figura 24, se observan aspectos de las placas petri tanto del hongo control como de los hongos *Phoma sp* y *Rhizoctonia sp.*, mientras que en la figura 25, se presentan los hongos *Fusarium sp.* y *F. moniliforme*, evaluados (crecimiento radial) en agar adicionado con el extracto total obtenido de los cultivos en suspensión elicitados con homogenados fúngicos, en éstas se observa el efecto inhibitorio causado por el extracto adicionado al medio con respecto al control.

A la luz de estos resultados, se decidió realizar una segunda prueba de actividad biológica con el hongo *Phoma sp.*, debido a que fue en este en donde se observó un mayor porcentaje de inhibición, aún cuando no se observó diferencias estadísticamente significativas en relación a otros hongos.

En la segunda prueba biológica, la intención de ésta fue de evaluar a que concentraciones el hongo *Phoma sp.*, con mejores resultados en la primera evaluación del extracto (50 % de inhibición a 100 ppm), era inhibido totalmente, toda vez de que en la primera prueba los hongos únicamente sufrieron un efecto fungiestático, pues una vez que superaban el efecto del extracto retomaban su crecimiento normal. En este experimento el espectro de concentraciones se amplió considerablemente siendo el mínimo de 50 ppm y el máximo de 450 ppm. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 10 y en la figura 26, mostrando porcentaje de inhibición y crecimiento radial contra en las concentraciones de extracto utilizadas comparadas contra un control.

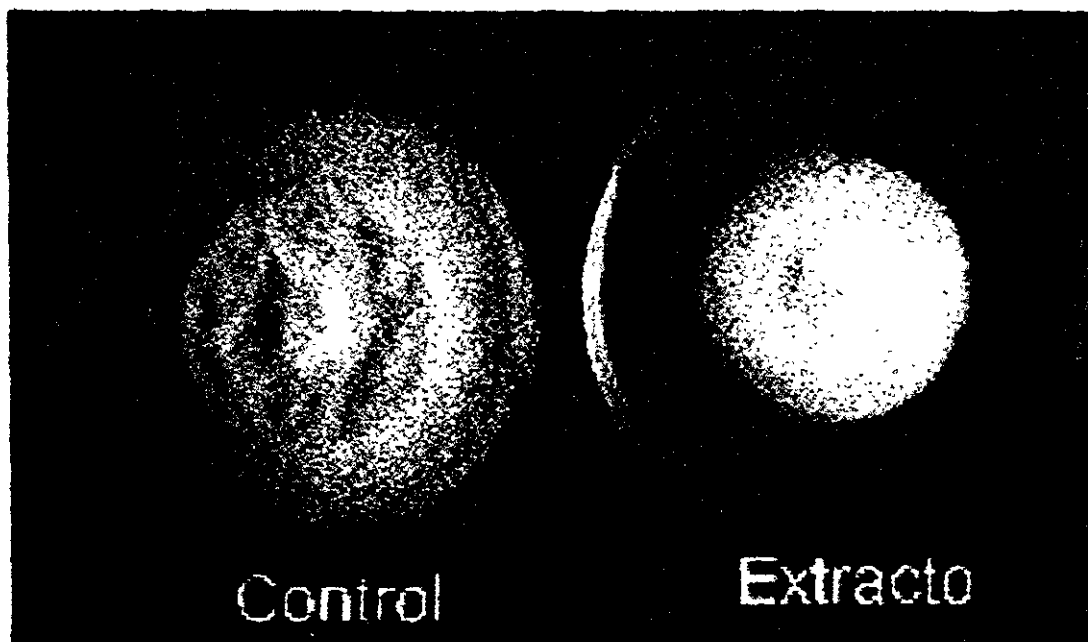


a)

