



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES INDÓLICOS
MONOTERPENOIDES EN CULTIVOS DE CALLO Y CÉLULAS
EN SUSPENSIÓN DE *Tabernaemontana alba* Mill.
(Apocynaceae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FELIX KRENGEL

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES INDÓLICOS
MONOTERPENOIDES EN CULTIVOS DE CALLO Y CÉLULAS
EN SUSPENSIÓN DE *Tabernaemontana alba* Mill.
(Apocynaceae)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

FELIX KRENGEL

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:
DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA
JARDÍN BOTÁNICO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM
DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/699/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **31 de agosto de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **KRENGEL FELIX** con número de cuenta **409490097** con la tesis titulada **PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES INDÓLICOS MONOTERPENOIDES EN CULTIVOS DE CALLO Y CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Tabernaemontana alba* Mill. (Apocynaceae)**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. JOSEFINA HERRERA SANTOYO**:

Presidente: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Vocal: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Secretario: DR. RICARDO REYES CHILPA
Suplente: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL CHÁVEZ ÁVILA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de octubre de 2015

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/ipp

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por proporcionarme las condiciones para estudiar en una institución académica de excelencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 292756 (CVU 545330) otorgada para la realización de mis estudios.

A los miembros del Comité Tutor:

Dra. Josefina Herrera Santoyo

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas las oportunidades brindadas y el universo de conocimiento transmitido.

A la I.A. Teresa de Jesús Olivera Flores, por la dirección del trabajo en el cultivo de tejidos vegetales.

Al M. en C. Roberto Enrique Llanos Romero, por el apoyo técnico brindado durante todo el desarrollo del trabajo experimental, especialmente en la técnica de cromatografía de gases.

Al M. en C. Delfino Álvaro Campos Villanueva, por el apoyo técnico brindado en la recolecta e identificación del material vegetal.

A la M. en C. Beatriz Zúñiga Ruiz, por el apoyo técnico brindado en la preparación del material vegetal y la obtención de extractos.

Al Dr. Francisco Javier Pérez Flores y al I.Q. Luis Velasco Ibarra, por la realización de los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Al M. en C. Manuel Hernández Quiroz, por el apoyo técnico brindado en el manejo de datos derivados de la espectrometría de masas.

A la Quím. María de los Ángeles Peña González, por la realización de los análisis de resonancia magnética nuclear.

Al Biól. David Eduardo Torres Sánchez, por la colaboración en la elicitación biótica.

A la M. en C. Aracely Arandal Martínez y al M.V.Z. Jorge Israel Aparicio Hernández, por compartir su experiencia y sus conocimientos del cultivo de tejidos vegetales conmigo.

A la Dra. Patricia Guevara Fefer, a la Dra. Eva Aguirre Hernández y a la Q. A. Verónica Muñoz Ocotero, por las numerosas enseñanzas que contribuyeron a mi formación profesional.

A Bob Sisko de Phytostan, por la donación de los estándares químicos.

A los miembros del Comité Sinodal:

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez, por sus acertadas observaciones.

A la Dra. María del Rocío Cruz Ortega, por enriquecer el trabajo escrito y mi formación profesional.

A la Dra. Ana María García Bores, por sus atinadas observaciones y dedicación en la revisión del trabajo escrito.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. OBJETIVOS.....	4
III. ANTECEDENTES.....	5
3.1. Botánica.....	5
3.2. Fitoquímica.....	5
3.3. Etnobotánica.....	7
3.4. Farmacología.....	7
3.5. Cultivo de tejidos vegetales (CTV).....	8
3.6. Antecedentes de <i>Tabernaemontana alba</i> en la literatura científica.....	10
IV. METODOLOGÍA.....	13
4.1. Recolecta del material vegetal.....	13
4.2. Germinación y cultivo <i>in vivo</i>	13
4.3. Inducción de callo <i>in vitro</i>	14
4.4. Establecimiento y proliferación de cultivos de células en suspensión.....	15
4.5. Elicitación biótica y abiótica de los cultivos de células en suspensión.....	16
4.6. Obtención de los extractos alcaloideos.....	18
4.7. Análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos alcaloideos.....	19
4.8. Análisis estadístico.....	20
V. RESULTADOS.....	21
5.1. Germinación <i>in vivo</i>	21
5.2. Inducción de callo <i>in vitro</i>	21
5.3. Establecimiento y proliferación de cultivos de células en suspensión.....	27
5.4. Elicitación biótica y abiótica de los cultivos de células en suspensión.....	33
5.5. Análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos alcaloideos.....	37
VI. DISCUSIÓN.....	46
6.1. Germinación <i>in vivo</i>	46
6.2. Inducción de callo <i>in vitro</i> y establecimiento y proliferación de cultivos de células en suspensión.....	46
6.3. Elicitación abiótica y biótica de los cultivos de células en suspensión.....	49
6.4. Análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos alcaloideos.....	51
VII. CONCLUSIONES.....	59
VIII. LITERATURA CITADA.....	60
IX. ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de la triptamina (1), de la secologanina (2), de los MIAs ibogaína (3) y voacangina (4) (Fuente: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).....	6
Figura 2. Plantas de <i>T. alba</i> : a) planta silvestre madura en la región de los Tuxtlas, Veracruz; b) planta de aproximadamente 2 años de edad cultivada en invernadero (en maceta roja); c) flores de la misma planta; d) planta cultivada en invernadero de aproximadamente diez meses de edad.....	10
Figura 3. Frutos y semillas de <i>T. alba</i> : a) frutos maduros; b) fruto maduro conteniendo semillas con arilo anaranjado y látex blanco al centro; c) semillas con arilo; d) semillas con arilo removido.....	11
Figura 4. Callo inducido en explantes foliares expuestos a medio MS con los reguladores de crecimiento: a) 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente); b) ANA y BA (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente).....	22
Figura 5. Callo originado de explantes: a) foliares; b) de tallo.....	24
Figura 6. Callo de origen: a) foliar; b) de tallo expuesto a un fotoperiodo de 16/8 h (1) u oscuridad continua (2).....	25
Figura 7. Callos y embriones somáticos viables creciendo sobre: a) explantes foliares oxidados; b) callo oxidado.....	26
Figura 8. Diferentes fases de la obtención de plantas completas mediante embriogénesis somática: a) explantes foliares con callo embriogénico; b) callo con embriones somáticos y plántulas; c) planta completa en medio MS; d) planta completa aclimatizada en suelo..	27
Figura 9. Curva de cinética de crecimiento de LAH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	28
Figura 10. Curva de cinética de crecimiento de LCH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	28
Figura 11. Curva de cinética de crecimiento de LFH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	29
Figura 12. Curva de cinética de crecimiento de L-OCH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	29
Figura 13. Ganancia de biomasa (g/ml) en L-OCH1, LAH1, LCH1 y LFH1 después de 11 días de iniciados los cultivos (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	30

Figura 14. Pesos frescos (PF) y secos (PS) de células en suspensión de L-OCH1 cultivadas en medio MS con los reguladores de crecimiento 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente) (medio II) o ANA, AIA, AIB y BA (1 mg, 1 mg, 1 mg y 0.2 mg/l, respectivamente) (medio I) (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	31
Figura 15. Cultivos de células en suspensión de L-OCH1 en medio MS con los reguladores de crecimiento: a) 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente); b) ANA, AIA, AIB y BA (1 mg, 1 mg, 1 mg y 0.2 mg/l, respectivamente).....	32
Figura 16. Pesos frescos (PF) y secos (PS) de células elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	33
Figura 17. Rendimientos de extractos hexánicos (HEX) y metanólicos (MeOH) por peso seco (PS) de biomasa de células elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	33
Figura 18. Rendimientos de extractos alcaloideos por peso seco de biomasa de células elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	34
Figura 19. Rendimientos de extractos hexánicos (HEX) y metanólicos (MeOH) de células elicidadas con diferentes cantidades de micelio de <i>Fusarium</i> sp. (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	36
Figura 20. Rendimientos de extractos alcaloideos de células elicidadas con diferentes cantidades de micelio de <i>Fusarium</i> sp. (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).....	36
Figura 21. Cromatograma obtenido del extracto alcaloideo de la corteza de tronco de <i>T. alba</i> (RT 35.97 min = ibogaína, RT 36.43 min = voacangina).....	38
Figura 22. Espectros de masas de ibogaína: a) contenida en el extracto alcaloideo de la corteza de tronco de <i>T. alba</i> ; b) referencia de NIST; c) estándar químico.....	39
Figura 23. Espectros de masas de voacangina: a) contenida en el extracto alcaloideo de la corteza de tronco de <i>T. alba</i> ; b) referencia de NIST; c) estándar químico.....	40
Figura 24. Detalle del cromatograma obtenido del extracto alcaloideo del callo del lote OATN3 (inyectado a una concentración de 5 mg/ml) con picos de ibogaína y voacangina químicamente puras (estándares externos, en rojo; cada uno inyectado a una concentración de 0.08 mg/ml).....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Antecedentes del CTV del género <i>Tabernaemontana</i>	9
Cuadro 2. Iniciadores u oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada región, sintetizados en el IBT, UNAM (Cuernavaca, Morelos).....	17
Cuadro 3. Identificación taxonómica de las cepas de hongos endófitos con base en BLAST (NCBI).....	35
Cuadro 4. Alcaloides identificados en los extractos alcaloideos de diferentes órganos de <i>T. alba</i> mediante GC-MS.....	37
Cuadro 5. Porcentajes de ibogaína y voacangina por peso seco de los extractos alcaloideos y del material vegetal de origen obtenido de plantas completas de <i>T. alba</i>	42
Cuadro 6. Porcentajes de ibogaína y voacangina por peso seco de los extractos alcaloideos y del material vegetal de origen obtenido de los cultivos <i>in vitro</i> stock de <i>T. alba</i>	43
Cuadro 7. Porcentajes de ibogaína y voacangina por peso seco de los extractos alcaloideos y del material vegetal de origen obtenido de los cultivos <i>in vitro</i> de <i>T. alba</i> elicitados con MeJA.....	45

RESUMEN

Tabernaemontana alba Mill. (Apocynaceae) es una especie nativa de México utilizada en la medicina tradicional de la cual existe poca información fitoquímica y ninguna respecto del cultivo de tejidos vegetales (CTV). Con el fin de estudiar la producción de alcaloides indólicos monoterpénicos (MIAs, por sus siglas en inglés) en cultivos *in vitro* de *T. alba*, se desarrolló un protocolo para inducir callo en distintos tipos de explante e iniciar cultivos de células en suspensión, los cuales posteriormente se elicitaron con jasmonato de metilo (MeJA, por sus siglas en inglés) y *Fusarium* sp. De los cultivos *in vitro* elicitados y no elicitados se obtuvieron extractos alcaloideos que se analizaron por cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) para cuantificar dos MIAs con actividad antiadictiva, ibogaína y voacangina, mediante el método del estándar externo. Los resultados se compararon con extractos alcaloideos de diferentes órganos de plantas completas de *T. alba*, en los cuales se identificaron previamente 8 MIAs, incluidas ibogaína y voacangina, mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS, por sus siglas en inglés). En los dos ensayos de elicitación no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Sin embargo, varios cultivos de callos y de células en suspensión produjeron ibogaína en concentraciones intermedias (hasta 0.0034% del peso seco del material vegetal) y voacangina en cantidades bajas pero detectables (hasta 0,0004%), comparadas con los órganos de plantas completas silvestres y cultivadas en invernadero (hasta 0,0397% y 0,0838%, respectivamente). Rendimientos relativamente altos de ibogaína (0.0244%) y voacangina (0.0659%) se registraron en extractos alcaloideos de plantas completas de *T. alba* cultivadas *in vitro* derivadas de la inducción fortuita de embriogénesis somática en algunos explantes. Además de reportar por primera vez la presencia de ibogaína y voacangina en *T. alba*, se concluyó que el CTV de la especie es una opción viable para producir estos MIAs, por un lado mediante la inducción de embriones somáticos que dan lugar a plantas completas, y por otro lado, por medio del establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión, siempre y cuando se optimicen los rendimientos de alcaloides en los últimos.

ABSTRACT

Tabernaemontana alba Mill. (Apocynaceae) is a species native to Mexico and used in traditional medicine on which little phytochemical information exists. Regarding plant tissue culture (PTC) of this species, there is no information at all. In order to study the production of monoterpenoid indole alkaloids (MIAs) in *in vitro* cultures of *T. alba*, a protocol for callus induction in different explant types, as well as for the establishment of cell suspension cultures was developed. The latter were elicited with methyl jasmonate (MeJA) and *Fusarium* sp., respectively. Alkaloid extracts were obtained from the elicited and untreated *in vitro* cultures and analyzed by gas chromatography (GC) to quantify two MIAs with antiaddiction activity, ibogaine and voacangine, using the external standard method. The results were compared to alkaloid extracts obtained from different organs of whole *T. alba* plants in which 8 MIAs, including ibogaine and voacangine, were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). No significant differences were observed between treatment and control groups in the two elicitation assays, but several callus and cell suspension cultures produced intermediate concentrations of ibogaine (up to 0.0034% of dry weight of plant material) and low but detectable quantities of voacangine (up to 0.0004%), compared to the organs of wild and greenhouse-grown whole plants (up to 0,0397% and 0,0838%, respectively). Relatively high yields of ibogaine (0.0244%) and voacangine (0.0659%) were registered in alkaloid extracts of *in vitro* grown whole *T. alba* plants derived from the fortuitous induction of somatic embryogenesis in some explants. In addition to reporting for the first time the presence of ibogaine and voacangine in *T. alba*, it was concluded that plant tissue cultures of this species are a viable option for producing these MIAs via the induction of somatic embryos which originate whole plants, and, alternatively, through the establishment of callus and cell suspension cultures, providing that yields can be optimized in the latter.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una ciencia con numerosas aplicaciones tecnológicas, y una herramienta muy útil para la obtención de grandes cantidades de plantas completas de interés agronómico y comercial o en peligro de extinción. A partir de una sola hoja (o bien de un segmento de cualquier otro órgano vegetal) se pueden regenerar literalmente miles de plantas genéticamente idénticas en condiciones óptimas, controlando por un lado las variables ambientales claves (como la naturaleza y los niveles de nutrimentos, reguladores de crecimiento, energía luminosa y temperatura) y por otro lado proporcionando un entorno aséptico, es decir, libre de virus y microorganismos que podrían comprometer el sano desarrollo de los cultivos *in vitro*. El fenómeno que permite los procesos anteriores se denomina totipotencialidad y consiste en la capacidad de muchas células vegetales de convertirse en cualquier tipo celular diferenciado al recibir los estímulos adecuados en forma de reguladores de crecimiento endógenos o exógenos (George, 2008).

Sin embargo, no siempre es necesario llegar al nivel de planta completa, en el caso de la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo, el CTV puede proporcionar cultivos de callos y de células en suspensión que a pesar de sus bajos grados de diferenciación celular biosintetizan los compuestos de interés. No obstante, como los cultivos *in vitro* suelen desarrollarse en condiciones óptimas y tomando en cuenta que muchos metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra patógenos y herbívoros, el rendimiento de los productos naturales en cuestión puede ser bajo o nulo. En muchos casos, la solución del problema consiste en aplicar un tipo de estrés abiótico o biótico en forma de un elicitor apropiado a los cultivos celulares, estimulando así la producción de los metabolitos de interés (Patel & Krishnamurthy, 2013).

El objetivo del presente trabajo de investigación consiste en sentar las bases para la producción de alcaloides indólicos monoterpénoides (MIAs, por sus siglas en inglés) mediante el CTV de *Tabernaemontana alba*, una especie de la familia Apocynaceae nativa de México sin antecedentes en la literatura científica al respecto. Se pone especial énfasis en la biosíntesis de ibogaína y voacangina, debido al interés que dichos alcaloides han despertado en sectores de la comunidad científica por sus efectos antiadictivos desde los años 1990 (Spinella, 2001). Además, se espera contribuir de manera general al conocimiento fitoquímico de *T. alba*, analizando cualitativa y cuantitativamente la presencia de MIAs en diferentes órganos de plantas completas.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la producción de alcaloides indólicos monoterpénicos (MIAs, por sus siglas en inglés) y el efecto de dos elicitores (uno biótico y otro abiótico) en cultivos *in vitro* de *Tabernaemontana alba*.

Objetivos particulares

Cultivo de tejidos vegetales (CTV):

1. Establecer cultivos de callos y células en suspensión de *T. alba*, y determinar los tipos de explante (obtenido a partir de diferentes órganos: raíz, tallo y hoja) y las variables respectivas (medio de cultivo, nutrimentos, reguladores de crecimiento) más apropiados.
2. Proliferar los cultivos de callos y células en suspensión de *T.alba*.
3. Caracterizar los parámetros de crecimiento (cinética y relación peso fresco-peso seco) de los cultivos de células en suspensión de *T.alba*.
4. Elicitar los cultivos de células en suspensión de *T.alba* con tres concentraciones de un elicitador biótico (*Fusarium* sp.) y otro abiótico (jasmonato de metilo (MeJA, por sus siglas en inglés)).

Fitoquímica:

1. Obtener extractos alcaloideos de los cultivos de callos y células en suspensión de *T. alba* elicitados y no elicitados.
2. Analizar cualitativamente extractos alcaloideos de distintos órganos de plantas completas de *T. alba* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés).
3. Analizar cuantitativamente los extractos alcaloideos de callos y células en suspensión de *T. alba* elicitados y no elicitados por GC respecto de su contenido de ibogaína y voacangina.
4. Comparar las cantidades de ibogaína y voacangina en los extractos alcaloideos de los cultivos de callos y células en suspensión de *T. alba* elicitados, no elicitados y de distintos órganos de plantas completas de *T. alba*.

III. ANTECEDENTES

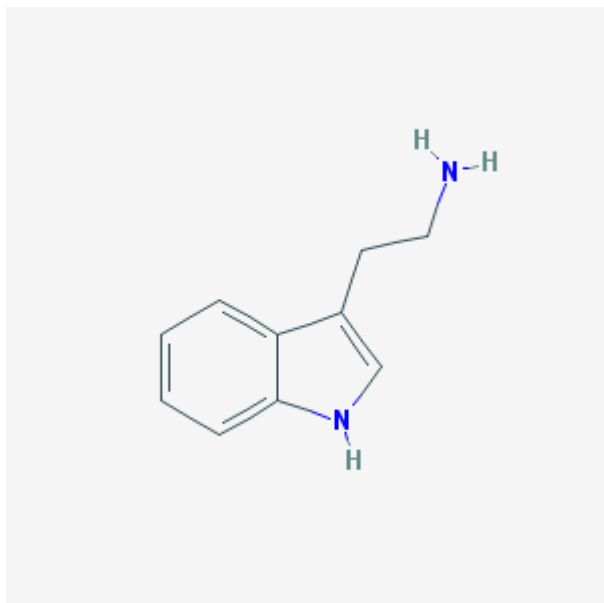
3.1. Botánica

El género *Tabernaemontana* pertenece a la familia Apocynaceae, subfamilia Rauvolfioideae, tribu Tabernaemontaneae (Sennblad *et al.*, 2002) y consiste de aproximadamente 100 especies distribuidas a lo largo de las zonas tropicales y subtropicales de la Tierra (van Beek *et al.*, 1984). Estos arbustos o árboles perennifolios tienen hojas opuestas, flores actinomorfas con corolas blancas y presentan un látex lechoso (Encyclopedia of Life). Los frutos reniformes y segmentadas se dividen simétricamente en dos partes (Rätsch, 2007) y contienen semillas con arilo dispersadas por zoocoria (Simoes *et al.*, 2010).

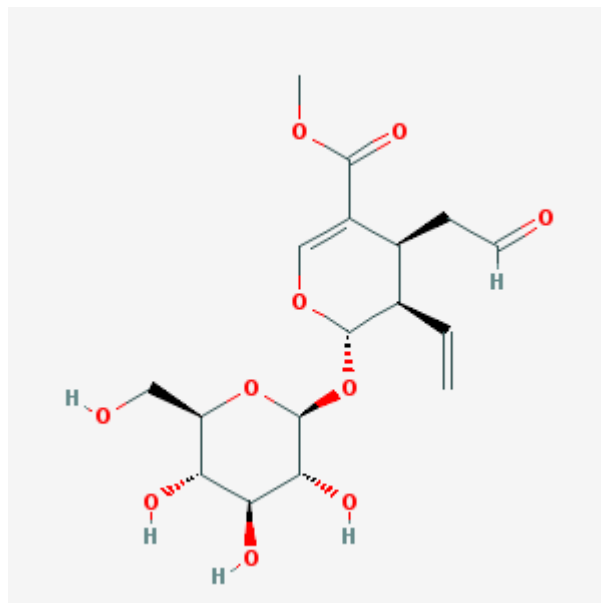
En México, existen al menos 12 especies de *Tabernaemontana* (Alvarado Cárdenas & Juárez Jaimés, 2012) de las cuales varias abundan en zonas perturbadas formando componentes claves de la vegetación secundaria (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

3.2. Fitoquímica

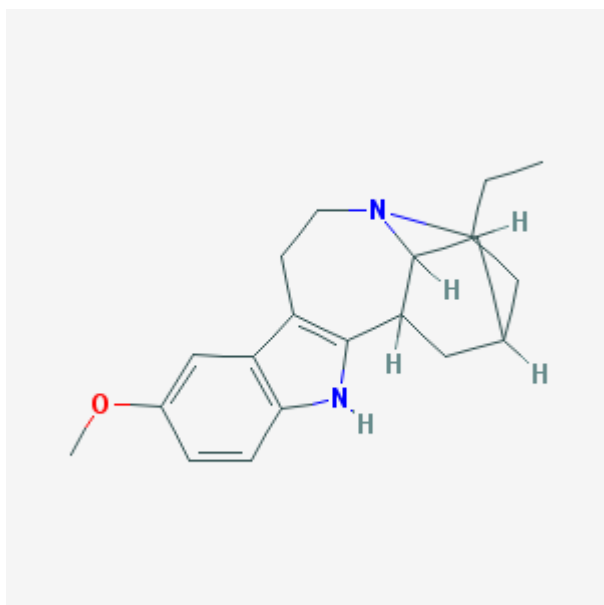
Tabernaemontana se distingue por la producción de alcaloides indólicos monoterpénicos (MIAs, por sus siglas en inglés), denominados así por presentar una estructura indólica originada del triptofano, más específicamente de la triptamina, ligada a una unidad monoterpénica derivada de la secologanina (Danieli *et al.*, 1986) (Figura 1). La enorme variedad de MIAs biosintetizados por el género se refleja en la clasificación de van Beek *et al.* (1984) compuesta de 11 grupos con distintos esqueletos estructurales, divididos además en varias subcategorías. Los grupos más comunes en *Tabernaemontana* son del tipo plumerano, corinanteano e ibogano (Danieli *et al.*, 1986), de los cuales el último puede formar complejos con lignanos y alcoholes hidroxicinamílicos (Lim & Kam, 2009a y 2009b).



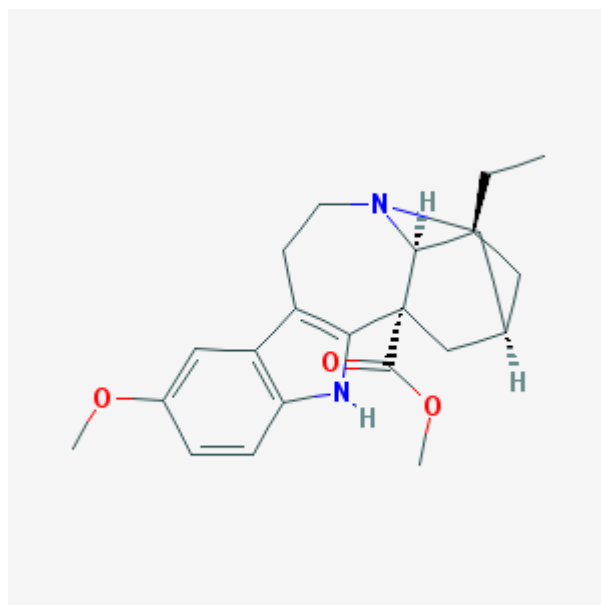
1



2



3



4

Figura 1. Estructuras químicas de la triptamina (1), de la secologanina (2), de los MIAs ibogaína (3) y voacangina (4) (Fuente: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

Otros compuestos encontrados en el género son alcaloides del tipo beta-carbolina (Mansoor *et al.*, 2009a y 2009b), triterpenoides como amirinas y lupeol, flavonoides, glicósidos cardiotónicos, los ácidos salicílico y benzoico, así como una enzima bacteriolítica (van Beek *et al.*, 1984).

3.3. Etnobotánica

Tabernaemontana muestra un amplio registro de uso etnobotánico a escala global, destacando el tratamiento de heridas, complicaciones dermatológicas y gastrointestinales, dolores intensos y/o crónicos, así como de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, protistas y nemátodos, e incluso de algunos trastornos neurológicos como la epilepsia. Ciertas especies sirven de base para la elaboración de preparaciones hipnóticas, narcóticas, tónicas, estimulantes y tóxicas, o bien para aliviar los efectos intoxicantes de picaduras o mordidas de insectos y víboras. Otros usos etnobotánicos son de los tipos afrodisíaco, abortivo, galactagogo y regulador de los desórdenes menstruales, sugiriendo la presencia de actividad hormonal en algunas preparaciones medicinales de *Tabernaemontana* (van Beek *et al.*, 1984).

3.4. Farmacología

El uso etnobotánico del género ha sido parcialmente corroborado mediante la elucidación de la actividad farmacológica de extractos crudos obtenidos de algunas especies de *Tabernaemontana*. En muchos casos, dicha actividad de los extractos pudo ser atribuido a ciertos MIAs, o en forma individual o de mezcla de varios alcaloides. Así, MIAs como camptotecina, 9-metoxicamptotecina, coronaridina, N4-dimetilvoacamina, olivacina, voacangina, isovoacangina, voacamina y 19-epivoacorina presentaron actividad citotóxica y antineoplásica en diferentes modelos como la línea celular de leucemia linfocítica P-388. Otros alcaloides de *Tabernaemontana* tuvieron efectos antivirales, antimicrobianos y antiparasíticos. Las propiedades analgésicas, anticonvulsivas o convulsivas, espasmolíticas, cardiotónicas y simpaticolíticas de varios MIAs son estrechamente asociados con el uso etnobotánico de *Tabernaemontana* (van Beek *et al.*, 1984). Algunos alcaloides del género inhibieron la acetilcolinesterasa en ensayos *in vitro* aplicando el método colorimétrico de Ellman (Ingkaninan *et al.*, 2006).

De manera general, los MIAs del tipo ibogano suelen actuar sobre el sistema nervioso central y varios compuestos de este grupo presentaron actividad antiadictiva en animales (sobre todo ratas y ratones, pero también el humano) dependientes de drogas de abuso. Ejemplos de sustancias con estas propiedades son la ibogaína, la ibogamina, la coronaridina y la tabernantina. La ibogaína es el alcaloide mejor estudiado al respecto, comprobando su interacción con varios tipos de receptores como los acetilcolinérgicos (nicotínicos y muscarínicos), los dopaminérgicos, los serotoninérgicos (5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}), los de glutamato del tipo NMDA, los opioides (kappa, mu y delta) y los sigma (1 y

2). La actividad antiadictiva de la ibogaína en animales parece deberse a un complejo equilibrio de efectos agonistas y antagonistas de este compuesto sobre los receptores mencionados, modulando la respuesta de varios neurotransmisores a determinadas drogas de abuso. En consecuencia, se reduce la magnitud de los efectos placenteros y/o los síndromes de abstinencia causados por sustancias como la cocaína, la morfina, las anfetaminas, la nicotina y el alcohol (Spinella, 2001).

La fuente natural más importante de ibogaína es *Tabernanthe iboga*, un arbusto originario de África (Spinella, 2001). Alternativamente, dicho alcaloide se puede obtener a partir de la saponificación y descarboxilación de la voacangina, presente en considerables cantidades en *Voacanga africana* (hasta 0.5% del peso seco de la corteza de tronco) (Janot & Goutarel, 1957) y otras especies de la familia Apocynaceae, entre ellas varias del género *Tabernaemontana* (van Beek *et al.*, 1984).

3.5. Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

En un artículo de revisión de los estudios publicados acerca de la producción de alcaloides mediante el cultivo *in vitro* de *Tabernaemontana*, Fumagali *et al.* (2008) destacan que esta línea de investigación a pesar de remontarse a los años 1980, se ha limitado a pocas especies: *T. divaricata*, *T. elegans* y *T. pandacaqui*, a las que habría que agregar *T. africana*, *T. crassa* y *T. orientalis* (Cuadro 1). No obstante, el número de alcaloides detectados en los respectivos cultivos ha sido considerable, dando un total de 47 compuestos, entre ellos aparicina, coronaridina, dregamina, periciclivina, isovoacangina, voafilina, vobasina y vobasinol.

Aparte del anterior enfoque, existe una cantidad limitada de investigaciones acerca del uso del CTV con el objetivo de regenerar plantas completas de *Tabernaemontana*. Kodja *et al.* (1997) lograron inducir embriogénesis somática en explantes foliares de *T. persicariaefolia* mediante el uso de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). El Cuadro 1 resume los estudios publicados acerca del CTV de *Tabernaemontana*.

Cuadro 1. Antecedentes del CTV del género *Tabernaemontana*.

Autor	Especie	Objetivos	Explante	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Elicitor	Metabolitos secundarios
Pawelka & Stöckigt (1983)	<i>T. divaricata</i>	Análisis fitoquímico	NE	B5 (células en suspensión)	Ninguno	Ninguno	Alcaloides
Van der Heijden <i>et al.</i> (1986, 1988a, 1988b, 1989)	<i>T. divaricata</i> , <i>T. elegans</i> , <i>T. orientalis</i> , <i>T. africana</i>	Análisis fitoquímico, elicitación	Tallo	MS, B5 (callos en medio sólido, células en suspensión)	2,4-D, kinetina, zeatina	Celulasa, pectinasa, <i>Aspergillus niger</i> (micelio)	Triterpenos, alcaloides
Schripsema <i>et al.</i> (1990, 1991, 1992, 1994)	<i>T. crassa</i> , <i>T. divaricata</i> , <i>T. elegans</i>	Metabolismo de alcaloides	NE	MS, B5 (células en suspensión)	2,4-D, kinetina	Ninguno	Alcaloides
Sierra <i>et al.</i> (1991, 1992)	<i>T. pandacaqui</i> , <i>T. divaricata</i>	Metabolismo de alcaloides	NE	MS (células en suspensión)	2,4-D, zeatina, kinetina, ANA, BA	Ninguno	Alcaloides
Dagnino <i>et al.</i> (1991, 1993a, 1993b, 1994, 1995)	<i>T. divaricata</i>	Metabolismo de alcaloides	NE	MS (células en suspensión)	Ninguno	Ninguno	Alcaloides, compuestos fenólicos, esteroides
Stevens <i>et al.</i> (1993)	<i>T. divaricata</i>	Metabolismo de alcaloides	NE	MS (células en suspensión)	2,4-D, kinetina	Ninguno	Ninguno
Kodja <i>et al.</i> (1997)	<i>T. persicariaefolia</i>	Regeneración de plantas completas	Hoja	MS (callos en medio sólido)	DFMO, 2,4-D, ANA, BA	Ninguno	Ninguno
Lucumi <i>et al.</i> (2001, 2002)	<i>T. divaricata</i> , <i>T. elegans</i>	Metabolismo de alcaloides	NE	MS (células en suspensión)	2,4-D, kinetina	Ninguno	Alcaloides
Oliveira <i>et al.</i> (2003)	<i>T. fuchsiaeifolia</i>	Regeneración de plantas completas	Hipocotilo, cotiledones, yemas axilares	MS (sólido)	BA, kinetina, floriglucinol, AIB	Ninguno	Ninguno
Suhartono <i>et al.</i> (2005)	<i>T. divaricata</i>	Comparación metabólica entre células normales y criopreservadas	NE	MS (células en suspensión)	2,4-D, kinetina	Ninguno	Ácido fumárico
Pereira <i>et al.</i> (2007)	<i>T. catharinensis</i>	Análisis fitoquímico, elicitación	Hoja	MS (células en suspensión)	2,4-D, kinetina	<i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium avelanium</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Triterpenos

NE = no especificado

2,4-D = 2,4-diclorofenoxiacético; ANA = ácido 1-naftalenacético; BA = benciladenina; DFMO = difluorometilornitina ; AIB = ácido indolbutírico

3.6. Antecedentes de *Tabernaemontana alba* en la literatura científica

T. alba (Figura 2) es una especie nativa de México que se distribuye en selvas altas perennifolias, selvas bajas caducifolias y matorrales xerófilos de los estados de Campeche, Chiapas, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Queretaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Juárez Jaimes *et al.*, 2007). En la región de los Tuxtlas, Veracruz, por ejemplo, constituye un elemento dominante de la vegetación secundaria de los potreros inducidos, en parte debido a que produce un látex que contiene metabolitos secundarios con efectos disuasivos de la alimentación en el ganado (Guevara *et al.*, 1997).



a)



b)



c)



d)

Figura 2. Plantas de *T. alba*: a) planta silvestre madura en la región de los Tuxtlas, Veracruz; b) planta de aproximadamente 2 años de edad cultivada en invernadero (en maceta roja); c) flores de la misma planta; d) planta cultivada en invernadero de aproximadamente diez meses de edad.

En la medicina tradicional mexicana, las semillas y el látex de *T. alba* (Figura 3) se utilizan para tratar infecciones dermatológicas y distintos tipos de dolores, como los de muela o de cabeza (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). A pesar de estos antecedentes y al contrario de otras especies de *Tabernaemontana*, la información fitoquímica de *T. alba* es escasa, en vista de que existe un solo estudio que reporta la presencia de los MIAs coronaridina y tabersonina en las semillas (Collera *et al.*, 1962).



a)



b)



c)



d)

Figura 3. Frutos y semillas de *T. alba*: a) frutos maduros; b) fruto maduro conteniendo semillas con arilo anaranjado y látex blanco al centro; c) semillas con arilo; d) semillas con arilo removido.

Referente al CTV de la especie, no se encontró registro alguno en la literatura científica.

Integrando la información anterior, se desarrolló el diseño experimental descrito en la siguiente sección, con el objetivo de estudiar la producción de MIAs en cultivos *in vitro* de *T. alba*. El CTV tiene la ventaja de proporcionar un ambiente controlado y axénico que reduce el número de variables que pueden influir en la biosíntesis de los productos naturales de interés, mientras que plantas completas silvestres o de invernadero están expuestas a diferentes condiciones climáticas y de suelo, así como una gran variedad de microorganismos. Además, la productividad de los cultivos *in vitro* puede ser optimizada mediante la selección de líneas celulares con características genéticas, epigenéticas y bioquímicas apropiadas, la modificación de las condiciones ambientales, la inclusión de concentraciones adecuadas de nutrimentos, reguladores de crecimiento y precursores al medio de cultivo, así como la elicitación abiótica o biótica. En consecuencia, determinados metabolitos secundarios pueden ser producidos en mayor volumen y a menor costo en comparación con la explotación o el cultivo de plantas completas. Aún más importante, el CTV de plantas medicinales permite el establecimiento de nuevas fuentes constantes y sustentables de productos naturales, en vista de la pérdida progresiva de grandes extensiones de hábitats naturales (Mulabagal & Tsay, 2004) que tal vez represente el mayor reto de la humanidad en el siglo XXI.

El presente proyecto de investigación se enfoca en la biosíntesis de los MIAs ibogaína y voacangina por su gran potencial como compuestos con actividad antiadictiva a varias drogas de abuso (Spinella, 2001). La farmacodependencia es un problema global creciente con impactos negativos en la salud pública, la economía y la convivencia social en muchos países (UNODC, 2014). En 2001, Nutt *et al.* publicaron un estudio controvertido que sugirió que los compuestos más dañinos para los consumidores y la sociedad británicos son la heroína, la cocaína y la metanfetamina, superadas solamente por el etanol. El tabaco, como el etanol una droga legal, ocupó el quinto lugar de las sustancias más nocivas.

En este contexto global, México lamentablemente no es la excepción. Muy al contrario, debido a su cercanía geográfica con los Estados Unidos de América (EEUU), el mayor consumidor de drogas ilegales a nivel mundial, nuestro país es uno de los más afectados por el narcotráfico, sirviendo de área de producción, tránsito y consumo de sustancias ilícitas (UNODC, 2014). Sin embargo, ya se está vislumbrando un cambio en el paradigma internacional de la política de las drogas, dominado sobre todo por la ideología de la llamada guerra contra las drogas, proclamada en 1971 por Ronald Reagan, expresidente de los EEUU. Se propone sustituir el actual enfoque punitivo y criminizador por uno preventivo basado en la salud pública (GCDP, 2014). Sustancias como ibogaína podrían aportar valiosos elementos al desarrollo de nuevos tratamientos para personas farmacodependientes.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Recolección del material vegetal

En noviembre de 2012, se recolectaron frutos maduros de *T. alba* en las inmediaciones de la Estación de Biología Los Tuxtlas del Instituto de Biología de la UNAM (cerca del Km 30 de la carretera Catemaco-Montepío). Las plantas *in situ* y el material vegetal recolectado fueron identificados por el M. en C. Álvaro Campos Villanueva, taxónomo de la Estación de Biología, y se depositó un ejemplar de herbario de *T. alba* en la Facultad de Ciencias (FC) de la UNAM (número de *voucher* 132793).

4.2. Germinación y cultivo *in vivo*

A) Germinación de semillas

Los arilos de las semillas recién recolectadas se quitaron y éstas se sumergieron en agua destilada durante 24 h. Posteriormente, las semillas se colocaron en cajas de Petri sobre papel filtro, se cubrieron con algodón saturado con agua destilada y se pusieron en una germinadora a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y oscuridad continua.

En caso de contaminación bacteriana o fúngica, las semillas afectadas se sumergieron en una disolución de hipoclorito de sodio comercial al 10% (v/v) durante 10 min, se enjuagaron con agua corriente, se dejaron en peróxido de hidrógeno al 0.3% (v/v) durante 80 min y se colocaron sobre papel filtro nuevo en cajas de Petri limpias.

Tres semanas más tarde las semillas tanto germinadas como no germinadas – éstas últimas para ver si su exposición a condiciones de suelo podía inducir la germinación – se pasaron a suelo en cajas de plástico cerradas, conteniendo tierra preparada comercial, libre de plagas y saturada con agua. Las semillas se incubaron a temperatura ambiente.

B) Cultivo de plantas

Al alcanzar una altura aproximada de 10 cm y al menos un par de hojas, las plantas se transfirieron a macetas individuales con tierra negra y se expusieron a condiciones de invernadero, regándolas dos a tres veces por semana y fertilizándolas con triple 17 comercial cada dos o tres meses.

Con el fin de romper la dominancia apical e inducir el crecimiento de brotes laterales y ramificaciones, los ápices de las ramas centrales de las plantas se podaron. Las últimas se regaron durante cinco meses con benciladenina (BA) (1 mg/l) cada dos semanas, alternando el riego anterior con la aplicación de benomilo y agri-mycin (2 g/l cada uno) para controlar la contaminación sistémica de las plantas.

4.3. Inducción de callo *in vitro*

Se probaron como explantes semillas de campo y hojas, asimismo tallos, nudos, ápices y raíces de cinco plantas de *T. alba* cultivadas bajo condiciones de invernadero, siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

A) Desinfección

Las estructuras vegetales se cortaron de las plantas en invernadero con bisturí y pinzas estériles y se trasladaron al laboratorio en frascos cerrados conteniendo una disolución estéril de ácido ascórbico y ácido cítrico (100 mg/l cada uno). En condiciones de asepsia, los explantes se sumergieron en etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto, enseguida se sometieron a una disolución de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) adicionando unas 15 gotas de microdyn y 3 gotas de tritón X-100 por cada 250 ml, y se mantuvieron durante 10 minutos con agitación constante y suave. Posteriormente se trataron sucesivamente con disoluciones estériles de benomilo (4 g/l durante 15 minutos), agri-mycin (4 g/l durante 15 minutos) y una combinación de cefotaxima y terbinafina (250 mg/l cada uno durante 10 min), realizando dos enjuagues con agua desionizada estéril antes y después de la aplicación de cada disolución.

B) Siembra

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100X del medio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 3% (p/v) de sacarosa, ácido ascórbico y cítrico (100 mg/l cada uno). Los reguladores de crecimiento agregados fueron ácido 1-naftalenacético (ANA) y BA (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente) o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente). El pH se ajustó a 5.7, y como agente gelificante se utilizó agargel (Sigma-Aldrich) (7 g/l). Los medios se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120° C, 1.2 kg/cm² (17 psi) durante 18 minutos. A los medios de cultivo se les adicionó cefotaxima (250 mg/l) y/o terbinafina

(250 mg/l). Los medios de cultivo se sirvieron en frascos de alimento infantil conteniendo 20 ml.

Los explantes foliares se colocaron con el haz o el envés hacia el medio de cultivo; los de tallo y de raíz horizontalmente; los explantes apicales y de nudo verticalmente (respetando su polaridad). Algunas semillas se expusieron enteras al medio, mientras que otras se cortaron transversal o longitudinalmente, ubicándolas con la superficie del corte sobre el medio.

C) Inducción y proliferación de callos

La mitad de los cultivos se expuso a un fotoperiodo de 16 h de luz fluorescente blanca (intensidad luminosa $29 \mu\text{Em}^{-2} \text{seg}^{-1}$) y 8 h de oscuridad mientras que la otra mitad se ubicó en oscuridad continua. La temperatura se ajustó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en ambos casos. Los subcultivos se realizaron cada tres semanas, eliminando la aplicación de cefotaxima y terbinafina a los medios nutritivos después del segundo subcultivo. Al aparecer callos disgregables sobre los explantes, éstos se separaron y se transfirieron a frascos individuales con medio nutritivo fresco.

4.4. Establecimiento y proliferación de cultivos de células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión se iniciaron inoculando matraces Erlenmeyer de 50 ml conteniendo 15 ml de medio basal MS adicionado con ácido ascórbico y cítrico (100 mg/l cada uno) y una combinación de 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente) con aproximadamente 1 g de callo obtenido de los cuatro lotes más prolíferos (denominados LAH1, LCH1, LFH1 y L-OCH1 por estar expuestos a un fotoperiodo (L) y/u oscuridad (O), y haberse derivado de explantes foliares (H) tomados de la planta (1) cultivada en invernadero; las letras (A), (C) y (F) simplemente distinguen los lotes). Los matraces se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm y en fotoperiodo durante 14 días. Posteriormente, se transfirieron a matraces de 125 ml conteniendo 50 ml del medio líquido fresco. La cinética de crecimiento de los lotes se determinó centrifugando 1 ml de suspensión celular de cada matraz en tubos Eppendorf a 13000 rpm durante 5 minutos para enseguida registrar el peso del paquete celular. Este procedimiento se repitió cada dos o tres días durante diez días.

Se escogió el lote L-OCH1 para escalar los cultivos de células en suspensión a matraces de 250 ml con 100 ml del medio arriba descrito, debido a que su cinética de crecimiento mostró mayor biomasa. Además, se prepararon cultivos en los cuales los reguladores de crecimiento 2,4-D y kinetina se habían sustituido por una combinación de ANA, ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) (1

mg/l cada uno) y BA (0.3 mg/l). Las células se subcultivaron cada dos semanas, reemplazando una cuarta parte del medio viejo con medio nuevo concentrado 4X.