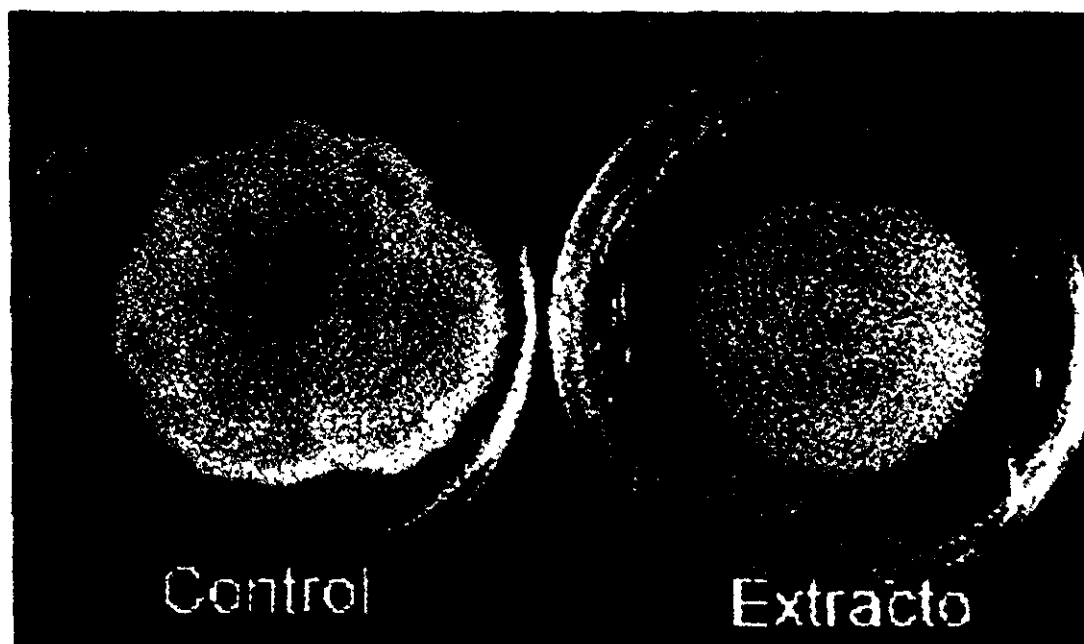


b)

Figura 24.- Efecto de inhibición del extracto total (100 ppm) obtenido de cultivos en suspensión de *M. huitzilopochtli* sobre los hongos: a) *Phoma sp.* y b) *Rhizoctonia sp.*



a)



b)

Figura 25.- Efecto de inhibición del extracto total (100 ppm) obtenido de cultivos en suspensión de *M. huitzilopochtli* sobre los hongos: a) *Fusarium* sp. y b) *Fusarium moniliforme*.

Tabla 10.- Porcentaje de Inhibición de Crecimiento del Hongo *Phoma* sp. por Efecto de Diferentes Concentraciones de Extracto Total, Comparados Contra un Control sin Extracto (lectura a los 3 días de cultivo).

Concentración del Extracto (ppm)	Hongo Control. Crecimiento Radial (mm)	Hongo con Extracto Crecimiento Radial (mm)	% de Inhibición
50	45	30.	32.96
75	45	25.50	43.01
100	45	23.50	47.48
125	45	27.25	39.10
150	45	19.75	55.86
200	45	30.17	32.95
250	45	19.25	57.22
300	45	13.50	69.83
350	45	7.	84.44
400	45	0	100
450	45	0	100