4.5. Elicitación biótica y abiótica de los cultivos de células en suspensión

A) Elicitación abiótica

Todos los cultivos de células en suspensión del medio basal MS adicionado con ácido ascórbico y cítrico, así como 2,4-D y kinetina, se homogeneizaron en un solo matraz. Posteriormente, se dividieron en 20 matraces de 250 ml con 100 ml de medio, formando un grupo control y tres tratamientos de cinco repeticiones cada uno. Se elicitaron respectivamente con 0, 10, 100 y 200 μ M de MeJA. La disolución madre del elicitor se preparó disolviendo MeJA al 95% (v/v) en etanol absoluto, por lo que se tuvieron que ajustar los respectivos volúmenes de este alcohol añadidos a los tratamientos y el control, dando una concentración final de 180 μ l de etanol por 100 ml de medio (0.18% (v/v)).

B) Elicitación biótica

Tres cepas fúngicas se aislaron de explantes radicales y foliares contaminados en medio papa dextrosa agar (PDA) y/o extracto de malta agar (MEA), llevando a cabo subcultivos cada cuatro a seis semanas. Su identificación taxonómica mediante la extracción, amplificación y secuenciación de DNA fue realizado por el Biól. David Eduardo Torres Sánchez en el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados (COLPOS) Montecillo mediante el siguiente protocolo:

El DNA de cada cepa se obtuvo utilizando 0.2 mg/ml de proteinasa K y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) al 10% (p/v). Posteriormente, el DNA se disolvió en agua desionizada estéril, se cuantificó y se verificó su calidad en un espectrofotómetro NanoDrop N100.

Para fines de identificación, se amplificó la región de rDNA ITS1-5.8S-ITS2, consistiendo de las dos regiones intergénicas ITS (Internal Transcribed Spacer) 1 y 2, así como la región codificante 5.8S, haciendo uso de los iniciadores listados en el Cuadro 2. La mezcla de reacción y las condiciones de amplificación fueron las reportadas por Bensch *et al.* (2012), usando un termociclador Techne TC3000. Al final de la reacción los fragmentos amplificados se verificaron en un gel de agarosa al 1.5% (p/v)

(90 V/45 min) con un marcador de peso molecular de 1 Kb (Axygen 1kb Ladder DNA Marker). Para visualizar las bandas resultantes y establecer su correlación con el marcador de peso molecular, el gel se observó en un fotodocumentador Geldoc 2000 (BioRad).

Los productos amplificados se purificaron con un kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) y finalmente se mandaron a secuenciar en ambos sentidos al Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM (Cuernavaca, Morelos). Las secuencias obtenidas se analizaron en BLAST (NCBI). Para los siguientes análisis se corroboró la calidad de las secuencias con el programa 4Peaks, posteriormente se ensamblaron y editaron con los programas BioEdit y CLC Sequence Viewer 7.

Cuadro 2. Iniciadores u oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada región, sintetizados en el IBT, UNAM (Cuernavaca, Morelos).

Región	Nombre	Secuencia (5´-3´)	Referencia
ITS	ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS 2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	

Para el ensayo de elicitación biótica de los cultivos de células en suspensión se escogió a la cepa identificada como *Fusarium* sp. y se inocularon tres matraces de 2000 ml a 800 ml de medio extracto de malta líquido (MEB), manteniéndolos en agitación a temperatura ambiente durante 13 días. El micelio se separó del medio por filtración a presión reducida, se suspendió en agua destilada y se maceró en un homogeneizador (WiseMix HG15A). La suspensión se esterilizó en autoclave a una temperatura de 120°C, 1.2 kg/cm² por 60 minutos y se dejó enfriar. Posteriormente, se agregaron 0.54, 5.45 y 54.5 g de peso fresco de micelio por litro de medio a los tres tratamientos, respectivamente. Al grupo control se le añadió solamente agua destilada estéril.

C) Tiempos de elicitación y recolección de células

En los dos ensayos, los cultivos se elicitaron cuatro días después del último subcultivo, coincidiendo con el inicio de la fase exponencial de L-OCH1, y se cosecharon al día siete posterior a la elicitación para asegurar que había ocurrido un ciclo celular completo. Todos los tratamientos se cosecharon separando las células del medio mediante filtración a presión reducida. Las células se lavaron dos veces con agua destilada, se pesaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -20°C. Posteriormente se liofilizaron para determinar el peso seco. La biomasa se conservó en tubos de vidrio a temperatura ambiente en oscuridad. Los medios filtrados se almacenaron directamente a -20°C.

4.6. Obtención de los extractos alcaloideos

Siguiendo la metodología propuesta por Bhat *et al.* (2005) se elaboraron extractos alcaloideos del siguiente material vegetal :

- Hojas de una planta cultivada en invernadero
- Segmentos radicales de otra de estas plantas
- Parte del tronco y el sistema radical completo de una planta de invernadero
- Cinco plantas completas regeneradas *in vitro* en estadios tempranos de desarrollo (presentando uno a dos pares foliares)
- Callos de cultivos *stock* de distintos lotes expuestos a medio MS con 2,4-D y kinetina en un fotoperiodo u oscuridad
- Biomasa filtrada de cultivos de células en suspensión *stock* de distintos lotes y de los dos medios líquidos probados
- Los medios filtrados de dichos cultivos de células en suspensión
- Biomasa filtrada de los cultivos de células en suspensión de los dos ensayos de elicitación
- Medios filtrados de estos cultivos

El material seco se molió a mano en un mortero (callos, células en suspensión, plantas completas jóvenes y hojas) o en un molino Retsch SM 2000 (tronco y raíces), se desengrasó con hexano tres veces mediante sonicación en un baño de ultrasonido durante 30 minutos y se extrajo de la misma manera con metanol. Las disoluciones resultantes se filtraron y los disolventes se eliminaron por destilación a presión reducida.

El extracto metanólico seco se disolvió en una disolución de ácido clorhídrico a 0,001 M (pH 3) y se filtró. El filtrado se ajustó a un pH de 10 a 11 con hidróxido de sodio o hidróxido de amonio, y la disolución alcalina se extrajo tres veces con cloroformo o diclorometano en un embudo de separación. La selección del álcali y del disolvente dependió de la disponibilidad de material. La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó por evaporación a presión reducida. Los extractos alcaloideos se almacenaron a -20°C.

Los medios líquidos de los cultivos de células en suspensión se llevaron a un pH de 10 a 11 con hidróxido de amonio y se extrajeron directamente con cloroformo o diclorometano en un embudo de separación. El secado y la evaporación de la fase orgánica separada se realizó como descrito en el

párrafo anterior.

Además de los extractos mencionados arriba, ya se contaba con extractos alcaloideos de semillas, frutos, hojas, ramas, corteza de tronco y de raíz de *T. alba*, producto del proyecto de investigación de mi tesis de licenciatura (Krengel, 2013). El material vegetal correspondiente se tomó de plantas silvestres maduras en el mismo sitio un año antes que los frutos recolectados en 2012.

4.7. Análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos alcaloideos

A) Análisis cualitativo

Los extractos alcaloideos del material vegetal recolectado en campo se analizaron cualitativamente utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con columna capilar de sílica fusionada HP-5 (30 m), directamente acoplada a un espectrómetro de masas JEOL GCMate II en el Instituto de Química (IQ) de la UNAM bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Pérez Flores y el I.Q. Luis Velasco Ibarra. El método aplicado se modificó de Andrade *et al.* (2005), registrando los espectros de masas mediante ionización electrónica (EI-mass spectra) a 60eV, con el inyector en modo split 1:1 a una temperatura de 300°C, el programa del horno subiendo de 150 a 300°C (7.5 min) a 4°C/min y helio como fase móvil con un flujo de 1 ml/min.

Las sustancias presentes se identificaron tentativamente con base en la biblioteca de espectros de masa NIST (versión 2.0) y la revisión de la literatura científica. Además, los cromatogramas y espectros de los extractos se compararon con dos estándares químicos, la ibogaína (12-metoxiibogamina) y la voacangina (éster metílico del ácido-18-carboxílico-12-metoxiibogamina) que fueron donados por Phytostan Enterprises, Inc. (Montreal, Quebec). La identidad y pureza de los estándares se confirmaron mediante resonancia magnética nuclear (NMR) de ^{13}C y ^1H por la Q. María de los Ángeles Peña González en el IQ, utilizando un espectrómetro Varian Unity de 300 MHz. El disolvente usado fue cloroformo deuterado y los espectros se registraron a 75 MHz en el caso del análisis de ^{13}C , y a 300 MHz en el caso del análisis de ^1H .

B) Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo del material vegetal obtenido de plantas completas y cultivos *in vitro* se llevó a cabo en el Taller de Química de la FC en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N, como se describe en la sección anterior, pero registrando los compuestos mediante un detector de ionización de flama (FID) (temperatura 300°C) en vez de un detector de masas. Los extractos alcaloideos se disolvieron en cloroformo (grado GC) a una concentración de 5 mg/ml y se inyectó manualmente 1 µl de dichas disoluciones. Los picos de ibogaína y voacangina se identificaron por comparación de sus tiempos de retención (RT, por sus siglas en inglés) contra los dos estándares químicos utilizando el método del estándar externo. Para el cálculo de las cantidades de ambos MIAs en los extractos alcaloideos, se construyeron curvas de calibración de ibogaína y voacangina por triplicado con base en cinco concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ml). Se obtuvieron las siguientes fórmulas mediante el ajuste lineal de cada curva:

- *Ibogaína*: $y = 2.10589212 * x + 6.4092646$ ($r = 0.99442$)
- *Voacangina*: $y = 2.96426246 * x + 4.0736397$ ($r = 0.99525$)

4.8. Análisis estadístico

Los datos derivados de los ensayos de elicitación abiótica y biótica respecto de los pesos frescos y secos de las células en suspensión, así como los rendimientos de los extractos hexánicos, metanólicos y alcaloideos obtenidos, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, comparando cada tratamiento con el grupo control respectivo. Para tales fines se utilizó el programa SigmaStat 3.5 para Windows.

V. RESULTADOS

5.1. Germinación *in vivo*

La germinación de las semillas de *T. alba* presentó varios problemas. Frecuentemente mostraron signos de contaminación bacteriana y/o fúngica a los pocos días posteriores a su siembra y la rápida pérdida de viabilidad fue un fenómeno recurrente. De un total de 40 semillas recientemente recolectadas, solamente se logró la germinación de cinco, dando una tasa de 12.5%. En estos casos, la radícula empezó a emerger tres a cuatro semanas después de iniciar los ensayos correspondientes. Previamente se había intentado germinar 30 semillas mantenidas durante dos años en refrigeración sin éxito alguno.

5.2. Inducción de callo *in vitro*

En general y con excepción de las semillas, todos los tipos de explantes desarrollaron callos en todas las condiciones experimentales probadas entre el primer y el cuarto subcultivo, conservándose esta capacidad por al menos dos años. No obstante, se observaron diferencias tanto cualitativas como cuantitativas al respecto que se mencionan a continuación.

A) Reguladores de crecimiento

La adición de 2,4-D y kinetina al medio mostró ser considerablemente más eficaz en inducir la formación de callo en los explantes que la combinación de ANA y BA, como ilustra la Figura 4: En el primer caso, se observa callo abundante (Figura 4a), característico de los tratamientos expuestos a dichos reguladores de crecimiento, mientras que en el segundo caso, el máximo grado de formación de callo que se registró en los ensayos de cultivo *in vitro* consiste de pequeños agregados blancos sobre el envés del explante foliar (Figura 4b).

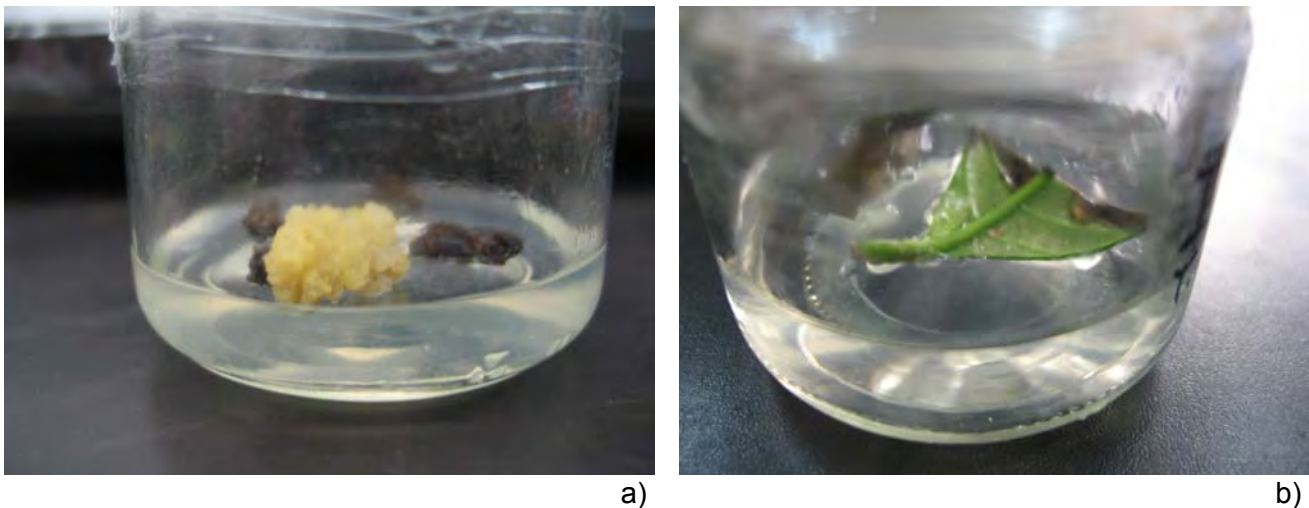


Figura 4. Callo inducido en explantes foliares expuestos a medio MS con los reguladores de crecimiento: a) 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente); b) ANA y BA (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente).

B) Tipos de explante

El tipo de explante más eficiente para desarrollar callo rápidamente fue el foliar, sobre todo exponiéndolo al medio por el haz, siendo las áreas más susceptibles los peciolos, las nervaduras principales y secundarias, el borde y zonas laminares con pequeñas heridas. Los explantes apicales, de nudo y de tallo también desarrollaron callo. En el caso de los explantes radicales solamente se logró inducir callo en segmentos obtenidos de plantas jóvenes con uno o dos pares de hojas, derivadas de embriones somáticos producidos *in vitro* (véase sección F, Embriogénesis somática), pero no en explantes tomados de las plantas en invernadero.

De hecho, la mayoría de los explantes radicales obtenidos de las plantas en invernadero se tuvieron que desechar debido a contaminación bacteriana y/o fúngica recurrente aun después de repetidos

ciclos de desinfección, así como la inclusión de antibióticos y/o antimicóticos al medio a lo largo de varios subcultivos. Como este problema fue ausente en segmentos de raíz obtenidos de plantas jóvenes de origen *in vitro*, sumado a la susceptibilidad significativamente mayor de formar callo en dichos individuos, se decidió concentrar los esfuerzos de obtener callo de procedencia radical únicamente en este tipo de explantes de raíz, descartando sus homólogos derivados de plantas cultivadas bajo condiciones de invernadero.

Respecto de las semillas, no resultaron ser buenas fuentes de callo, mostrando niveles de contaminación sistémica aun superiores a los registrados en los explantes radicales y una susceptibilidad a desarrollar callo aparentemente nula.

En el caso de los explantes foliares, apicales, de nudo y de tallo los segmentos tomados de plantas cultivadas *in vitro* o bajo condiciones de invernadero formaron callo con similar facilidad y rapidez, sin embargo, los últimos con la ventaja de que debido a su naturaleza axénica, no requirieron de ningún proceso de desinfección ni de la adición de antibióticos y/o antimicóticos al medio, además de no registrar pérdidas de repeticiones contaminadas, produciendo callo en virtualmente el 100% de los casos.

Una vez inducido, aislado y establecido el callo, las diferencias cualitativas se manifestaron mucho más a nivel de lote que de tipo de explante o de planta donadora. En congruencia con lo anterior, la Figura 5 muestra las semejanzas cualitativas entre callo derivado de explantes de hoja y de tallo.

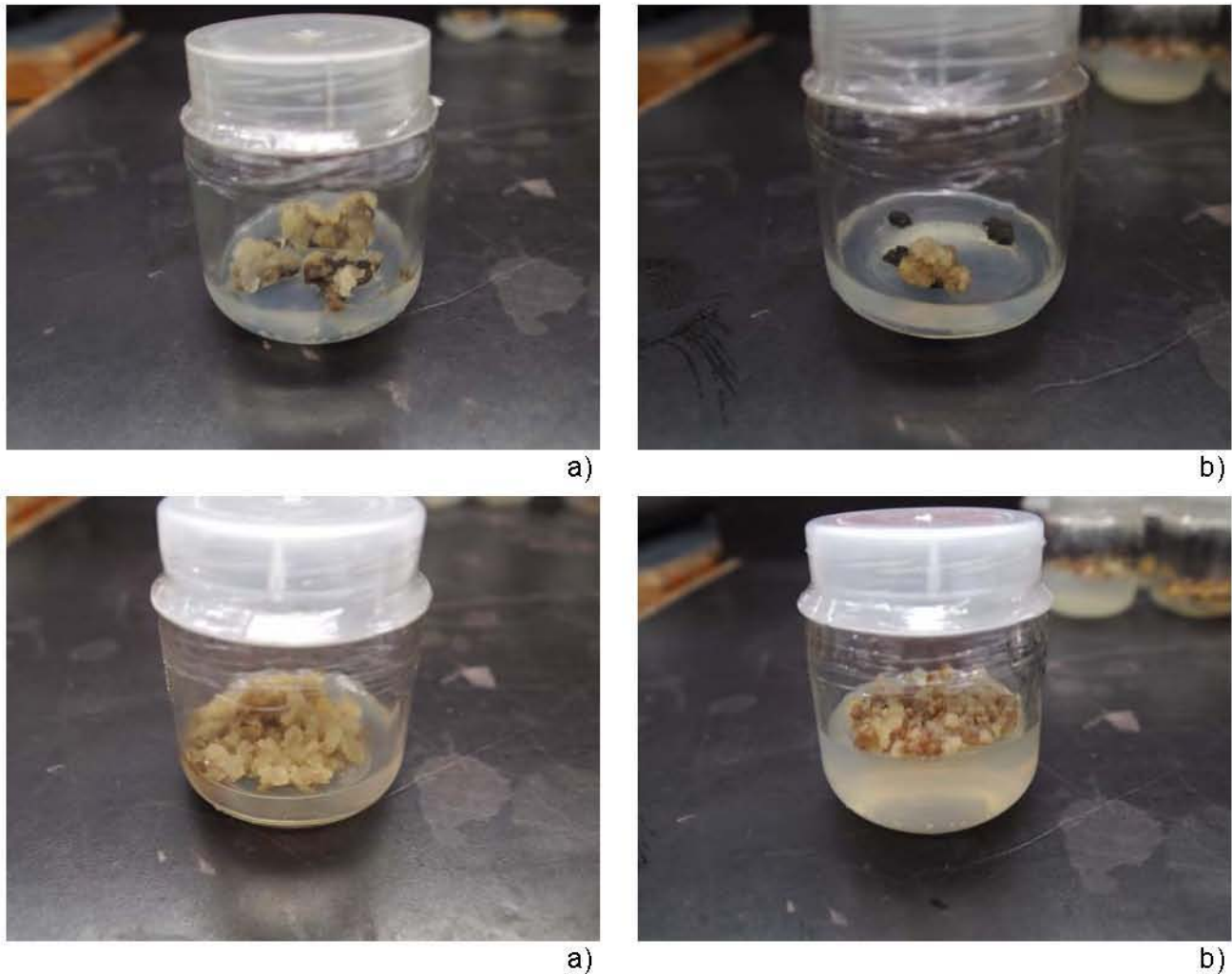


Figura 5. Callo originado de explantes: a) foliares; b) de tallo.

C) Condiciones de fotoperiodo

En lo que concierne a las condiciones de fotoperiodo, no se pudo establecer con certeza si era preferible la exposición de los explantes y cultivos de callos a 16 h de luz u oscuridad continua. Aparentemente, la diversidad de callo fue ligeramente mayor en los cultivos expuestos al fotoperiodo, pero los tipos de callo más deseables (con base en su naturaleza disgregable, su tasa de proliferación y su limitada susceptibilidad a la oxidación y la hidratación excesiva) se registraron tanto en presencia como ausencia de luz. Cabe destacar que la aparición de tonos verdosos en los callos

solamente se observó en los cultivos expuestos al fotoperiodo.

También se hizo evidente que los explantes en condiciones de 16 h de luz tendieron a producir primero callos compactos que a su vez dieron lugar a callos disgregables, mientras que los cultivos en oscuridad formaron directamente callos del último tipo en la mayoría de las veces. No obstante, a mediano plazo surgieron los mismos tipos deseables de callo en ambas condiciones (Figura 6), presentándose desarrollos positivos y negativos imposibles de predecir a lo largo de los subcultivos dependiendo del cultivo en cuestión. Incluso, la calidad y cantidad de callo de algunas repeticiones se afectaron favorable o desfavorablemente al cambiarlas a la condición de fotoperiodo opuesta. En síntesis, se propuso mantener en cualquier momento un número de repeticiones semejante de cultivos expuestos a un fotoperiodo y a oscuridad continua con el fin de garantizar la mayor diversidad y cantidad de callos.