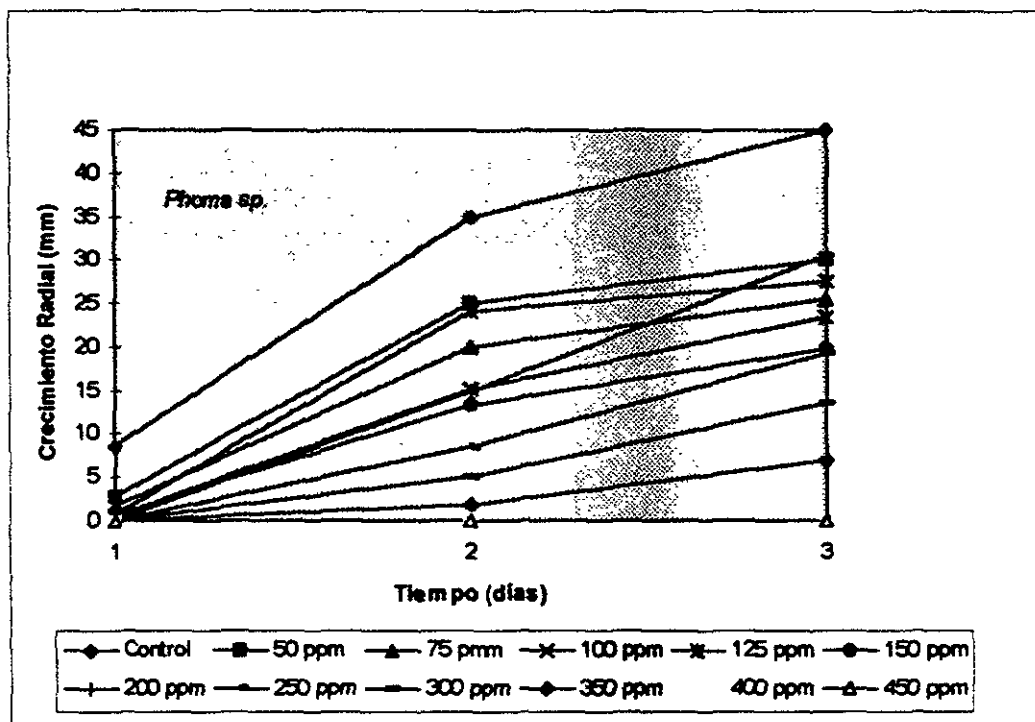


Figura 26.- Evaluación de la inhibición del hongo *Phoma sp.* por efecto de distintas concentraciones del extracto total obtenido de cultivos en suspensión (MS + 0.1 2,4-D) de *Mammillaria huiwilopochtli* elicitado con homogenados fúngicos (100 mg).

En la figura 26 se observa que conforme se incrementa la concentración del extracto aumenta el porcentaje de inhibición, fue hasta las concentraciones de 400 y 450 ppm donde se alcanzó inhibir por completo el crecimiento del hongo. El análisis estadístico realizado mostró que los tratamientos con 400 y 450 ppm de extracto total son estadísticamente diferentes de los demás, a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 11).

A la fecha, no existen antecedentes de fitoalexinas de cactáceas que hayan sido probadas contra hongos, los únicos reportes conocidos han sido enfocados hacia bacterias degradativas de pared celular en cactus como *Erwinia cacticida* y algunas otras bacterias gram positivas, creemos que este es un buen inicio para proseguir con este tipos de estudios.

De los hongos evaluados aquí, es conocida su patogenicidad en algunas especies comerciales, por ejemplo, se sabe que *Fusarium sp.* es causante de diversos daños en plantas tales *Lilium sp.* y *Ocimum basilicum* que pueden llevarlas a la muerte (Straathof, et al, 1993; Davis y Marshall, 1993). Es importante establecer a que concentración estas fitoalexinas son capaces de eliminar al hongo y no solo causar su inhibición, para de esta manera encontrar en un futuro una aplicación real de estos compuestos.

En la actualidad, los insecticidas, bactericidas y fungicidas de mayor auge y relevancia están siendo los de origen biológico, por los menores efectos adversos que presentan sobre el medio ambiente, en este sentido es importante, poder ampliar los resultados aquí obtenidos, pues serán de vital importancia para evaluar completamente la posibilidad de utilizar los compuestos inducidos en los cultivos en suspensión de células de *M. huitzilopochtli* contra hongos fitopatógenos en un futuro cercano.

Tabla 11.- Pruebas de Separación de Medias de Tukey (Nivel de Significancia de 0.05), para Evaluar el Efecto de Diferentes Concentraciones del Extracto Total sobre el Crecimiento Radial del Hongo *Phoma sp.* en Medio Agar Papa-Dextrosa.

Concentración	Promedio^x
50	32.95 ^a
75	42.96 ^{ab}
100	47.24 ^{bc}
125	38.90 ^{ab}
150	55.83 ^{bc}
200	30.17 ^a
250	56.99 ^{bc}
300	69.83 ^{bc}
350	84.35 ^{bc}
400	100 ^d
450	100 ^d

^x Promedio del porcentaje de inhibición del crecimiento radial en mm de 4 repeticiones.

ab: Son homogéneos tanto con a como con bc, pero diferentes de d.

a: Son homogéneos de ab, pero diferentes con bc y d.

bc: son homogéneos con ab, pero diferentes de d.

d: Son diferentes de a, ab y bc.