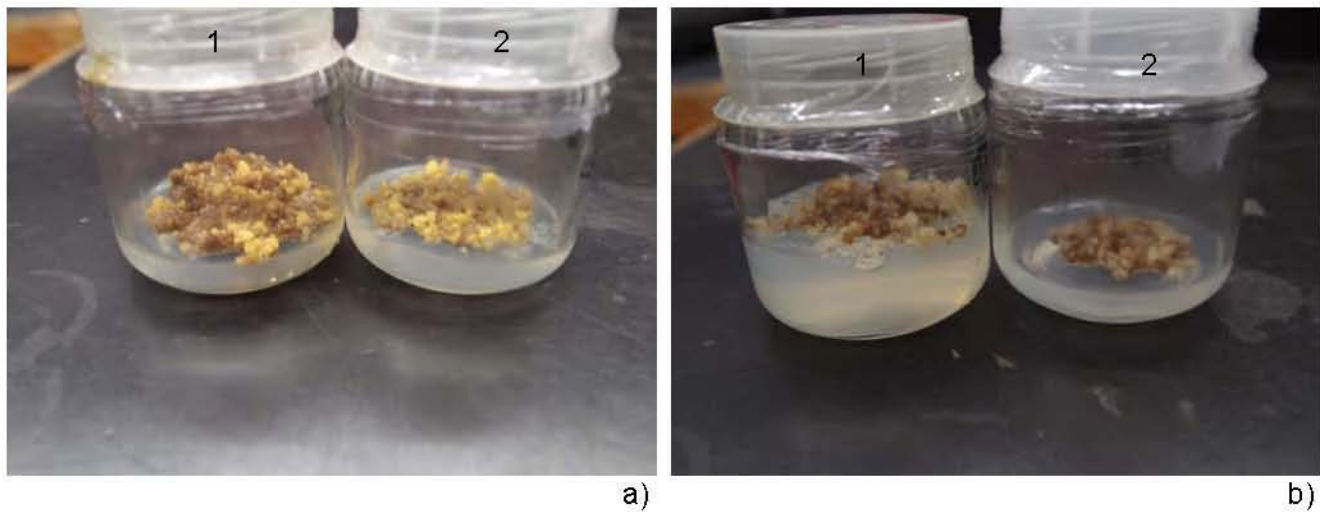


Figura 6. Callo de origen: a) foliar; b) de tallo expuesto a un fotoperiodo de 16/8 h (1) u oscuridad continua (2).

D) Control de la contaminación sistémica

El riego de las plantas cultivadas en condiciones de invernadero con agroquímicos en combinación con la desinfección de los explantes con los antimicrobianos mencionados y la inclusión de los últimos a los medios nutritivos permitieron controlar la contaminación de los cultivos *in vitro* obtenidos a partir de explantes no axénicos de hoja, ápice, nudo y tallos.

E) Control de la oxidación

La oxidación de los explantes y los callos fue frecuente, sobre todo después de varios subcultivos. El uso de los ácidos cítrico y ascórbico como agentes antioxidantes adicionados a los medios nutritivos hizo posible controlar este proceso de manera satisfactoria, mas no lo pudo eliminar por completo. Sin embargo, aun explantes y callos oxidados (representados por un color café oscuro o negro) pudieron formar cantidades abundantes de callo con características deseables, así como embriones somáticos perfectamente viables (Figura 7).

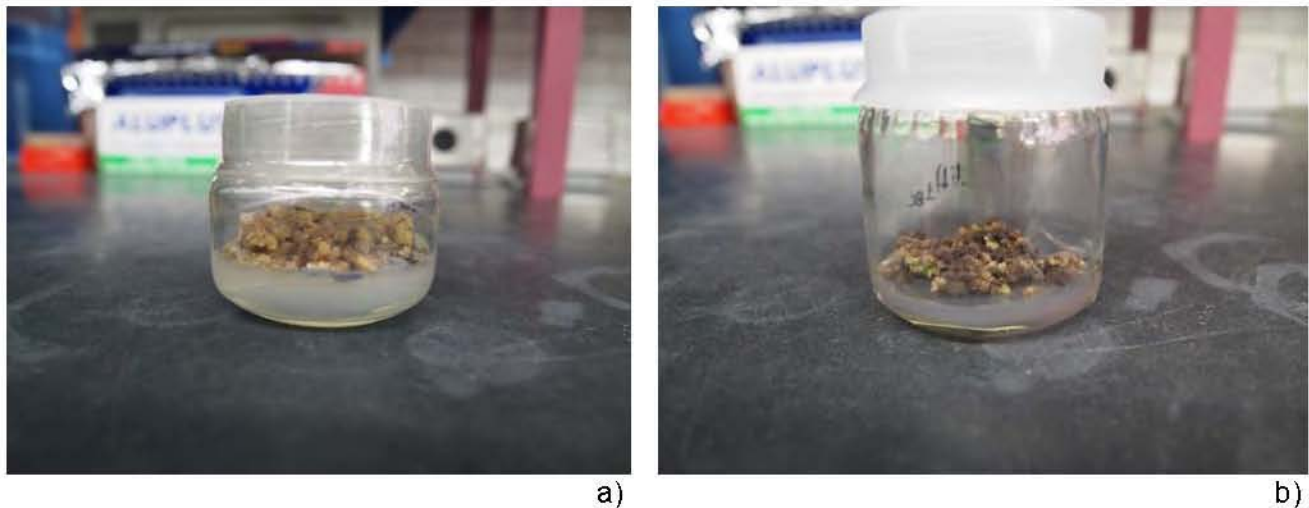


Figura 7. Callos y embriones somáticos viables creciendo sobre: a) explantes foliares oxidados; b) callo oxidado.

F) Embriogénesis somática

La formación de embriones somáticos a partir de callo de origen foliar se observó después de varios subcultivos. Esta respuesta no fue consistente, ya que la presencia de embriones ocurrió exclusivamente en algunas repeticiones de tres lotes derivados de la misma planta donadora en presencia de 2,4-D. Morfológicamente no se notaron diferencias entre plántulas derivadas de embriones surgidos en presencia o ausencia de luz, sin embargo, en el primer caso las plántulas mostraron un color verde y en el segundo fueron blancas. Al exponer las plántulas incoloras a un fotoperiodo, fueron capaces de sintetizar rápidamente clorofila y se volvieron verdes. La transferencia de embriones y plántulas a medio basal MS sin reguladores de crecimiento dio lugar a una gran cantidad de plantas completas de las cuales una parte se utilizó para la obtención de explantes axénicos. Otra parte se logró establecer en suelo esterilizado y se aclimatizó a condiciones no asépticas de invernadero. En la Figura 8 se pueden observar las distintas fases del proceso.



a)



b)



c)



d)

Figura 8. Diferentes fases de la obtención de plantas completas mediante embriogénesis somática: a) explantes foliares con callo embriogénico; b) callo con embriones somáticos y plántulas; c) planta completa en medio MS; d) planta completa aclimatizada en suelo.

5.3. Establecimiento y proliferación de cultivos de células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión se iniciaron de los cuatro lotes de cultivos de callos más prolíferos (LAH1, LCH1, LFH1 y L-OCH1), todos originados a partir de las hojas de la misma planta donadora. Las curvas de cinética de crecimiento señalaron la ausencia de una fase lag en LAH1, LCH1 y LFH1, iniciando desde el primer día la fase exponencial. La transición a la fase estacionaria ocurrió entre los días 7 (LFH1) y 9 (LAH1 y LCH1). El lote L-OCH1 presentó una fase lag durante los primeros cuatro días, seguida por la fase exponencial, la cual duró tres días, y una fase estacionaria de dos días. Posteriormente, se inició otro ciclo celular (Figuras 9 a 12).

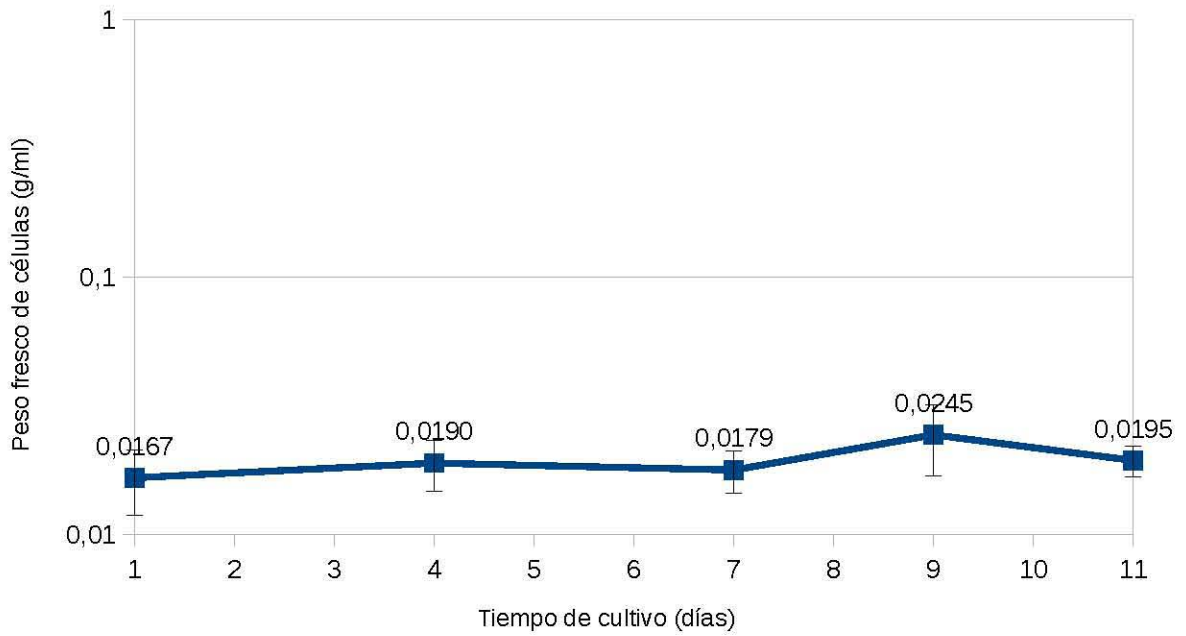


Figura 9. Curva de cinética de crecimiento de LAH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

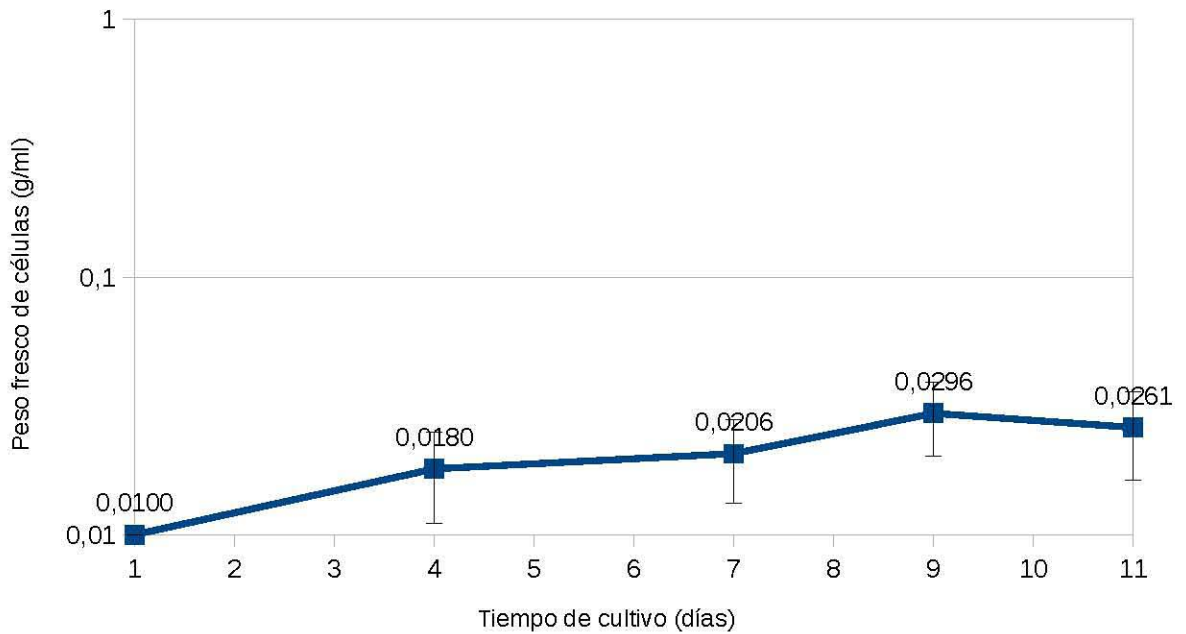


Figura 10. Curva de cinética de crecimiento de LCH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

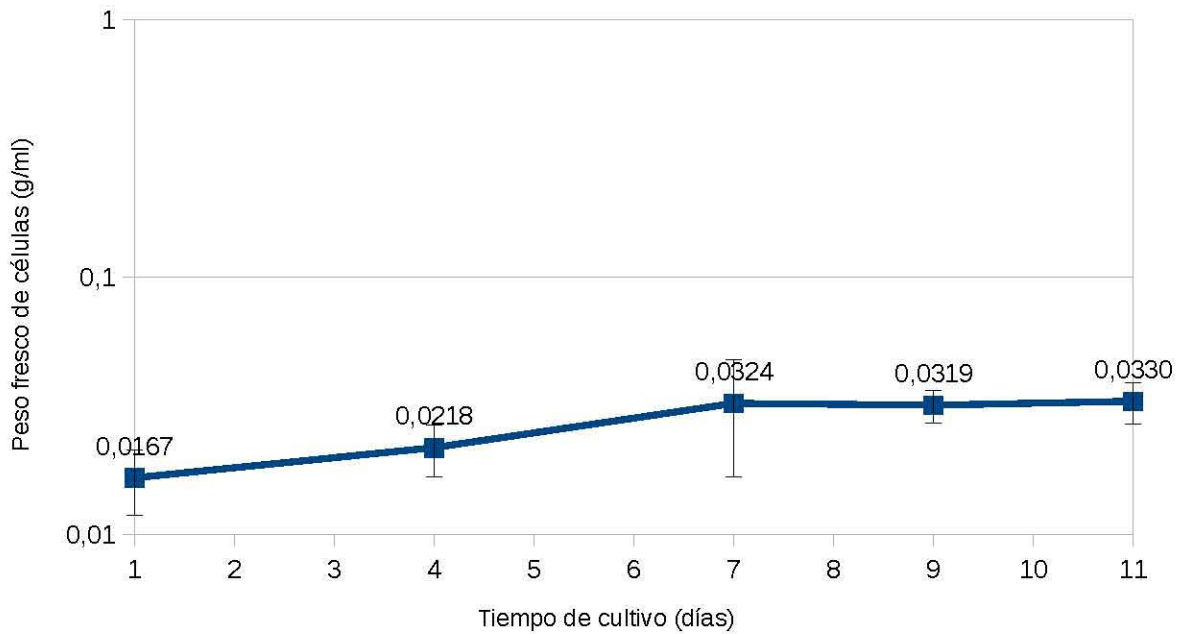


Figura 11. Curva de cinética de crecimiento de LFH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

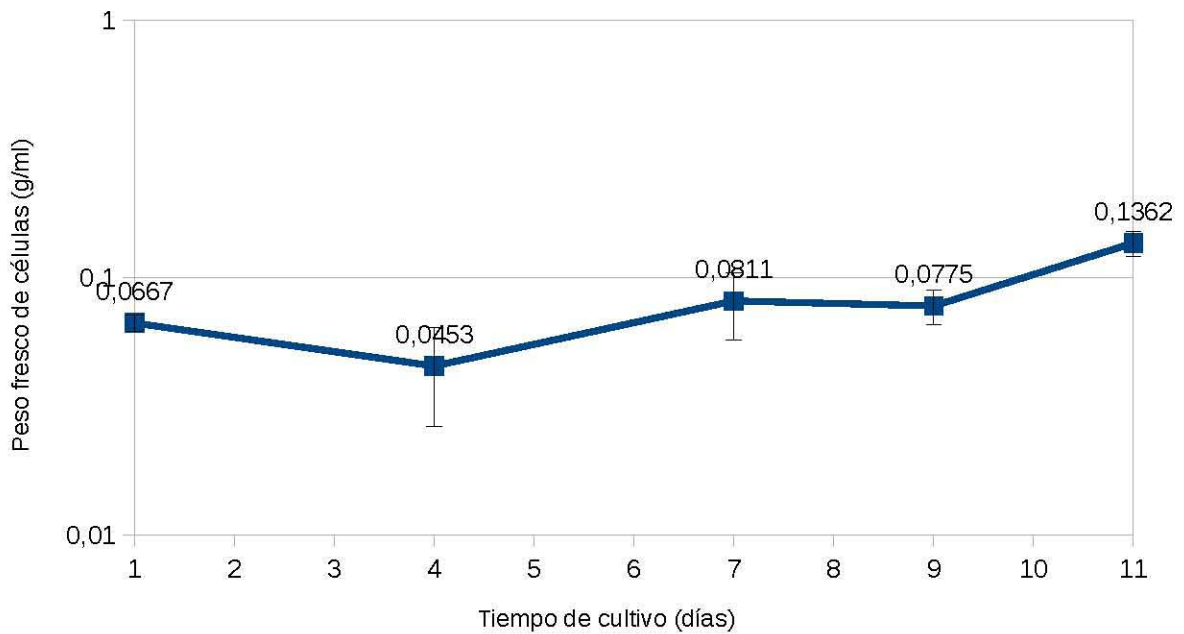


Figura 12. Curva de cinética de crecimiento de L-OCH1 en escala semilogarítmica (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

Todos los lotes incrementaron su masa celular en menor o mayor grado. El lote que mostró la mayor tasa de formación de callo en medio sólido, LAH1, resultó ser el menos prolífero en medio líquido, mostrando también LCH1 y LFH1 tasas de crecimiento relativamente bajas. El lote L-OCH1, en cambio, presentó una proliferación rápida y vigorosa, y por lo tanto, fue elegido para los ensayos de elicitación (Figura 13).

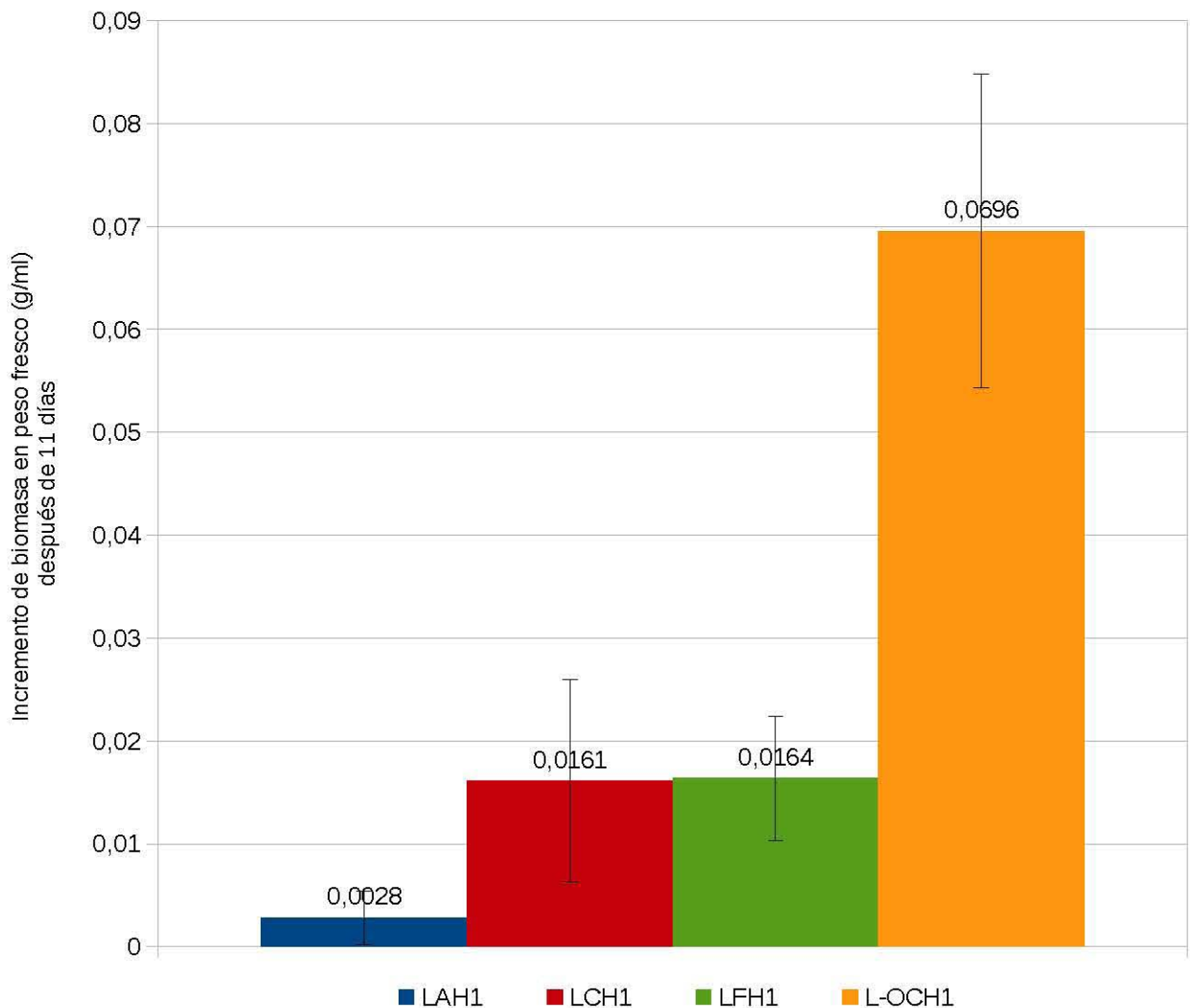


Figura 13. Ganancia de biomasa (g/ml) en L-OCH1, LAH1, LCH1 y LFH1 después de 11 días de iniciados los cultivos (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

Como en el caso de la inducción y proliferación de callo en medio sólido, los reguladores de crecimiento más eficientes en proliferar las células en suspensión fueron 2,4-D y kinetina, produciendo, en términos totales, más biomasa que los cultivos expuestos a ANA, AIA, AIB y BA. No obstante, lo anterior se manifestó sobre todo a nivel de peso fresco. El peso seco fue muy semejante en ambos casos, y la relación entre peso seco y peso fresco consecuentemente más elevada en las células cultivadas en medio nutritivo sin 2,4-D (Figura 14).

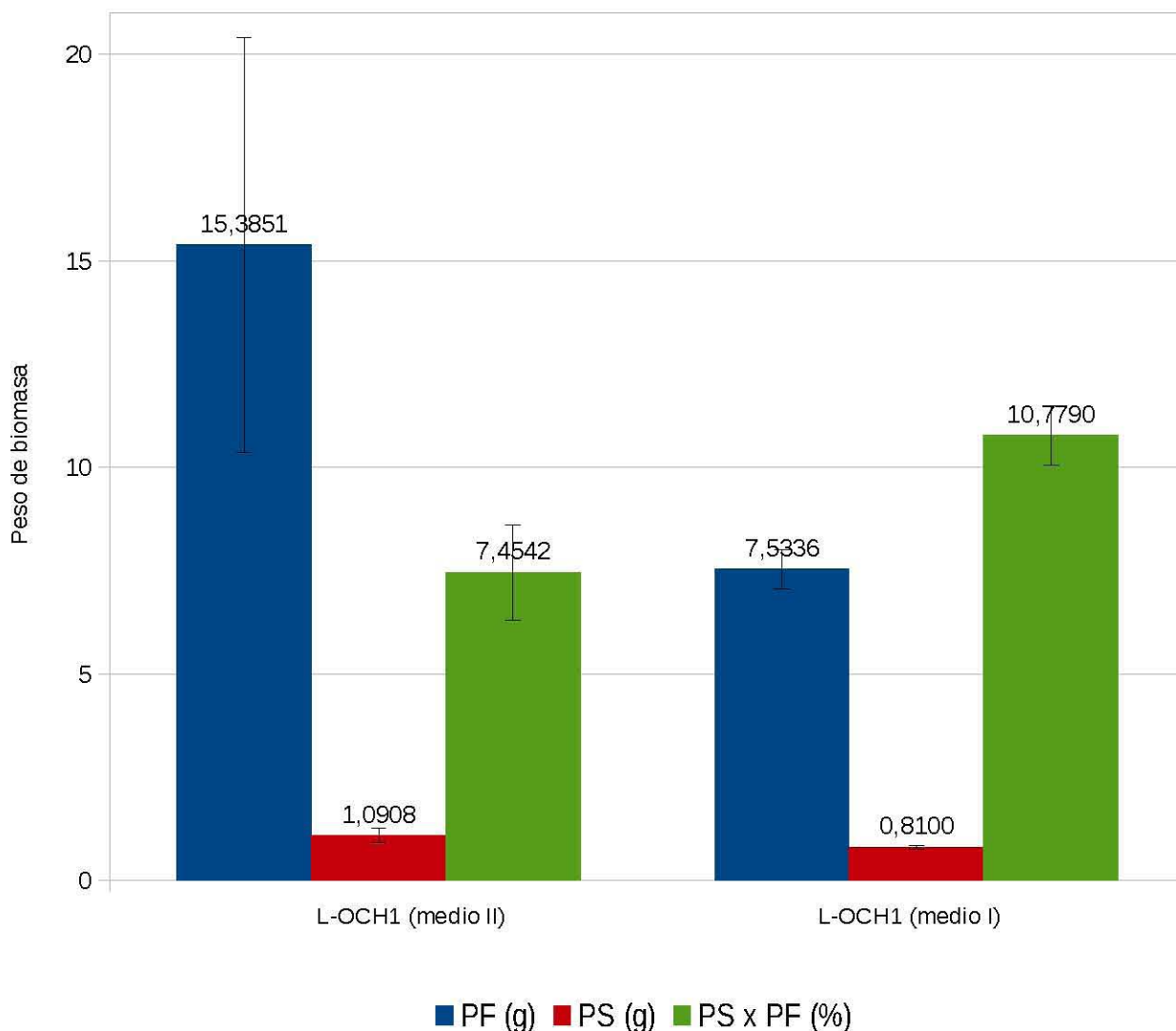


Figura 14. Pesos frescos (PF) y secos (PS) de células en suspensión de L-OCH1 cultivadas en medio MS con los reguladores de crecimiento 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente) (medio II) o ANA, AIA, AIB y BA (1 mg, 1 mg, 1 mg y 0.2 mg/l, respectivamente) (medio I) (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

Los últimos cultivos produjeron considerablemente más agregados celulares de aproximadamente 1 mm de diámetro que los cultivos en medio con 2,4-D y kinetina donde las células estuvieron presentes en forma suelta o en acumulaciones más finas (nótese los fondos de los matraces y los grosores de los halos de crecimiento de ambos tratamientos en la Figura 15).



a)



b)

Figura 15. Cultivos de células en suspensión de L-OCH1 en medio MS con los reguladores de crecimiento: a) 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente); b) ANA, AIA, AIB y BA (1 mg, 1 mg, 1 mg y 0.2 mg/l, respectivamente).

5.4. Elicitación biótica y abiótica de los cultivos de células en suspensión

A) Elicitación abiótica

Los pesos de las células del grupo control y de los tres tratamientos elicitados con MeJA, así como los rendimientos de los extractos orgánicos obtenidos se resumen en las Figuras 16, 17 y 18, respectivamente.

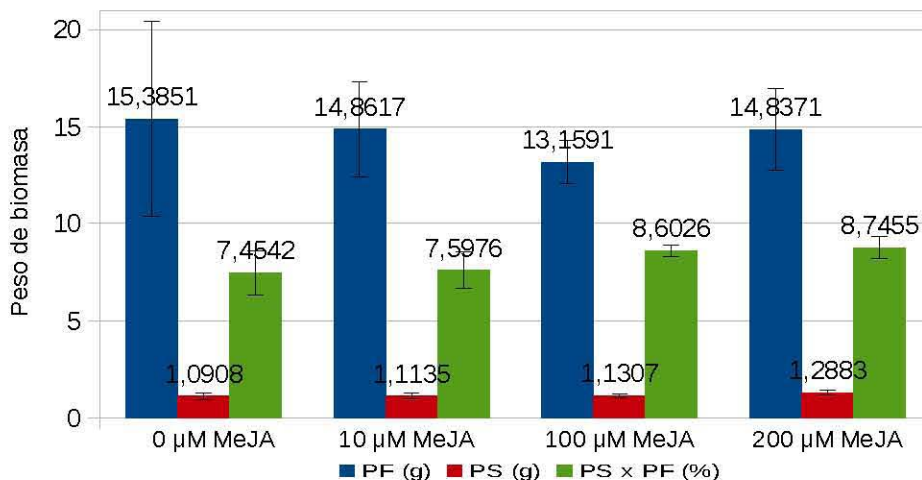


Figura 16. Pesos frescos (PF) y secos (PS) de células elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

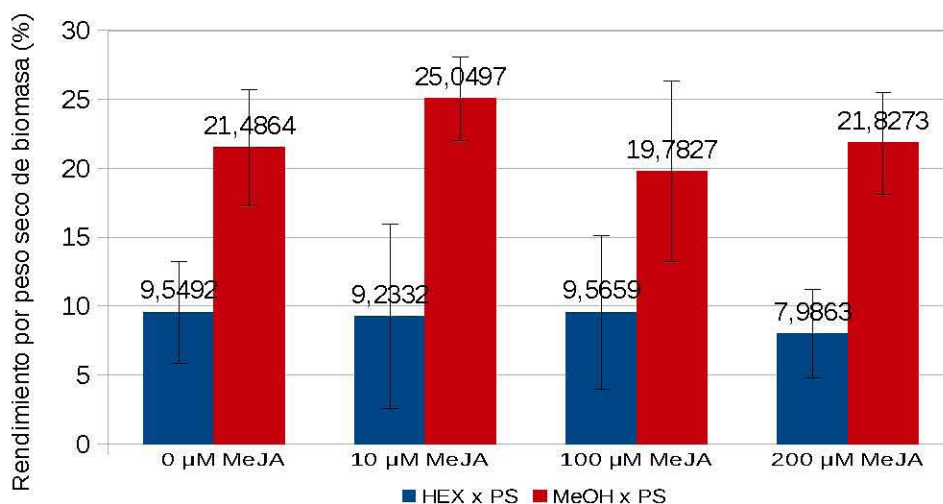


Figura 17. Rendimientos de extractos hexánicos (HEX) y metanólicos (MeOH) por peso seco (PS) de biomasa de células elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

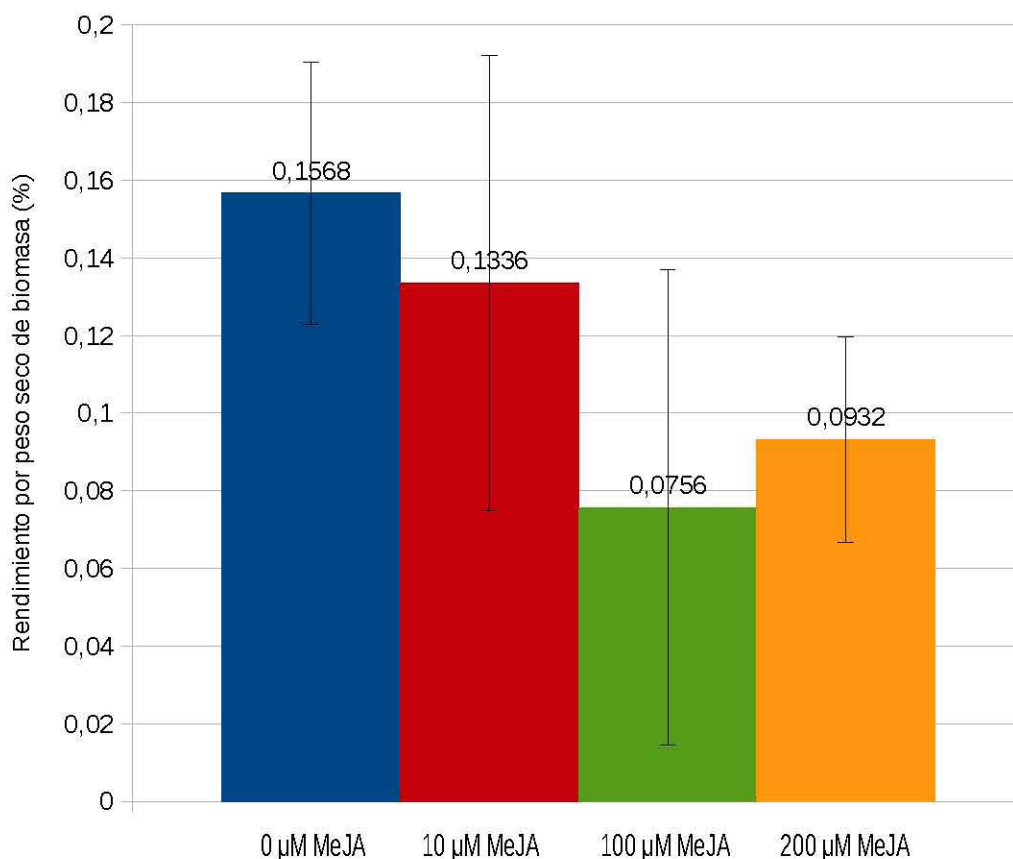


Figura 18. Rendimientos de extractos alcaloideos por peso seco de biomasa de células elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

Los análisis estadísticos no indicaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, sin embargo, se observaron las siguientes tendencias:

- El peso fresco disminuyó a una concentración de 100 μM MeJA.
- El peso seco por peso fresco fue directamente proporcional a la concentración de MeJA aplicada.
- El rendimiento de los extractos hexánicos por peso seco se redujo a una concentración de 200 μM de MeJA.
- El rendimiento de los extractos metanólicos por peso seco aumentó a una concentración de 10 μM de MeJA.
- El rendimiento de los extractos alcaloideos por peso seco fue inversamente proporcional a la concentración de MeJA aplicada.

B) Elicitación biótica

Los hongos aislados para la elicitación biótica aparecieron por primera vez en explantes foliares y radicales debidamente desinfectados y que no habían presentado signos de contaminación durante varios subcultivos, por lo que dichos microorganismos se consideraron endófitos de *T. alba*. La comparación de las secuencias de rDNA obtenidas con la base de datos de BLAST sugirió que la especie encontrada en explantes de hoja era *Penicillium adametzioides*, y uno de los hongos de origen radical *Fusarium oxysporum* (véase Cuadro 3). La tercera especie no se pudo identificar debido a la baja calidad de amplificación y secuenciación de las respectivas regiones ITS. Cabe destacar que para confirmar las identidades de *P. adametzioides* y *F. oxysporum* con toda seguridad, sería necesario secuenciar al menos una región genómica más de cada organismo. Sin dichas pruebas adicionales, solamente fue posible identificar las dos cepas de hongos de manera inequívoca a nivel de género.

Fusarium sp. se escogió como elicitador biótico por el amplio registro documentado del género en este aspecto, específicamente para estimular la biosíntesis de metabolitos secundarios en especies vegetales produciendo MIAs, como *Catharanthus roseus* y *T. catharinensis* (Namdeo *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Identificación taxonómica de las cepas de hongos endófitos con base en BLAST (NCBI).

Cepa	Especie	Región	E	Identidad (%)
HE1A	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	ITS	0.0	99
HE3A	<i>Penicillium adametzioides</i>	ITS	0.0	99

Las Figuras 19 y 20 muestran los rendimientos de los extractos orgánicos registrados para el control y los tres tratamientos. Los pesos frescos y secos no se consideraron, ya que no se pudo establecer con seguridad en qué grado las diferencias observadas fueron atribuibles exclusivamente a las células en suspensión o al micelio agregado. Tomando en cuenta las cantidades de material fúngico añadidas a los cultivos, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control referente a los rendimientos de los extractos orgánicos. La única tendencia evidente fue un incremento del rendimiento de los extractos metanólicos al aumentar la concentración de MeJA aplicada. Sin embargo, no se pudo aclarar si dicha tendencia se debía el efecto del elicitador biótico sobre las células en suspensión o a la extracción adicional de compuestos polares contenidos en el micelio añadido.

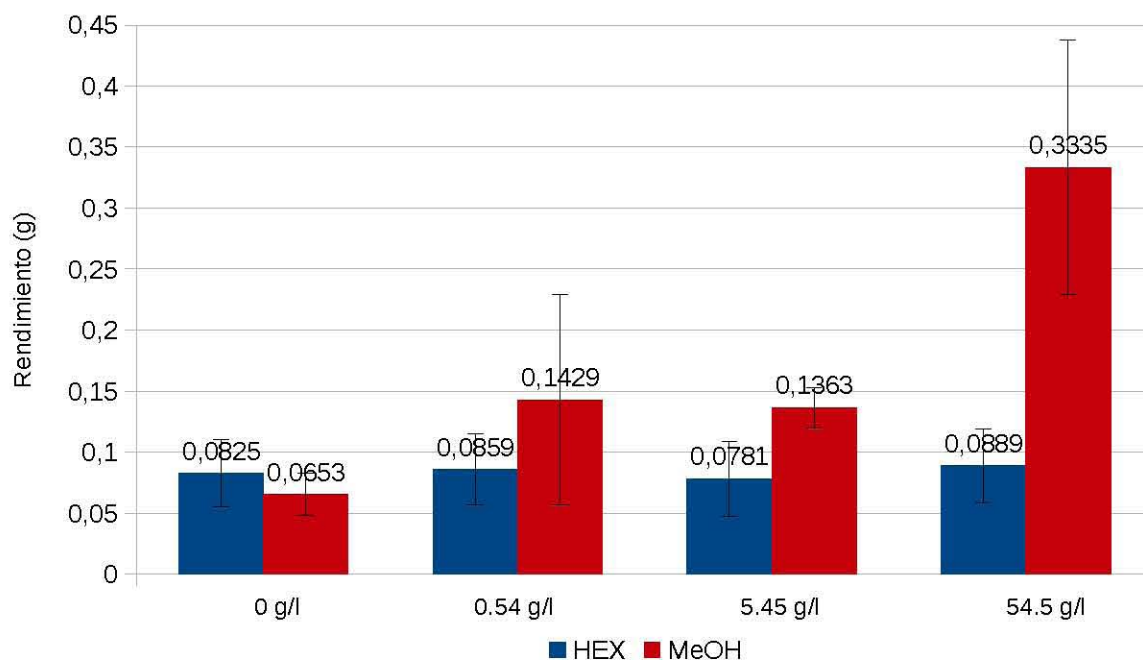


Figura 19. Rendimientos de extractos hexánicos (HEX) y metanólicos (MeOH) de células elicidadas con diferentes cantidades de micelio de *Fusarium* sp. (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

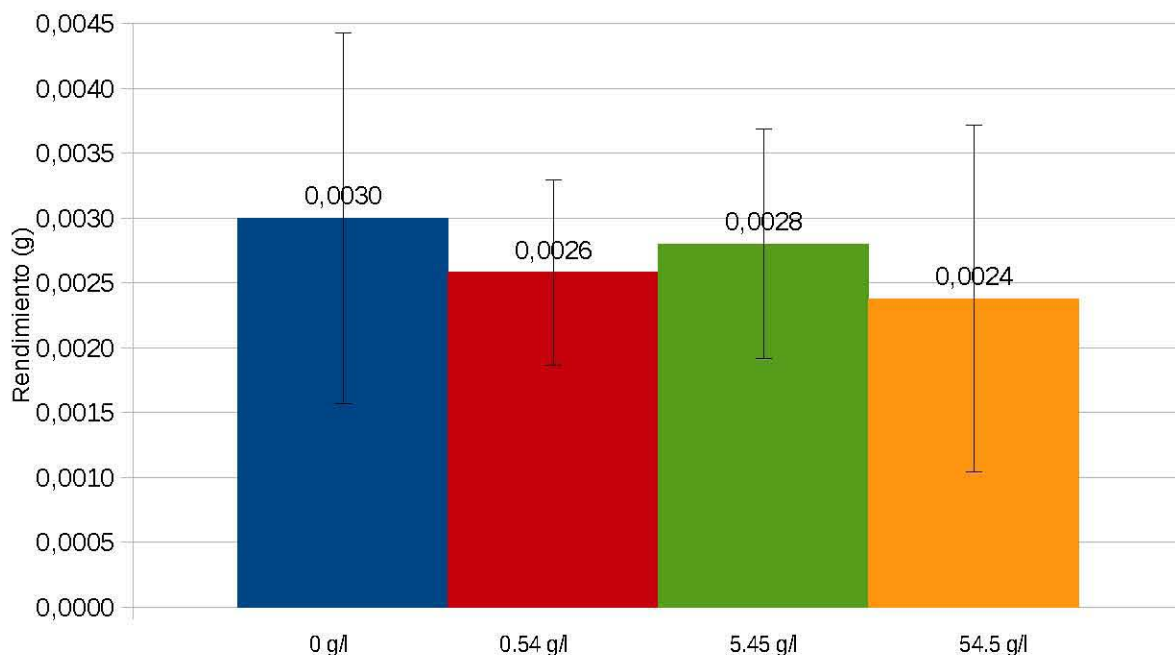


Figura 20. Rendimientos de extractos alcaloideos de células elicidadas con diferentes cantidades de micelio de *Fusarium* sp. (cada punto representa el promedio de cinco valores; barras verticales indican desviación estándar).

5.5. Análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos alcaloideos

A) Análisis cualitativo

El análisis de GC-MS de 12 extractos alcaloideos de diferentes órganos de *T. alba* logró la identificación parcial de las sustancias presentes: de un total de al menos 50 compuestos detectados (7 a 17 compuestos por extracto), se identificaron tentativamente 8 con base en la biblioteca de espectros de masa NIST e información derivada de una revisión de la literatura científica, todos perteneciendo al grupo de los MIAs, salvo un alcaloide indólico simple (N,N-dimetiltriptamina). Los dos estándares químicos utilizados, ibogaína y voacangina, se detectaron en todos los extractos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Alcaloides identificados en los extractos alcaloideos de diferentes órganos de *T. alba* mediante GC-MS.

Sustancia	M+	Pico base	Identificación	Extracto
10-hidroxicoronaridina	354	136 o 354	Zocoler <i>et al.</i> , 2005	T1, T9
Aparicina	264	264	NIST	T1, T3, T5, T9, T11
Coronaridina	338	338	van Beek <i>et al.</i> , 1985	T5, T7, T9, T11
Ibogaína	310	136	Estándar, NIST	T1, T5, T7, T9, T11
Ibogamina	280	136	NIST	T5, T7, T9, T11
N,N-dimetiltriptamina	188	58	NIST	T3
Voacangina	368	136 o 368	Estándar, NIST	T1, T3, T5, T7, T9, T11
Vobasina	352	180	NIST	T11

T1 = hojas; T3 = ramas; T5 = corteza de tronco; T7 = semillas; T9 = frutos; T11 = corteza de raíz

Las Figuras 21, 22 y 23 dan ejemplos representativos de los cromatogramas y espectros de masa obtenidos en los análisis GC-MS de los extractos alcaloideos, así como ibogaína y voacangina puras.