CONCLUSIONES

- 1) Se logró inducir la producción de pigmentos rojos en cultivo en suspensión en medio líquido MS adicionado con 0.1 mg/l de la auxina 2,4-D.
- 2) Las distintas metodologías utilizadas para la extracción de pigmentos inducidos con reguladores de crecimiento no lograron extraer una cantidad representativa de la existente al interior de las células de *M. huitzilopochtli*.
- 3) Los distintos tipos de elicitores utilizados en las pruebas de elicitación de cultivos en suspensión de *M. huitzilopochtli* inducen la producción de compuestos de defensa.
- 4) En la inducción de los fungicidas utilizados en las pruebas de actividad biológica, se utilizó 100 mg/matraz de homogenado fúngico fresco de *Fusarium sp* y *F. moniliforme*.
- 5) Las condiciones adecuadas para la extracción de los compuestos inducidos con elicitores son: a) acetato de etilo para la extracción de los compuestos liberados al medio de cultivo y b) diclorometano:metanol (9:1) para los compuestos del interior de las células de *M. huitzilopochtli*.
- 6) La producción máxima de fungicidas en el sistema elicitado, tanto de los liberados al medio de cultivo como las producidas al interior de las células, se alcanza a los cuatro días de haberse elicitado.
- 7) Se estableció la metodología para la purificación de los compuestos inducidos con elicitores, encontrándose 4 compuestos distintos en el extracto del medio de cultivo, mientras que en el extracto de las células se encontraron 5, cuatro iguales a los del medio de cultivo.
- 8) Las sustancias sintetizadas de *novo* tienen efecto fungiestático a 100 ppm en los 8 hongos fitopatógenos evaluados, de éstos el hongo *Phoma sp.*, sufre una mayor inhibición con un 50%.
- 9) Los compuestos elicitados en cultivo en suspensión de *M. huitzilopochtli* tienen un efecto fungicida en el hongo *Phoma sp.* al ser inhibido en un 100 % a 400 ppm.

BIBLIOGRAFIA

- Afek, U., Carmeli, S. and Aharoni, N. (1995). Columbianetin, a phytoalexin associated with celery resistance to pathogens during storage. *Phytochemistry*, 39(6): 1347-1350.
- Alard, D., Wray, V., Grotjahn, L., Reznik, H. and Strack, D. (1985). Neobetanin: isolation and identification from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, 24:2383-2385.
- Albersheim, P. and Anderson-Prouty, A. (1975). Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 26: 31-52.
- Albersheim, P. and Valent, B. (1974). Host-pathogen interactions. *Plant Physiol*, 53: 684-687.
- Allen, F. and Friend, J. (1983). Resistance of potato tubers to infection by *Phytophthora infestans*: a structural study of haustorial encasement. *Physiological Plant Pathology*, 22: 285-292.
- Arriaga, D.E. (1994). Aplicaciones biotecnológicas en *Mammillaria huitzilopochtli* D.R. Hunt, especie amenazada de extinción. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Ayres P. (1990). Growth responses induced by pathogens and other stresses. En: *Tip Growth in Plant and Fungal Cells* (Heath, I., ed.). University of York, Toronto, Canada. pp 227-247.
- Barz, W. and Mackenbrock, U. (1994). Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpan in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 199-211.