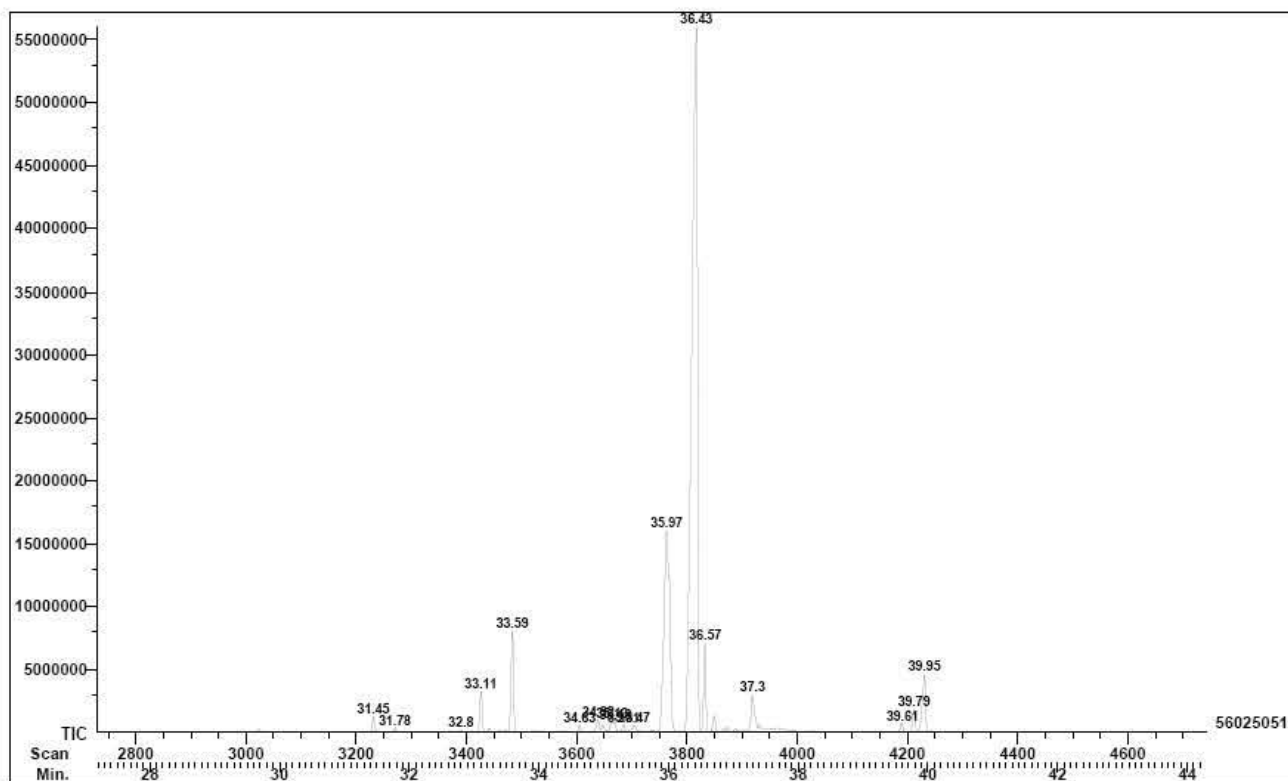


Figura 21. Cromatograma obtenido del extracto alcaloideo de la corteza de tronco de *T. alba* (RT 35.97 min = ibogaína, RT 36.43 min = voacangina).

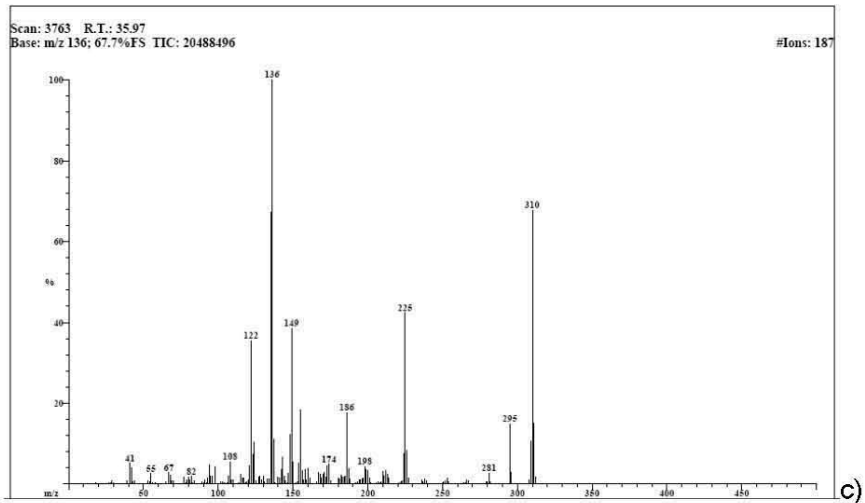
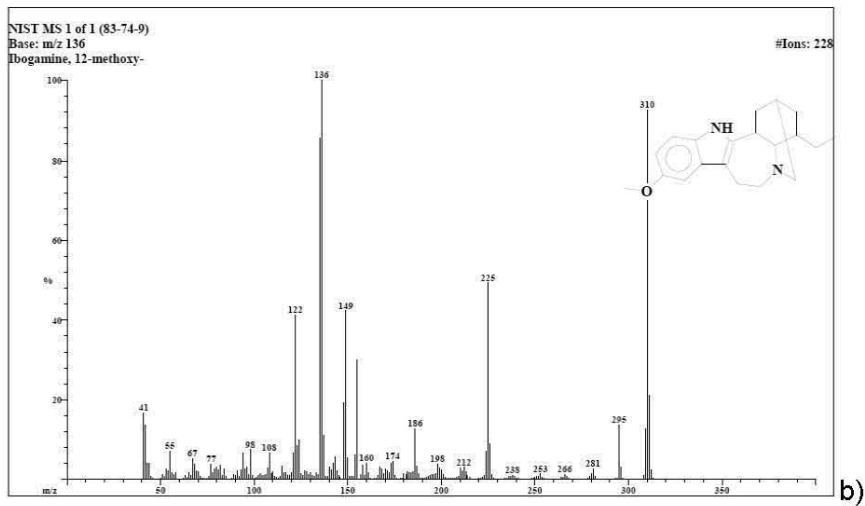
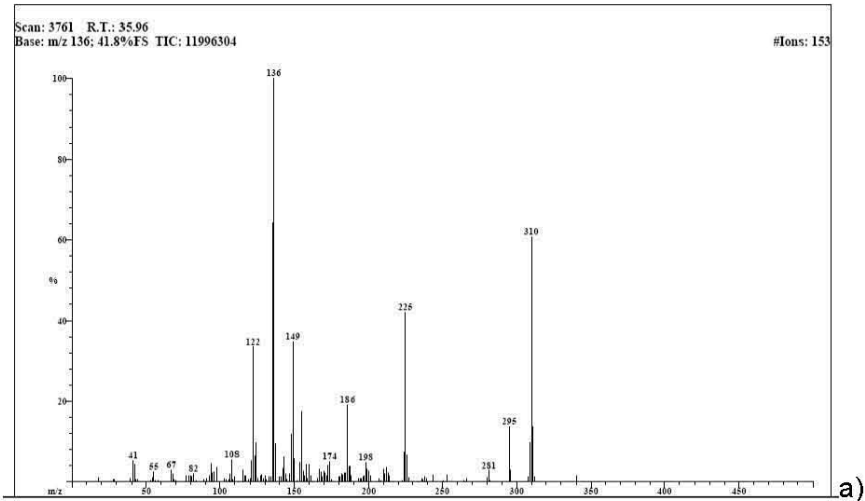


Figura 22. Espectros de masas de ibogaína: a) contenida en el extracto alcaloideo de la corteza de tronco de *T. alba*; b) referencia de NIST; c) estándar químico.

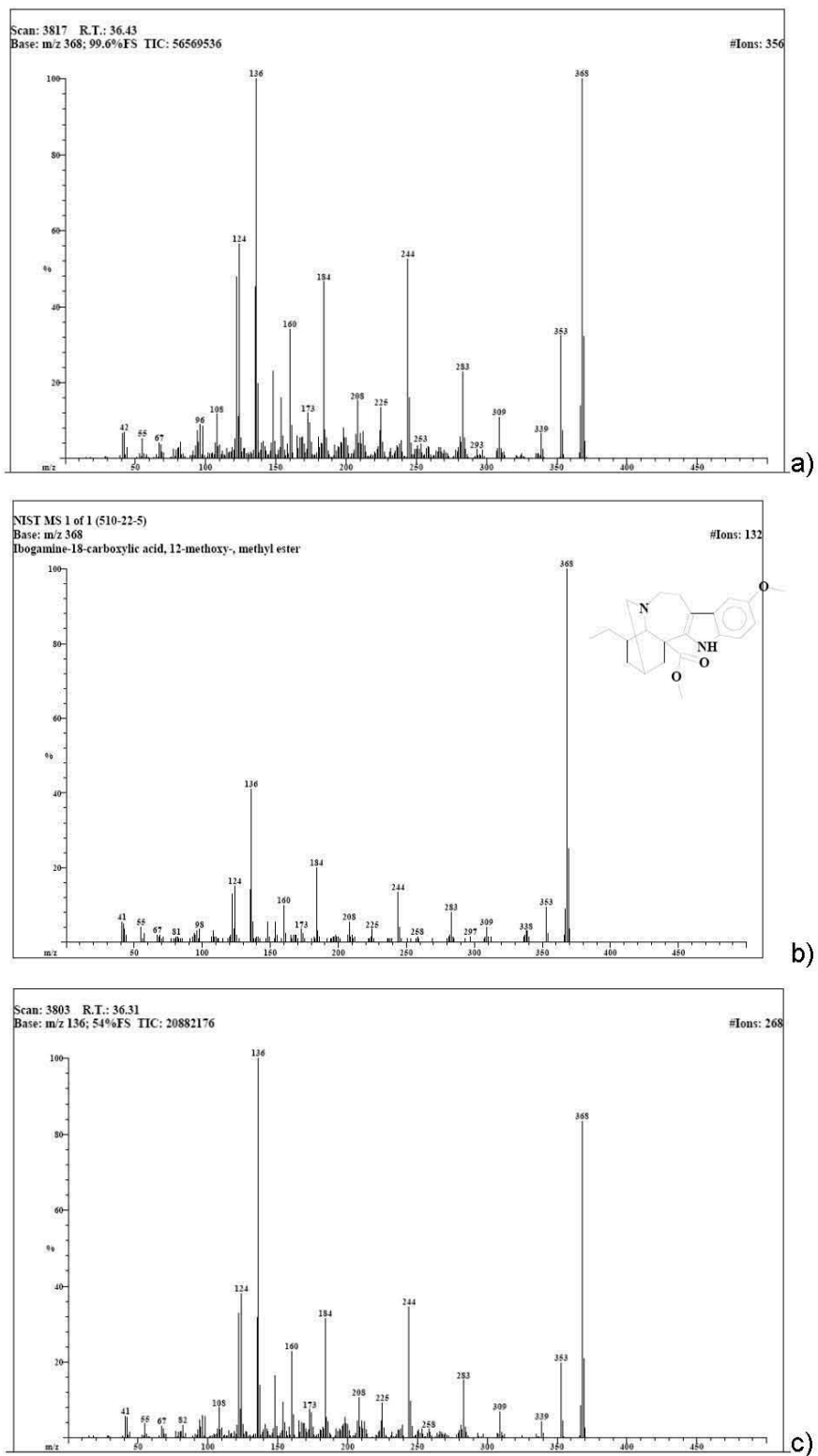


Figura 23. Espectros de masas de voacangina: a) contenida en el extracto alcaloideo de la corteza de tronco de *T. alba*; b) referencia de NIST; c) estándar químico.

B) Análisis cuantitativo

Después de confirmar de manera general la presencia de ibogaína y voacangina en *T. alba*, se procedió a cuantificar dichos compuestos en todos los extractos alcaloideos obtenidos, tanto del material vegetal recolectado en campo y de plantas cultivadas en invernadero, como de los cultivos de callo y de células en suspensión. Como este análisis se llevó a cabo por GC-FID, los dos MIAs no se identificaron con base en la comparación de espectros de masa, sino de los RTs de estándares químicos externos. La Figura 24 muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos.

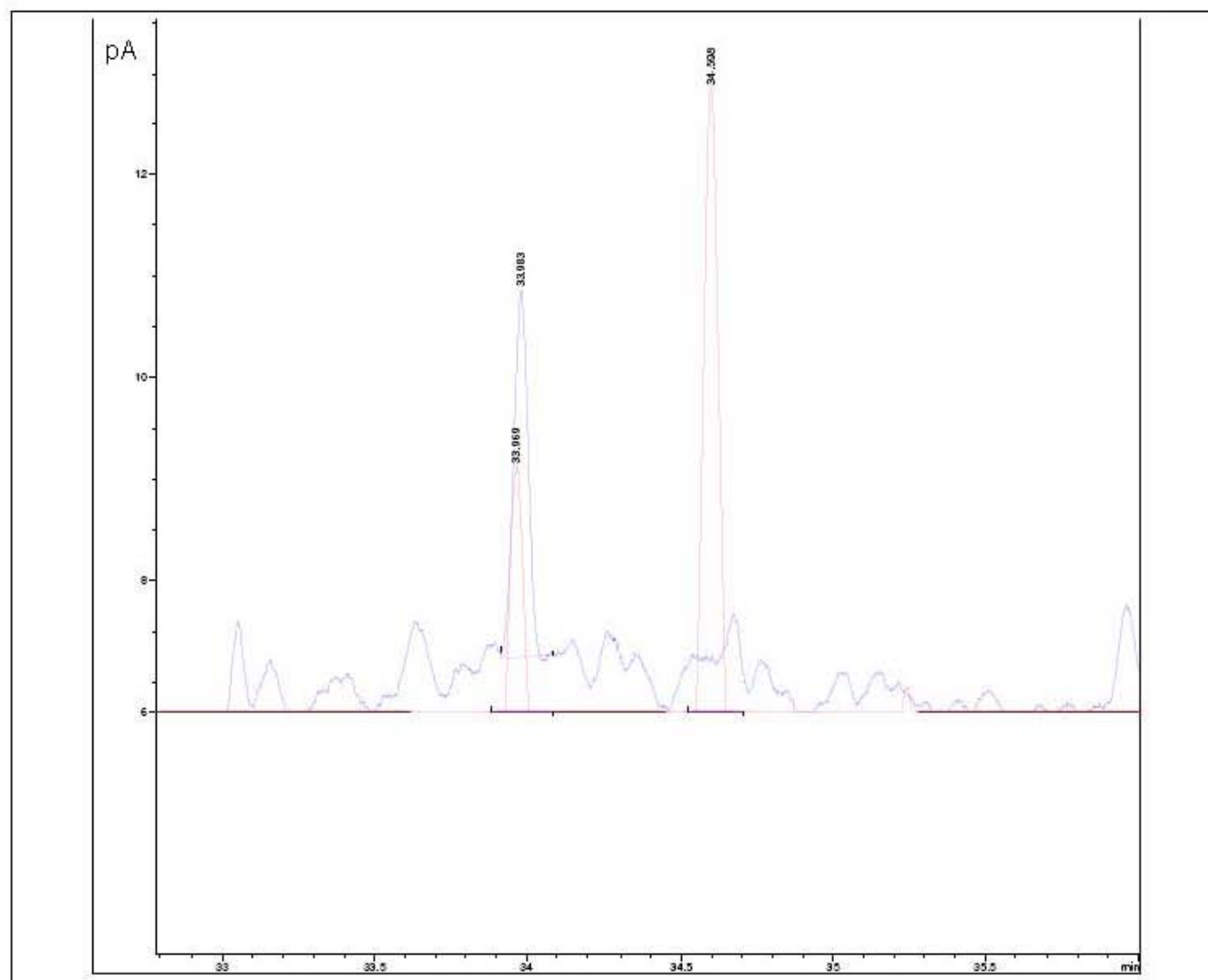


Figura 24. Detalle del cromatograma obtenido del extracto alcaloideo del callo del lote OATN3 (inyectado a una concentración de 5 mg/ml) con picos de ibogaína y voacangina químicamente puras (estándares externos, en rojo; cada uno inyectado a una concentración de 0.08 mg/ml).

Ibogaína y voacangina se registraron en todas las muestras de órganos de plantas completas (Cuadro 5) y varias muestras de los cultivos de callo y de células en suspensión *stock* (Cuadro 6). Es decir, en las primeras la producción de MIAs fue constante y en la últimas ocasional. En general, ocurrieron en mayores concentraciones en plantas completas que en cultivos *in vitro*, no obstante, en términos relativos, considerando únicamente el área de los MIAs en los cromatogramas de los extractos alcaloideos, constituyeron alcaloides mayoritarios en todos los casos donde se detectaron. Curiosamente, en los órganos de plantas completas silvestres y las plantas cultivadas *in vitro* derivadas de embriones somáticos se encontró más voacangina que ibogaína, en el material vegetal de plantas completas cultivadas en invernadero (de uno a dos años de edad) las concentraciones de ambos MIAs fueron semejantes, mientras que en los cultivos *in vitro* hubo más ibogaína que voacangina.

Cuadro 5. Porcentajes de ibogaína y voacangina por peso seco de los extractos alcaloideos y del material vegetal de origen obtenido de plantas completas de *T. alba*.

Extracto alcaloideo	Porcentaje de ibogaína por peso seco		Porcentaje de voacangina por peso seco	
	del extracto	del material vegetal	del extracto	del material vegetal
Material vegetal recolectado en campo				
Hojas	0,6757	0,0008	1,5601	0,0019
Ramas	1,6185	0,0026	2,0614	0,0033
Corteza de tronco	1,8127	0,0148	10,2750	0,0838
Semillas	0,1491	0,0003	0,4507	0,0009
Frutos	2,1376	0,0036	1,3769	0,0023
Corteza de raíz	0,2975	0,0028	0,4453	0,0042
Material vegetal tomado de plantas cultivadas <i>in vivo</i> en invernadero e <i>in vitro</i> en laboratorio				
Hojas	0,5333	0,0037	0,3200	0,0022
Raíz	1,4875	0,0397	1,4555	0,0388
Tronco y raíz	0,4459	0,0021	0,4992	0,0024
Planta <i>in vitro</i>	1,4961	0,0244	4,0332	0,0659

Cuadro 6. Porcentajes de ibogaína y voacangina por peso seco de los extractos alcaloideos y del material vegetal de origen obtenido de los cultivos *in vitro stock* de *T. alba*.

Lote	Porcentaje de ibogaína por peso seco		Porcentaje de voacangina por peso seco	
	del extracto	del material vegetal	del extracto	del material vegetal
Material vegetal de los cultivos de células en suspensión <i>stock</i>				
L-OCH1 (medio I)*	0,0047	2.2385E-006	0,0400	1.9205E-005
L-OCH1a (medio II)*	ND	ND	ND	ND
L-OCH1b (medio II)*	0,2191	NC	0,0973	NC
LAH1	0,0412	0,0001	ND	ND
LCH1	0,0332	0,0003	0,0201	0,0002
LFH1	0,3650	0,0007	ND	ND
Medios líquidos de los cultivos de células en suspensión <i>stock</i>				
L-OCH1 (medio I)*	1,0745	0,0034	0,1216	0,0004
L-OCH1a (medio II)*	0,2620	0,0001	0,1799	3.8603E-005
LFH1	1,1245	0,0031	0,1385	0,0004
Material vegetal de los cultivos de callo <i>stock</i>				
OCH1	0,1498	0,0008	ND	ND
ODH1	0,0021	2.1262E-005	ND	ND
OBH1	0,0501	0,0001	ND	ND
L-OBH1	ND	ND	ND	ND
OATN3	0,0514	0,0001	0	0
L-OATN3	0,2164	0,0018	0,0231	0,0001

*Medio I: con reguladores de crecimiento ANA, AIA, AIB y BA; Medio II: con reguladores de crecimiento 2,4-D y kinetina

ND = no detectado; NC = no calculado

Comparando los mismos órganos de plantas silvestres y plantas cultivadas bajo condiciones de invernadero, se encontraron mayores concentraciones de ibogaína y voacangina en las últimas, con excepción de la corteza de tronco de las plantas silvestres que mostró el rendimiento más alto de voacangina. Las raíces de las plantas de invernadero presentaron la mayor concentración de ibogaína y la tercera concentración más alta de voacangina, mientras que la planta completa obtenida y cultivada *in vitro* mostró las segundas concentraciones más altas de los dos alcaloides. Por ende, se hizo evidente que las cortezas de tronco y de raíz son las estructuras vegetales con mayor producción de ibogaína y voacangina en plantas maduras de *T. alba*. Respecto de plantas jóvenes de pocas semanas de edad se ignora si toda la planta biosintetiza ambos MIAs en altas concentraciones o si algunos de los órganos producen significativamente más de estos compuestos que otros.

Los cultivos *in vitro* se dividieron en tres grupos referente a la biosíntesis de ibogaína y voacangina. El primer grupo no las produjo, el segundo grupo presentó rendimientos bajos (inferiores a las semillas de las plantas silvestres), y el tercer grupo sintetizó concentraciones de ibogaína semejantes a hojas, ramas y frutos de plantas completas (superiores a las semillas de las plantas silvestres). El contenido de voacangina fue siempre considerablemente inferior a los órganos de plantas completas. Los diferentes reguladores de crecimiento, tipos de explante y condiciones de fotoperiodo no impactaron de manera evidente en la producción de MIAs. Cabe destacar que los mayores rendimientos de ibogaína de los cultivos *in vitro* se detectaron en los medios líquidos de los cultivos de células en suspensión, y no en la biomasa correspondiente. Esto implica que una parte significativa de los MIAs biosintetizados por las células se libera al medio bajo las condiciones de cultivo probadas.

Respecto de los cultivos de células en suspensión elicitados con MeJA, la mayoría de las repeticiones no produjo ni ibogaína ni voacangina. Las repeticiones que sí sintetizaron ibogaína no presentaron diferencias significativas ni tendencias evidentes entre tratamientos (Cuadro 7). En el experimento de elicitación biótica de las células en suspensión, se registró un solo caso de presencia de ibogaína (y ninguno de presencia de voacangina), perteneciendo la repetición correspondiente al tratamiento con la mayor cantidad de material fúngico agregado (54.50 g de peso fresco de micelio por litro de medio). El porcentaje de ibogaína fue de 0.0151 por peso seco del extracto alcaloideo, y de 2.7980E-005 por peso seco del material vegetal de origen. Los medios líquidos filtrados que se obtuvieron en ambos ensayos de elicitación no contuvieron MIAs.

Cuadro 7. Porcentajes de ibogaína y voacangina por peso seco de los extractos alcaloideos y del material vegetal de origen obtenido de los cultivos *in vitro* de *T. alba* elicitados con MeJA.

Tratamiento	Porcentaje de ibogaína por peso seco		Porcentaje de voacangina por peso seco	
	del extracto	del material vegetal	del extracto	del material vegetal
Control				
0-1	0,1660	0,0002	ND	ND
0-2	0,0113	1.5209E-005	ND	ND
0-3	ND	ND	ND	ND
0-4	ND	ND	ND	ND
0-5	ND	ND	ND	ND
\emptyset	0,0355	4.1741E-005	ND	ND
σ	0,0654	0,0001	ND	ND
MeJA 10 μ M				
10-1	0,2460	0,0003	ND	ND
10-2	ND	ND	ND	ND
10-3	ND	ND	ND	ND
10-4	0,1772	0,0002	ND	ND
10-5	ND	ND	ND	ND
\emptyset	0,0846	0,0001	ND	ND
σ	0,1059	0,0001	ND	ND
MeJA 100 μ M				
100-1	0,1072	0,0001	ND	ND
100-2	ND	ND	ND	ND
100-3	ND	ND	ND	ND
100-4	0,1928	3.5841E-005	ND	ND
100-5	ND	ND	ND	ND
\emptyset	0,0600	2.6075E-005	ND	ND
σ	0,0783	3.6938E-005	ND	ND
MeJA 200 μ M				
200-1	0,0147	1.3260E-005	ND	ND
200-2	ND	ND	ND	ND
200-3	ND	ND	0,0245	2.0219E-005
200-4	0,2618	0,0001	ND	ND
200-5	ND	ND	ND	ND
\emptyset	0,0553	3.0124E-005	0,0049	4.0439E-006
σ	0,1034	0,0001	0,0098	8.0878E-006

\emptyset = promedio; σ = desviación estándar

ND = no detectado

VI. DISCUSIÓN

6.1. Germinación *in vivo*

La baja tasa de germinación de las semillas de *T. alba* puede estar relacionada con un periodo de viabilidad relativamente corto que es característico de muchas especies vegetales de las selvas perennifolias. Sobre todo en el caso de plantas con frutos carnosos cuyas semillas se dispersan principalmente por zoocoria, la presencia o ausencia de animales frugívoros que comparten una historia coevolutiva con las primeras puede ser un factor limitante de la germinación (Elmoultie & Mather, 2012). La fuerte presencia de contaminación sistémica en las semillas también pudo haber impactado en este proceso fisiológico fundamental.

El uso de semillas maduras recién recolectadas y su tratamiento con desinfectantes como el peróxido de hidrógeno, el cual es un estimulador de la germinación (Çavusoglu & Kabar, 2010), y/o el hipoclorito de sodio probablemente aumenten la tasa de germinación de esta especie. Además, diferentes tipos de escarificación mecánica o química podrían resultar eficaces, tal vez mimetizando ciertas condiciones resultantes de la exposición de las semillas de *T. alba* a procesos de zoocoria en su hábitat natural. Para futuros proyectos que incluyan la germinación de semillas de esta especie se recomienda combinar tratamientos con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno e hipoclorito de sodio y ensayos de escarificación con pruebas de viabilidad.

6.2. Inducción de callo *in vitro* y establecimiento y proliferación de cultivos de células en suspensión

El mejor protocolo de inducción de callo y proliferación de cultivos de células en suspensión de *T. alba* consistió en exponer explantes foliares a un medio basal MS con 2,4-D y kinetina, tanto en presencia de un fotoperiodo como de oscuridad continua.

Respecto de los reguladores de crecimiento, la combinación más eficaz resultó incluir 2,4-D, una auxina generalmente considerada más fuerte y potente que ANA, AIA y AIB. Esto no solamente se confirmó en la inducción de callo sino también con la inducción de la formación de embriones somáticos y la proliferación de los cultivos de células en suspensión, acorde con la literatura en los tres casos (Bhojwani & Razdan, 1996). Cabe hacer mención que en los cultivos de células en suspensión, la exposición de éstas a 2,4-D y kinetina incrementó la biomasa únicamente de manera moderada en comparación con la combinación de ANA, AIA, AIB y BA, como lo evidenció el hecho de

que los pesos secos fueron muy similares en ambos tratamientos. El peso fresco, en cambio, fue considerablemente más alto en el primer caso, indicando una mayor hidratación de las células en contacto con 2,4-D y kinetina. Para fines de aumentar la densidad celular en cultivos de células en suspensión, altos niveles de hidratación pueden tener un efecto negativo, mientras que una mayor relación entre peso seco y peso fresco, como fue registrada en las células expuestas a ANA, AIA, AIB y BA, puede ser deseable (Park & Kim, 1993). Empero, se seleccionó el medio nutritivo conteniendo 2,4-D y kinetina para proliferar los cultivos *in vitro* y hacer los ensayos de elicitación, debido sobre todo a la menor ocurrencia de agregados celulares. Éstos suelen surgir de la deficiente separación de células nuevas producto de la división celular o bien de la adhesión entre células individuales. En general, se busca establecer cultivos de células en suspensión lo más disgregadas posible, compuestos de la mayor cantidad de células libres y la menor presencia de agregados (Godoy Hernández & Vázquez Flota, 2006). Se ha reportado que el 2,4-D puede inhibir la agregación celular (Whitmer *et al.*, 1998b), lo que probablemente contribuyó a la baja cantidad de agregados registrada en los cultivos celulares con dicha auxina en comparación con los cultivos utilizando ANA, AIA y AIB.

En el caso de los tipos de explante, se observó que los explantes apicales, de nudo y de tallo formaron callo con similar facilidad que los de hoja, sin embargo, tendieron a mostrar grados de contaminación sistémica más elevados, desventaja que se pudo eliminar mediante la aplicación de agroquímicos a las plantas donadoras, así como la desinfección exhaustiva de los explantes y la inclusión de antimicrobianos a los medios.

Una alternativa fue la obtención de explantes a partir de plantas jóvenes axénicas cultivadas *in vitro*, proporcionando un método simple y eficaz de formar callo en los cuatro tipos de explantes mencionados. Además de la ausencia de contaminación, estas plantas mostraron susceptibilidad particularmente alta a la inducción de callo. Lo anterior se puede explicar a causa de una gran cantidad de células activamente en división, característica típica de los tejidos jóvenes ligeramente diferenciados (Bhojwani & Razdan, 1996). Especialmente los explantes radicales parecieron formar callo mucho más fácilmente cuando se habían obtenido de plántulas y plantas con tejidos en estadios de crecimiento y diferenciación tempranos. Siguiendo este razonamiento, se podría explicar la falta de éxito de inducción de callo en las semillas con la escasa presencia de tejidos jóvenes en dichas estructuras.

Finalmente, acerca de las condiciones de fotoperiodo, no se registraron diferencias evidentes duraderas, no obstante, la ocurrencia exclusiva de callo con coloración verdosa en presencia del fotoperiodo se puede asociar con la actividad fotosintética que por definición requiere de luz para llevarse a cabo.

En el transcurso de los experimentos de cultivo *in vitro* se hizo evidente que las diferencias morfológicas entre lotes eran grandes, implicando una amplia gama de propiedades fisiológicas que impactaban en las tasas de crecimiento y proliferación de cada lote. Dichas discrepancias pueden deberse tanto a factores genéticos, cuando se trata de lotes obtenidos de distintas plantas donadoras que no son clones, como epigenéticos y de la regulación de la expresión génica, cuando se trata de lotes obtenidos de la misma planta donadora o clones de una planta. De hecho, la variabilidad epigenética tiende a aumentar en cultivos de callos obtenidos de explantes compuestos de más de un tipo celular como fue el caso en esta investigación (George, 2008). Además, la mayoría de los cultivos *in vitro* se derivaron de una sola planta donadora y sus clones (los embriones somáticos mencionados en la sección de resultados F, Embriogénesis), por lo que muchas diferencias observadas se pueden atribuir a factores no genéticos. Sin embargo, la conclusión anterior debe ser tratada con el debido cuidado, ya que la ocurrencia de mutaciones génicas en cultivos de callos y células en suspensión es un fenómeno relativamente común (George, 2008).

Considerando la heterogeneidad morfológica y fisiológica de cultivos *in vitro* con gran variabilidad genética y/o epigenética, el aislamiento de distintas líneas celulares seguramente guarda gran potencial para la optimización del CTV de *T. alba*. Dependiendo de las características deseadas, se podrían seleccionar líneas con altas tasas de proliferación de callo y células en suspensión, niveles apropiados de hidratación y disgregabilidad, estabilidad de dichas características a lo largo del mayor número de subcultivos posible, alta susceptibilidad a la inducción de embriogénesis somática, etc.

En cuanto a la embriogénesis somática, Bhojwani & Razdan (1996) sostienen que cualquier célula vegetal expuesta a los estímulos adecuados puede teóricamente presentar un desarrollo semejante o idéntico a un embrión para finalmente dar origen a una planta completa. No obstante, solamente una pequeña parte de las células de un explante realmente llega a formar embriones somáticos. Las razones de esta discrepancia entre teoría y realidad pueden ser de naturaleza genética y epigenética, además de depender del tipo, así como el estadio de desarrollo y diferenciación del explante. La presencia de auxinas en el medio nutritivo se considera esencial para la inducción del fenómeno, siendo particularmente eficientes las auxinas sintéticas como el 2,4-D. De manera similar, los

embriones requieren de su transferencia a un medio libre de reguladores de crecimiento para diferenciarse. En el caso de *T. alba*, se sugiere que la presencia del 2,4-D indujo la desdiferenciación de algunas células de los explantes, dando lugar a la formación de masas celulares con capacidad embriogénica que al ser expuestos a medio MS sin auxinas diferenciaron primero plántulas y luego plantas completas.

Además del uso como donadores de explantes axénicos altamente susceptibles a la inducción de callo, los embriones somáticos también sirven para la regeneración de plantas completas de *T. alba*, proporcionando así al menos dos opciones para la producción de MIAs mediante el cultivo *in vitro* e *in vivo* de esta especie, y ofreciendo interesantes posibilidades de estudiar la biosíntesis de alcaloides en diferentes estadios de desarrollo y diferenciación vegetal. Por ende, el aislamiento y la conservación de varias líneas celulares con alto potencial embriogénico serían particularmente deseables.

6.3. Elicitación abiótica y biótica de los cultivos de células en suspensión

Las fitohormonas ácido jasmónico (JA, por sus siglas en inglés), ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés) y etileno (ET), respectivamente, son los compuestos claves de las tres principales rutas de defensa de las plantas. Los jasmonatos se derivan del ácido α -linolénico y regulan varios procesos del desarrollo vegetal como la fertilidad, la germinación, el desarrollo embrionario, el crecimiento radical, la maduración de frutos, la senescencia foliar, entre muchos otros. Pero sobre todo son sustancias que suelen acumularse en las células vegetales en respuesta a estrés abiótico y biótico, estimulando la producción de moléculas antioxidantes y metabolitos secundarios (Dar *et al.*, 2015).

El MeJA es un jasmonato volátil y por lo tanto, el hecho de que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control de los cultivos de células en suspensión elicitadas con este compuesto, fue sorprendente. No obstante, las tendencias registradas merecen ser consideradas. Gautam *et al.* (2011) señalan que el MeJA puede impactar negativamente en el crecimiento de este tipo de cultivos de *C. roseus* a concentraciones de 10 y 100 μ M, efecto que posiblemente se reflejó en el peso fresco relativamente bajo de las células de *T. alba* tratadas con 100 μ M de esta fitohormona. El rendimiento de los extractos alcaloideos presentó una tendencia semejante, disminuyendo en los tres tratamientos, cuando la hipótesis fue que la elicitación con MeJA causaría aumentos de estos metabolitos secundarios en las células vegetales. Lee-Parsons *et al.* (2004) elicitaban cultivos de células en suspensión de *C. roseus* con 10 y 100 μ M de MeJA,

incrementando la producción del MIA ajmalicina hasta en 300% comparada con cultivos no elicitados. El punto se tratará más detalladamente en la sección 6.4.

Cabe mencionar que la posibilidad de que la aplicación de MeJA a los cultivos de *T. alba* hubiera inducido la producción de terpenoides, en detrimento de la biosíntesis de MIAs, se pudo excluir a raíz del no incremento de los rendimientos de los extractos hexánicos en el caso de las células elicidadas. Solamente el rendimiento de los extractos metanólicos mostró una tendencia de aumentar a 10 μM de MeJA. Se ignora si esta observación se debe a coincidencia o si la elicitación efectivamente indujo la síntesis de sustancias no alcaloideas solubles en metanol.

Como el estrés biótico suele estimular la liberación de MeJA, se esperó observar una mayor producción de metabolitos secundarios en los cultivos de células en suspensión de *T. alba* elicidadas con *Fusarium* sp. comparados con el control. Pero igual que en el caso de la elicitación abiótica, solamente se observó una tendencia de incremento en los rendimientos de los extractos metanólicos. Aunque el registro de esta tendencia en ambos ensayos de elicitación podría sugerir que tanto MeJA como *Fusarium* sp. estimularon la biosíntesis de compuestos polares no alcaloideos, es más probable que dicha observación fue causada por la extracción adicional de sustancias contenidas en el micelio agregado. El género *Fusarium* produce tanto metabolitos primarios (por ejemplo polisacáridos (Nita-Lazar *et al.*, 2004)) como secundarios (sobre todo micotoxinas del grupo de los tricotecenos (Vesonder & Golinski, 1989)) de los cuales muchos son solubles en metanol.

Como en el caso de la embriogénesis somática, la obtención de hongos endófitos de *T. alba* fue fortuita. La forma de vida de *Fusarium* sp. como microorganismo endófito de muchas especies vegetales, convirtiéndose ocasionalmente en patógeno, está ampliamente documentada (Aoki *et al.*, 2014). Una posible explicación de la falta de respuesta de los cultivos de *T. alba* a la elicitación biótica realizada puede ser que las células vegetales no reconocieron al micelio agregado como patógeno sino endófito inofensivo. En consecuencia, no se activaron los mecanismos de defensa como la ruta biosintética de los MIAs.

La información disponible referente a la otra especie de hongo endófito indentificada, *P. adametzioides*, está mucho más limitada. Deng *et al.* (2012) menciona que la especie ha sido encontrada en suelo, aire, ramas de árboles del género *Prunus* y uvas en proceso de descomposición, relacionándola con la forma de vida patógena de otras especies del género *Penicillium*, pero sin descartar que la asociación entre hongo y planta pueda ser de naturaleza no

patógena en ocasiones.

Por la trascendencia que podría tener el descubrimiento de dos especies de hongos endófitos anteriormente no reportadas en *Tabernaemontana*, se propone llevar a cabo experimentos adicionales para confirmar o refutar la presencia de estos microorganismos en *T. alba*. Por un lado, se debería repetir el aislamiento de los hongos de explantes de esta especie vegetal, y por otro lado, ampliar el análisis de rDNA fúngico, incluyendo las regiones genómicas ITS y secuencias parciales de la β -tubulina en el caso de *P. adametzioides* (Samson *et al.*, 2004), así como un factor de elongación en el caso de *Fusarium* sp. (Geiser *et al.*, 2004).

6.4. Análisis cualitativo y cuantitativo de los extractos alcaloideos

Los análisis realizados en este proyecto de investigación aportan información al conocimiento fitoquímico de *T. alba*, ya que el único antecedente en la literatura científica (Collera *et al.*, 1962) se limitó a las semillas y solamente detectó dos MIAs: coronaridina y tabersonina. La ocurrencia del primer alcaloide en *T. alba* pudo ser confirmada por los análisis de GC-MS llevados a cabo durante el presente trabajo, pero no se encontró tabersonina. Sin embargo, entre los compuestos no identificados hubo varios con la misma masa molecular (336) que este intermediario de la síntesis de vindolina, que a su vez es un precursor del importante compuesto antineoplásico vinblastina (Ishikawa *et al.*, 2008). Consecuentemente, existe la posibilidad que la no detección de tabersonina en *T. alba* se debió simplemente a las condiciones experimentales particulares como la falta de espectros de masa de referencia.

De los otros ocho alcaloides identificados, ninguno había sido reportado para *T. alba*, pero todos para diferentes especies del género por van Beek *et al.*, 1984. La presencia de estos MIAs explica en parte el uso etnobotánico de *T. alba* en la medicina tradicional mexicana, aprovechando sobre todo sus efectos analgésicos, antimicrobianos y antivirales (van Beek *et al.*, 1984) para tratar distintos tipos de dolor e infecciones dermatológicas con preparaciones de la especie (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

La observación de que la producción de MIAs fue constante en plantas completas de *T. alba*, pero inconsistente en los cultivos de callos y células en suspensión fue un resultado altamente trascendente por el amplio margen de interpretación que implica. El metabolismo secundario vegetal es muy complejo, y por ende, muchos elementos influyen en su funcionamiento. A continuación, se

discutirán factores ambientales, genéticos, epigenéticos y de productividad metabólica, así como de desarrollo y diferenciación que pudieron haber determinado la biosíntesis de MIAs en las plantas y los cultivos *in vitro* analizados.

A) Factores ambientales

Debido a la gran variabilidad del material vegetal, el número de repeticiones analizadas fue insuficiente para hacer conclusiones definitivas al respecto, no obstante, considerando que las plantas completas cultivadas *in vitro* (en condiciones de asepsia y medio nutritivo artificial) produjeron cantidades de MIAs a la par con las plantas cultivadas en invernadero (expuestas a un número relativamente controlado de herbívoros, patógenos y endófitos en sustrato natural adicionado con nutrimentos) y las plantas silvestres (en contacto continuo con un sinfín de herbívoros, patógenos y endófitos en sustrato natural), las condiciones ambientales probablemente no fueron un factor determinante de la biosíntesis de ibogaína y voacangina, siempre y cuando no se consideren los reguladores de crecimiento.

Referente a estos compuestos, se sabe que el 2,4-D tiende a reducir la biosíntesis de alcaloides en cultivos *in vitro* (Arvy *et al.*, 1994), y efectivamente el lote de células en suspensión L-OCH1 (medio I), exento de esta auxina sintética, tuvo una de las mayores concentraciones de ibogaína y voacangina de todos los cultivos de tejidos vegetales analizados. Este resultado concordó con Sierra *et al.* (1992) que reportaron incrementos en la producción de MIAs en cultivos de células en suspensión de *T. divaricata* después de sustituir el medio de cultivo conteniendo 2,4-D por uno con ANA. No obstante, LFH1, otro lote de los cultivos de células en suspensión expuesto al medio que sí contenía 2,4-D, mostró concentraciones semejantes a L-OCH1 (medio I).

Whitmer *et al.* (1998b) demostraron que la exposición a 2,4-D puede reducir la capacidad de cultivos de células en suspensión de *C. roseus* de proporcionar precursores indólicos e iridoides de los MIAs. En cambio, la adición de triptamina y loganina exógenas al medio de los cultivos puede incrementar la producción de MIAs en ciertas condiciones, dependiendo sobre todo de la proporción de ambos precursores e implicando una compleja red de interacciones entre sí (Whitmer *et al.*, 1998a). La disponibilidad de precursores requeridos en el medio y/o las células vegetales es un factor potencialmente determinante de la biosíntesis de MIAs en los cultivos *in vitro* de *T. alba* que no se incluyó en el diseño experimental de esta investigación. Futuros trabajos deberán considerar este aspecto.

A pesar de que no se determinó si los reguladores de crecimiento utilizados inhibieron o no la producción de MIAs, se sugiere optimizar los protocolos establecidos para el cultivo de callos y células en suspensión mediante el uso de dos medios nutritivos con y sin reguladores de crecimiento dependiendo de los requerimientos predominantes en un momento dado. Es decir, el uso de un medio para la inducción de callo y proliferación de los cultivos conteniendo auxinas y citoquininas, y otro medio basal libre de estos compuestos para la producción de MIAs. Dagnino (1991, 1993a, 1993b, 1994, 1995) y Pawelka & Stöckigt (1983) reportaron la biosíntesis de MIAs en cultivos de células en suspensión sin la aplicación de regulador de crecimiento alguno.

Por último, a pesar de que los resultados obtenidos sugieren que las condiciones de fotoperiodo no tuvieron efectos evidentes en la producción de alcaloides en los cultivos *in vitro* analizados, existen reportes que afirman lo contrario, al menos en plántulas de *C. roseus* (Liu *et al.*, 2011), por lo que las conclusiones hechas al respecto en el presente trabajo no pueden ser consideradas como definitivas.

B) Factores genéticos, epigenéticos y de productividad metabólica

El diseño experimental del presente estudio no incluyó un número suficiente de repeticiones para elucidar el efecto del tipo del explante y la planta donadora del mismo sobre la producción de ibogaína y voacangina en los cultivos *in vitro*. A pesar de ello, tanto callos y células en suspensión derivados de explantes foliares como de tallo, nudos y ápices sintetizaron estos alcaloides en concentraciones semejantes. Lo mismo fue cierto para los cultivos de distinto origen genético. De forma muy general, lo anterior implica que características genéticas, epigenéticas y de la regulación génica potencialmente favorables para la producción de MIAs se deben buscar a nivel de lote o incluso de línea celular en vez de categorías más amplias como de individuo, tejido u órgano vegetal de los cuales se tomaron los explantes.

En otras palabras y análogamente al razonamiento expuesto en el caso de la inducción de callo y proliferación de los cultivos *in vitro*, se propone que debido a la heterogeneidad celular predominante, las diferencias entre lotes tuvieron un mayor impacto sobre la producción de ibogaína y voacangina que las condiciones ambientales (incluyendo los reguladores de crecimiento), los tipos de explante o las plantas donadoras. Por ende, el aislamiento de líneas celulares con alta capacidad biosintética de dichos MIAs en combinación con altas tasas de crecimiento y proliferación es deseable.