- Bell, E. (1981). The physiological role(s) of secondary (natural) products. En: The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise, Vol 7.(Stumpf, P y Conn, E. eds.). Academic Press, Inc. USA. pp 1-19.
- Berlin, J., Sieg, S. Strack, D. Bokern, M. and Harms, H. 1986. Production of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. Plant Cell Tissue Organ Culture 5:163-174.
- Bestwick, L., Bennett, M., Mansfield, J. and Rossiter, J. (1995). Accumulation of the phytoalexin lettuceenin a and changes in 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in lettuce seedlings with the red spot disorder. Phytochemistry, 39(4): 775-779.
- Bohlmann, J. and Eilert, U. (1994). Elicitor induced secondary metabolism in *Ruta graveolens* l. role of chorismate utilizing enzymes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38: 189-198.
- Böhm, H. and Rink, E. (1988). Betalains. In: Vasil, I.K., ed. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol. 5. New York: Academic Press. pp 449-463.
- Böhm, H.; Böhm, L.; Rink, E. (1991) Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 26:75-82.
- Bonness, M.S., Paré, P.W. and Mabry, T. (1993). Novel callus and suspension cultures of the "old man" cactus (*Cephalocereus senilis*). Cactus and Succulent Journal (U.S.) 65:144-147.
- Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México, vol. II, Capítulo XVI Subtribu III Cactinae. Universidad Nacional Autónoma de México. Primera Edición
- Bruce, R. y West, Ch. (1982). Elicitation of casbene synthetase activity in castor bean. Plant Physiol, 69: 1181-1188.
- Bruh, J.G. 1971. Econ. Bot. 25(3):320-329.

- Buitelaar, R. M. and Tramper, J. (1992). Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *J. Biotechnology*, 23: 11-141.
- Cartwright, B., Langcake, P., Pryce, R.J. and Leworthy, D.P. 1977. *Nature* 267, 511.
- Constabel, F. and Nassif-Makki, H. (1971). Betalainbildung in beta-calluskulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 84:629-636.
- Cooper, R. (1983). The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. En: *Biochemical Plant Pathology* (Callow, J., ed.) John Wiley and Son Ltd. Londres. pp 101-157.
- Creelman, R. and Mullet, J. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4114-4119.
- Chappell, J. and Nable, R. (1987). Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol*, 85: 469-73.
- Chasan, R. (1995). Eliciting phosphorylation. *The Plant Cell*, 7: 495-497.
- Chen, Z., Malamy, J., Henning, J., Conrath, U., Sánchez-Casas, P., Silva, H., Ricigliano, J. and Klessig, D. (1995). Induction modification and traduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4134-4137.
- Constabel, F. (1987). Cell culture in phytochemistry. In: *Cell culture and somatic cell Genetics of plants*, Vol. 4. pp. 3-11.
- Davis, R. M. and Marshall, K.D. (1993). First report of *Fusarium* wilt of basil in California. *Plant Disease* 77:537.
- Deverl, B. (1972). Phytoalexins and disease resistance. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 181: 233-246.
- Dicosmo, F. and Misawa M. (1995). Plant cell and tissue culture: alternative for metabolite production. *Biotechnology advances* vol. 13 No. 3 pp. 425-253.
- Dixon, R.A., Dey, P.M. and Lamb, C.J. 1983. *Adv. Enzym.* 55:1.

- Doares, S. H., Syrovets, T., Weiler, E. W. and Ryan, C.A. (1995). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:4095-4098.
- Eilert, U. (1987). Elicitation: methodology and aspects of application. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol 4.* Academic Press, Inc. pp 154-196.
- Eilert, U., De Luca, V., Constabel, F. and Kurz, W. (1987). Elicitor-mediated induction of tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase activities in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 254(2): 491-497.
- Ensminger, P. (1993). Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. *Physiologia Plantarum*, 88: 501-508.
- Facchini, P. and Chappell, J. (1992). Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 11088-11092.
- Gibson, C.A. and Nobel, S.P. (1990). *The cactus primer.* Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. (first edition). pp 188-190.
- Girod, P.A. and Zrýd, J.P. (1987). Clonal variability and light induction of betalain synthesis in red beet cell cultures. *Plant Cell Rep.* 6:27-30.
- Girod, P.A. and Zrýd, J.P. (1991). Secondary metabolism in cultured red beet (*beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 25:1-2.
- Gottlieb, O. (1990). Phytochemicals: differentiation and function. *Phytochemistry.* 29(6): 1715-1724.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., N Renberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. and Schmelzer, E. (1995). Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92: 4150-4157.
- Harborne, J.B., (1973). *Phytochemical methods.* Academic Press London. p 18.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Harborne, J.B., 1988. Introduction to ecological biochemistry. 3^a Edn., pp. 302-340. Academic Press London.
- Hermann, K. and Dreiding, A.S. (1977). Totalsynthese von betalainen. *Helv. Chim. Acta.* 60:673-683.
- Hernández, H. y Godínez, H. (1994). Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, 26:33-52.
- Ilker, R. (1987). In vitro pigment production: an alternative to color synthesis. *Food Technology*. Abril pp. 70-72.
- Impellizzeri, G., Piattelli, M. and Sciuto, S. (1973). A new betaxanthin from *Glottiphyllum longum*. *Phytochemistry*, 12:2293-2294.
- Jiménez-Aparicio, A. Dávila-Ortiz, G., Villegas-Garrido, T.L. y Del Villar-Martínez, A. 1992. Obtención de betalainas, colorantes de interés alimentario por cultivo de células de *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff. *Revista Latinoamericana de Química*. 23/1 y 22/4, 5-8.
- Knobloch, K. H. and Berlin, J. (1981). Effects of media constituents on the formation of secondary products in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In Moo-Young, M., ed. *Advances in Biotechnology*, vol. 1. Toronto: Pergamon Press. pp 129-133.
- Kokubun, T., Harborne, J., Eagles, J. and Waterman, P. (1995). Antifungal biphenyl compounds are the phytoalexins of the sapwood of *Sopbus aucuparia*. *Phytochemistry*, 40(1): 57-59.
- Kuhn, P., Hargreaves, J. (1987). Antifungal substances from herbaceous plants. En: *Fungal Infection of Plants* (Pegg, G. y Ayres, P., eds.). Symposium of the British Mycological Society. Cambridge University Press. pp 193-218.
- Kutney, J. (1993). Plant cell culture combined with chemistry: a powerful route to complex natural products. *Acc. Chem. Res.*, 26: 559- 566.
- Leathers, R.R.; Davin, C. and Zrýd, J.P. (1992). Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. Var. Bikores Monogerm (red beet). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28:39-45, April.

- Liu, Q., Markham, K.R., Paré P.W., Dixón, R. and Mabry, T. (1993). Flavonoids from elicitor-treated cell suspension cultures of *Cephalocereus senilis*. *Phytochemistry*, 32:4:925-928.
- Loyola, V.M. y Reyes, L.J. (1985). El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales. En: *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. Ed. Robert M.L. Centro de Investigación Científica de Yucatán, CONACYT. pp 125-132.
- Mabry, T.J. (1980). Betalains. In: Pirson A, Zimmerman MH (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology*, Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag, pp 513-533.
- Mansfield, J.W. 1982. in: *Phytoalexins*. Mansfield, J.W. and Bailey, J.A.; eds. John Wiley, New York. p. 253.
- Marinelli, F., Nuti, R.V and Salvador, P. (1994). Elicitor induction of enzyme activities and 6-methoxymellein production in carrot cell suspension culture. *Phytochemistry*, 6:1457-1460.
- Messner, B. and Boll, M. (1993). Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34: 261-269.
- Misawa, M. (1980). Industrial and governmental research. In: Staba EJ (ed). *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp 167-190.
- Morris, R.A.C., Ewing, D.F., Whipps, J.M. and Coley-Smith, J.R. (1995). Antifungal hydroxymethyl-phenols from the mycoparasite *Verticillium biguttatum*. *Phytochemistry*, 39:1043-1048.
- Mulder-Kieger, Th., Verporte, R. Baerheim-Svendensen y Scheffer, J. (1988). Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. a review. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 13: 85-154.
- Murashige, T. 1997. Plant cell and organ culture as horticultural practices. *Acta Hort*. 78:17-30.

- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nielsson, T. (1970). *Lantbrhögsk Annir.* 36:179.
- Nobel, P.S. (1988). *Environmental biology of agaves and cacti.* Cambridge University Press. pp. 10-15.
- Nobel, P.S. (1994). *Remarkable agave and cacti.* Oxford University Press, New York. pp. 76.
- Ontiveros, X. A., y Rodríguez, M.M. (1995). Aislamiento de líneas celulares de *Beta vulgaris* productora de betalainas. *PUAL.* pp. 24-30.
- Paré, P. W., Mischke, C. F., Edwards, R., Dixon, R., Norman, H. and Mabry T. (1992). Induction of phenylpropanoid pathway enzymes in elicitor-treated cultures of *Cephalocereus senilis*. *Phytochemistry*, 31:1:149-153.
- Paré, P.W. and Mabry, T.J. (1993). Chemical defense in *Cephalocereus senilis* (old-man-cactus) against the cactus soft root pathogen *Erwinia cacticida*. *Haseltonia* 1:61-64.
- Paré, P.W., Dmitrieva, N. and Mabry, T.J. (1991). Phytoalexin aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspension culture. *Phytochemistry.* 30:1133-1135.
- Payne, G., Bringi, U., Prince, C and Shuler, M. (1991). *Plant cell and tissue culture in liquid systems.* Hanser Publishers, New York. pp 25-39, 147-163.
- Peters, N. and Verma, D. (1990). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Molecular Plant- Microbe Interactions*, 3: 4-8.
- Piatelli, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. In: Conn EE (ed). *The Biochemistry of Plants.* New York: Academic Press, Vol. 7, pp 557-575.
- Ren, Y. and West, A. (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by Chitin. *Plant Phisiol.*, 99: 1169-1178.
- Rink, E. and Bohm, H. (1991). Effect of dopa feeding on betaxanthins in various species of centrospermae. *Phytochemistry* 30:1109-1112.

- Robles-Zepeda, R. 1997. Aplicaciones industriales de cactáceas. En "Técnicas Convencionales y Biotecnológicas para la Propagación de Plantas de Zonas Áridas". Ed.: FAO/PNUMA/UNAM. Páginas 269-274.
- Rodríguez G. B. y Rubluo I. A. La biotecnología vegetal en el mejoramiento genético. 1992.
- Rodríguez, M., Jiménez, A. et al. 1994. Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnology Letters*. 16:853-858.
- Saad Villegas, María Isabel, 1996. Efecto de elicitores sobre la producción de metabolitos secundarios en *Piqueria trinervia* Cav. Tesis de Maestría en Biotecnología, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrados del CCH, UNAM, México, D.F.
- Sakuta, M., Takagi, Tsutomu, and Komamime A. 1987. Effects of sucrose on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*, *Physiologia Plantarum* 71:455-458. Copenhagen.
- Sánchez de Jiménez, E. (1985). El cultivo de tejidos vegetales en la investigación básica. En: *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. Ed. Robert M.L. Centro de Investigación Científica de Yucatán, CONACYT. pp 111-124.
- Spears, K. (1988). Developments en food colouring: the natural alternatives. *TIBTECH* 6:283-288.
- Straathof, P. T., Jansen, J. and Löffler H.J.M. (1993). Determination of resistance to *Fusarium oxysporium* in *Lilium*. *Phytopathology*, 83: 568-572.
- Strack, D., Bokern, M. Marxen, N. and Wray, V. (1988), Feruloylbetanin from petals of *Lampranthus* and feruloylamaranthin from cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry*, 27:3529-3531.
- Taticcek, R., Moo-Young, M. and Legge, R. (1991). The scale-up of plant cell culture: engineering considerations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24: 139-158.).

- Terras, F., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N., Osborn, R., Kester, A., Rees, S., Torrekens, S., Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. and Broekaert, W. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, 7: 573-588.
- Toivonen Leena (1993). Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* 9:12-20
- Tomiyama, K., Okamoto, H. and Katou, K. (1983). Effect of infection by *Phytophthora infestans* on the membrane potential of potato cells. *Physiological Plant Pathology*, 22: 233-243.
- Vickery, M.L. and Vickery, B. 1981. Secondary plant metabolism. University Park Press. Baltimore EUA. p. 1.
- Villegas-Garrido, T.L., Jiménez-Aparicio, A. y Chávez-Moctezuma, M.P. 1992. Efecto de factores físico-químicos en el cultivo de células de *A. tricolor* en un medio semisólido para la producción de betalainas. *Biotecnología*, vol.2 N° 4, pp. 105-120.
- Wierman, R. (1981). Secondary plant products and cell and tissue differentiation. En: *The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise*, Vol 7.(Stumpf, P. y Conn, E. eds.) Academic Press, Inc. USA, pp 85-111.