Whitmer *et al.* (1998a) confirman que la productividad metabólica determinada de distintas líneas celulares representa un factor sumamente importante para la producción de MIAs. La heterogeneidad celular puede incrementar debido a cambios genéticos y epigenéticos cuya frecuencia depende en parte de las condiciones de cultivo (Bhojwani & Razdan, 1996) y en gran medida del número de subcultivos (George, 2008). En general, explantes con tejidos maduros y diferenciados proporcionan cultivos *in vitro* más susceptibles a variación somaclonal genética y/o epigenética que explantes compuestos de tejidos meristemáticos y embrionarios. Los principales mecanismos que inducen esta variación son mutaciones recesivas o dominantes, amplificación (sobreexpresión de genes) e hipometilación de DNA, así como activación de transposones. El 2,4-D es un agente mutagénico muy eficiente en cultivos de tejidos vegetales (Bhojwani & Dantu, 2013).

C) Factores de desarrollo y diferenciación

La literatura científica cita muchos ejemplos de biosíntesis selectiva de alcaloides dependiendo de los estadios de desarrollo y diferenciación particulares de las plantas y sus órganos correspondientes. Por ejemplo, la ruta biosintética de los MIAs en *C. roseus* depende de al menos tres tipos celulares distintos asociados con varios órganos: células parenquimales del floema interno de órganos aéreos, células epidermales de órganos aéreos y meristemas apicales radiculares, así como laticíferos e idioblastos de hojas y tallos. Además, se requiere de cinco o más compartimentos subcelulares: citosol, vacuola, retículo endoplásmico, membranas plasmática y tilacoidal (Ziegler & Facchini, 2008).

Únicamente en presencia de este conjunto de estructuras pueden expresarse todas las enzimas que posibilitan la producción de la gama entera de alcaloides característicos de la *C. roseus* (Ziegler & Facchini, 2008). Entre las enzimas claves de la ruta destacan la estrictosidina sintasa (STR) y la estrictosidina- β -D-glucosidasa (SGD), catalizando las reacciones que dan lugar a los intermediarios de los que se derivan todos los demás MIAs. La triptofano descarboxilasa (TDC), así como la ácido logánico metiltransferasa (LAMT) y la secologanina sintasa (SLS) también juegan papeles importantes, ya que posibilitan la formación de los precursores de la estrictosidina, la triptamina y la secologanina, respectivamente (Salim & De Luca, 2013).

Como estas cinco enzimas ocurren en la epidermis de los órganos aéreos (Salim & De Luca, 2013) y al menos la STR y la TDC también en el meristemo apical de las raíces (Ziegler & Facchini, 2008), se pone en evidencia que existen MIAs que no requieren de más de un tipo celular para su biosíntesis. Ejemplos son la misma estrictosidina y el grupo del tipo ibogano (Salim & De Luca, 2013). Por otro

lado, a nivel de compartimento subcelular, la STR se ubica en la vacuola, la SGD asociada al lado citoplasmático del retículo endoplasmático y la TDC en el citosol (Ziegler & Facchini, 2008), y en consecuencia, la diferenciación subcelular es esencial para la síntesis de cualquier MIA.

Los diferentes estadios de diferenciación en plantas completas y cultivos *in vitro* de *T. alba* pueden determinar la ausencia, presencia y abundancia de ciertos tipos de células, así como compartimentos subcelulares involucrados en la biosíntesis de MIAs, y de esta manera, explicar por qué la producción de ibogaína y voacangina fue constante en las primeras y poco consistente en los segundos. De hecho, en los cultivos *in vitro* se registraron tanto cantidades traza de los dos MIAs como concentraciones intermedias de ibogaína, estas últimas comparables con las cantidades detectadas en hojas, frutos y semillas de plantas completas. Las concentraciones de voacangina en los cultivos *in vitro*, en cambio, fueron siempre claramente inferiores a las registradas en las muestras provenientes de plantas completas, lo que podría implicar la ausencia o deficiencia de componentes celulares claves para algunos procesos de la ruta biosintética de MIAs, afectando distintamente la producción de voacangina que de ibogaína.

Posiblemente, lo anterior también se reflejó en las diferentes proporciones de los dos MIAs detectadas en las muestras de órganos de plantas completas silvestres (de varios años de edad), material vegetal de plantas completas cultivadas en invernadero (de uno a dos años de edad), plantas cultivadas *in vitro* derivadas de embriones somáticos (de varias semanas de edad) y los cultivos *in vitro* (de diferentes edades pero estadios de diferenciación por definición poco avanzados).

Sin embargo y como se mencionó en los apartados correspondientes de antecedentes, cultivos de células en suspensión de otras especies de *Tabernaemontana* mostraron su capacidad de producir cantidades considerables y constantes de MIAs aun sin elicitación (Dagnino *et al.*, 1991, 1993a, 1993b, 1994, 1995; Lucumi *et al.*, 2001, 2002; Pawelka & Stöckigt, 1983; Schripsema *et al.*, 1990, 1991, 1992, 1994; Sierra *et al.*, 1991, 1992; Stevens *et al.*, 1993; van der Heijden *et al.*, 1986, 1988a, 1988b, 1989), siendo el grado de diferenciación celular y tisular un factor negligente en estos ejemplos.

De cualquier modo, recordando que ibogaína y voacangina pertenecen al grupo de los MIAs del tipo ibogano, el cual según el conocimiento actual solamente requiere de células epidermales, la búsqueda de distintos estadios de desarrollo y diferenciación potencialmente responsables de las discrepancias observadas en la biosíntesis de MIAs entre plantas completas y cultivos *in vitro* se

debería enfocar al nivel subcelular. La expresión baja o nula de una o varias enzimas claves en los cultivos *in vitro* de *T. alba* pudo haber sido una razón principal de la producción inconsistente de MIAs que se podría asociar tanto con factores de desarrollo y diferenciación como con aspectos genéticos, epigenéticos y de productividad metabólica. Verma *et al.* (2015) lograron aumentar la cantidad de alcaloides producidos por cultivos de células en suspensión de la apocinácea *Vinca minor* mediante la sobreexpresión de la TDC y la STR.

Una técnica muy utilizada para incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* es la elicitación. Curiosamente, los cultivos de células en suspensión elicitados presentaron las concentraciones más bajas de ibogaína y voacangina de todas las muestras analizadas y los cromatogramas tampoco mostraron otros picos considerables en el área de los MIAs. Lo anterior resultó sorprendente en vista de los antecedentes de uso exitoso de MeJA y *Fusarium* sp. en la elicitación de cultivos de tejidos vegetales de otras especies de la familia Apocynaceae como *C. roseus* (para un resumen, véase Gautam *et al.*, 2011) induciendo claramente la biosíntesis selectiva de diferentes MIAs (Lee-Parsons *et al.*, 2004). Sin embargo, estos estudios también ofrecen una posible explicación para la falta de respuesta de los cultivos de células en suspensión a los elicitors abiótico y biótico. Por ejemplo, aparte de la dosis aplicada del elicitor, la producción de MIAs puede depender de la fase de crecimiento de los cultivos en el momento de la elicitación (Lee-Parsons *et al.*, 2004), la duración de ésta (Namdeo *et al.*, 2002) y la disponibilidad de precursores en el medio (Lee-Parsons & Royce, 2006).

En la presente investigación los tiempos de elicitación y cosecha de los cultivos de células en suspensión se calcularon con base en la cinética de crecimiento determinada para L-OCH1 con el fin de hacer coincidir el momento de elicitación con el inicio de la fase exponencial (para afectar al mayor número de células posible), y el momento de cosecha con la conclusión de un ciclo celular completo (para asegurar que todas las fases de crecimiento hubieran ocurrido y las células hubieran dedicado suficiente energía a la biosíntesis de metabolitos secundarios en vez del crecimiento y la división celulares). Bhojwani & Razdan (1996) confirman que la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* tiende a suceder al final de la fase estacionaria cuando el crecimiento se inhibe por el agotamiento de los nutrimentos, la citodiferenciación y la inducción de enzimas claves del metabolismo secundario.

Dichos tiempos de elicitación y cosecha correspondieron a cuatro y once días posteriores al último subcultivo, respectivamente. Namdeo *et al.* (2002) reportaron un tiempo óptimo de elicitación de 48 h en cultivos de células en suspensión de *C. roseus* con respecto de la producción de ajmalicina, mientras que una cosecha más tardía resultó en concentraciones inferiores. Por lo tanto, en el presente proyecto de investigación, se pudo haber rebasado por varios días el momento más apropiado para cosechar la biomasa y los medios de los cultivos *in vitro* elicitados, obteniendo solamente trazas de los MIAs originalmente producidos en respuesta a la elicitación. También es posible que el razonamiento de elicitar al iniciar la fase exponencial y cosechar al concluir el ciclo celular hubiera sido acertado pero que los cálculos no hubieran correspondido a los tiempos reales, por ejemplo a raíz de cambios temporales en la cinética de crecimiento de los cultivos.

Otras posibles explicaciones de las bajas o nulas concentraciones de ibogaína y voacangina en los cultivos elicitados son:

- Las características del lote L-OCH1 quizá no fueron las más deseables para seleccionarlo para los ensayos de elicitación, ya que otros lotes presentaron mayores concentraciones de ibogaína y voacangina en los cultivos *stock* respectivos. A pesar de ello, realmente no hubo alternativas porque únicamente L-OCH1 mostró una tasa de proliferación adecuada para producir suficiente biomasa para los experimentos.
- En todos los lotes analizados se observó una alta variabilidad entre repeticiones respecto de las cantidades de ibogaína y voacangina presentes, lo que sugirió que dichos lotes realmente consistieran de una compleja mezcla de líneas celulares con distintas propiedades, sesgando así los resultados.
- La magnitud de la biosíntesis de ibogaína y voacangina osciló en L-OCH1 (y probablemente los demás lotes) a lo largo del tiempo, alternando periodos de producción relativamente baja con periodos de producción relativamente alta, posiblemente a causa de cambios en la predominancia de ciertas líneas celulares del lote o bien a factores fisiológicos y bioquímicos asociados con cambios genéticos, epigenéticos y/o de productividad metabólica. Es factible que los cultivos de células en suspensión *stock* de L-OCH1 hubieran pasado por un periodo de baja productividad alcaloidea en el momento de realizar los experimentos de elicitación.
- Los dos ensayos de elicitación se iniciaron a partir de los mismos cultivos de células en suspensión *stock* de L-OCH1, sin embargo, el experimento de elicitación con MeJA se llevó a cabo meses antes que la elicitación con *Fusarium* sp., y en el periodo intermedio entre ambos experimentos, los cultivos *stock* cambiaron de aspecto, presentando signos crecientes de

oxidación, pérdida de viabilidad y vigor proliferativo. Al realizar el ensayo de elicitación biótica se puso en evidencia que la biomasa del grupo control y los tres tratamientos fue significativamente menor que la biomasa de los grupos homólogos del ensayo de elicitación abiótica, lo que se atribuyó a la senescencia progresiva de L-OCH1. Probablemente, este proceso impactó no solamente en la tasa de proliferación sino también en la biosíntesis de MIAs del lote, explicando la existencia de una sola repetición con cantidades detectables de ibogaína.

Los resultados analíticos de los cultivos de células en suspensión merecen una mención aparte, debido a la liberación de ibogaína y voacangina al medio nutritivo, en varias ocasiones superando las concentraciones de estos alcaloides presentes en las células. La búsqueda de variables y líneas celulares con propiedades que favorezcan la secreción de los dos MIAs al medio podría ser clave para mejorar el proceso productivo, tomando en cuenta que simplemente se tendría que decantar y extraer el medio de los cultivos de células en suspensión. Las células permanecerían en los contenedores a los que se agregaría medio nutritivo fresco, reduciendo la pérdida de biomasa a un mínimo y resultando en un mayor volumen de cultivos *in vitro* y un aumento en la producción de MIAs.

Con el fin de optimizar el diseño experimental, se propone establecer cultivos de células en suspensión a partir de líneas celulares de *T. alba* que muestren altas tasas de proliferación y producción de ibogaína, voacangina y posiblemente de otros MIAs. Además de optimizar los tiempos de elicitación y cosecha de las células en suspensión, tomando muestras en intervalos regulares a lo largo del experimento, empezando a las pocas horas posteriores a la elicitación.

En resumen, los resultados obtenidos de los ensayos de elicitación de este proyecto de investigación muestran que el CTV de *T. alba* puede ser una herramienta útil en la producción de ibogaína y voacangina, siempre y cuando futuros experimentos determinen las condiciones apropiadas para incrementar la biosíntesis de los dos alcaloides en los cultivos *in vitro*. En cambio, la inducción de embriogénesis somática en explantes de la especie ya es una opción viable para obtener rápidamente considerables volúmenes de biomasa productora de estos MIAs.

VII. CONCLUSIONES

Con base en los resultados generados por el presente proyecto de investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Plantas completas de *T. alba* de diferentes edades mostraron una capacidad considerable de biosintetizar MIAs en variedad y cantidad, algunos de ellos, como ibogaína y voacangina, reportados por primera vez para la especie.
- La especie presentó una buena susceptibilidad a la inducción de callo en distintos tipos de explante expuestos a los reguladores de crecimiento 2,4-D y kinetina, destacando el tipo foliar.
- La formación de embriones somáticos se observó en callo originado de explantes foliares.
- Tanto plantas completas silvestres como cultivadas en invernadero e *in vitro* produjeron ibogaína y voacangina consistentemente en distintos órganos.
- Los cultivos de callo y células en suspensión biosintetizaron ibogaína y voacangina de manera inconsistente, reflejando la heterogeneidad celular en los cultivos *in vitro*.
- Las concentraciones y condiciones de elicitación abiótica y biótica no permitieron observar incrementos en la producción de ibogaína y voacangina por los cultivos de células en suspensión.
- El CTV de *T. alba* representa una opción viable para la producción de ibogaína y voacangina mediante
 - la obtención de plantas cultivadas *in vitro* producto de la embriogénesis somática.
 - el establecimiento y la proliferación de cultivos de callo y células en suspensión, siempre y cuando se logre optimizar los rendimientos.

VIII. LITERATURA CITADA

Alvarado Cárdenas, L. O. & Juárez Jaimes, V. 2012. Una especie nueva de *Tabernaemontana* (Apocynaceae: Rauvolfioideae) de México, seriamente amenazada en su hábitat. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83: 334-340.

Andrade, M. T., Lima, J. A., Pinto, A. C., Rezende, C. M., Carvalho, M. P., & Epifanio, R. A. 2005. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miens that inhibit acetylcholinesterase enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 4092-4095.

Aoki, T., O'Donnell, K. & Geiser, D. M. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *Journal of General Plant Pathology*, 80:189-201.

Arvy, M. P., Imbault, N., Naudascher, F., Thiersault, M. & Doireau, P. 1994. 2,4-D and alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. *Biochimie*, 76: 410-416.

Bensh, K., Braun, U., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 72: 1-401.

Bhat, S. V., Nagasampagi, B. A. & Sivakumar, M. 2005. *Chemistry of Natural Products*. Narosa Publishing House, Nueva Delhi.

Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. 2013. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, Nueva Delhi.

Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Elsevier, Ámsterdam.

Çavusoglu, K. & Kabar, K. 2010. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4: 70-79.

Collera, O., Walls, F., Sandoval, A., García, F., Herrán, J. & Pérez-Amador, M. C. 1962. Alcaloides de especies de *Stemmadenia* – II. *Boletín del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México*, XIV: 3-18.

- Dagnino, D., Schripsema, J., Peltenburg, A. & Verpoorte, R. 1991. Capillary gas chromatographic analysis of indole alkaloids: Investigation of the indole alkaloids present in *Tabernaemontana divaricata* cell suspension culture. *Journal of Natural Products*, 54 (6): 1558-1563.
- Dagnino, D., Schripsema, J. & Verpoorte, R. 1993a. Alkaloid metabolism in *Tabernaemontana divaricata* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 32 (2): 325-329.
- Dagnino, D., Schripsema, J. & Verpoorte, R. 1993b. Comparison of terpenoid indole alkaloid production and degradation in two cell lines of *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Reports*, 13: 95-98.
- Dagnino, D., Schripsema, J. & Verpoorte, R. 1994. Terpenoid indole alkaloid biotransformation capacity of suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry*, 35 (3): 671-676.
- Dagnino, D., Schripsema, J. & Verpoorte, R. 1995. Terpenoid indole alkaloid biosynthesis and enzyme activities in two cell lines of *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry*, 39 (2): 341-349.
- Danieli, B. & Palmisano, G. 1986. Chapter 1. Alkaloids from *Tabernaemontana*. En: Brossi, A. (Ed.). *The Alkaloids*. Vol. 27. Academic Press, Inc., Orlando, Florida, pp 1-124.
- Dar, T. A., Uddin, M., Khan, M. M. A., Hakeem, K. R. & Jaleel, H. 2015. Jasmonates counter plant stress: A Review. *Environmental and Experimental Botany*, 115: 49-57.
- Deng, J. X., Paul, N. C., Sang, H. K., Lee, J. H., Hwang, Y. S. & Yu, S. H. 2012. First Report on Isolation of *Penicillium adametzioides* and *Purpureocillium lilacinum* from Decayed Fruit of Cheongsoo Grapes in Korea. *Mycobiology*, 40 (1): 66-70.
- Elmoultie, D. & Mather, P. B. 2012. Can rodents enhance germination rates in rainforest seeds? *Ecological Management & Restoration*, 13 (2): 203-207.
- Fumagali, E., Gonçalves, R. A. C., Machado, M. F. P. S., Vidoti, G. J., Oliveira, A. J. B. 2008. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18 (4): 627-641.

George, E. F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure – Background. En: George, E. F., Hall, M. A., De Klerk, G. J. (Eds.). *Plant propagation by tissue culture. 1. The background*. Capítulo 1. 3ª ed. Springer, Dordrecht, Países Bajos, pp. 1-28.

Gautam, S., Mishra, A. & Tiwari, A. 2011. *Catharanthus* alkaloids and their enhanced production using elicitors: a review. *International Journal of Pharmacy & Technology*, 3 (1): 713-724.

Geiser, D. M., Jiménez-Gasco, M. M., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T. J., Zhang, N., Kuldau, G. A. & O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473-479.

Godoy Hernández, G. & Vázquez Flota, F. A. 2006. Growth Measurements. Estimation of Cell Division and Cell Expansion. En: Loyola Vargas, V. M. & Vázquez Flota, F. A. (Eds.). *Plant Cell Culture Protocols*. 2ª ed. Humana Press, Totowa, NJ, EEUU, pp 51-58.

Guevara, S., Laborde, J., Liesenfeld, D. & Barrera, O. 1997. Potrereros y ganadería. En: González Soriano, E., Dirzo, R. & Vogt, R. C. (Eds.). *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Instituto de Biología, UNAM, CONABIO, Instituto de Ecología, UNAM, México, D. F., pp. 43-58.

Ingkaninan, K., Changwijit, K. & Suwanborirux, K. 2006. Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58 (6): 847-852.

Ishikawa, H., Colby, D. A. & Boger, D. L. 2008. Direct Coupling of Catharanthine and Vindoline to Provide Vinblastine: Total Synthesis of (+)- and ent(-)-Vinblastine. *Journal of the American Chemical Society*, 130: 420-421.

Janot, M. M. & Goutarel, R. 1957. Derivatives of the ibogaine alkaloids. *US Patent No. 2,813,873*.

Juárez Jaimes, V., Alvarado Cárdenas, L. O. & Villaseñor, J. L. 2007. La familia Apocynaceae *sensu lato* en México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78: 459-482.

Kodja, H., Robene-Soustrade, I. & Figier, J. 1997. Synergistic effect of DFMO and 2,4-D on regeneration of *Tabernaemontana persicariaefolia* Jacq *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19 (3): 359-366.

Krengel, F. 2013. *Tabernaemontana alba* y *T. arborea*: *Presencia de alcaloides y su actividad biológica*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, pp. 52.

Lee-Parsons, C. W. T., Ertürk, S. & Tengtrakool, J. 2004. Enhancement of ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures with methyl jasmonate is dependent on timing and dosage of elicitation. *Biotechnology Letters*, 0: 1595-1599.

Lee-Parsons, C. W. T. & Royce, A. J. 2006. Precursor limitations in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell Reports*, 25: 607-612.

Lim, K. H. & Kam, T. S. 2009a. Conoliferine and isoconoliferine, structurally novel-alkaloid-lignan conjugates from *Tabernaemontana corymbosa*. *Tetrahedron Letters*, 80 (27): 3756-3759.

Lim, K. H. & Kam, T. S. 2009b. Conomicidines A and B, unusual alkaloid-hydroxycinnamyl alcohol conjugates from *Tabernaemontana corymbosa*. *Helvetica Chimica Acta*, 92 (9): 1895-1902.

Liu, Y., Zhao, D. M., Zu, Y. G., Tang, Z. H., Zhang, Z. H., Jiang, Y. & Shi, D. Y. 2011. Effects of low light on terpenoid indole alkaloid accumulation and related biosynthetic pathway gene expression in leaves of *Catharanthus roseus* seedlings. *Botanical Studies*, 52:191-196.

Lucumi, E., Luczkiewicz, M., Vera, A., Hallard, D., van der Heijden, R. & Verpoorte, R. 2001. Alkaloid formation in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* after feeding of tryptamine and loganin. *Biotechnology Letters*, 23: 1691-1696.

Lucumi, E., Vera, A., Hallard, D., van der Heijden, R. & Verpoorte, R. 2002. Alkaloid formation in cell suspension cultures of *Tabernaemontana elegans* after feeding of tryptamine and loganin or secologanin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 293-299.

- Mansoor, T. A., Ramalho, R. M., Mulhovo, S., Rodrigues, C. M. & Ferreira, M. J. 2009a. Induction of apoptosis in HuH-7 cancer cells by monoterpene and beta-carboline indole alkaloids isolated from the leaves of *Tabernaemontana elegans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (15): 4255-4258.
- Mansoor, T. A., Ramalho, C., Molnár, J., Mulhovo, S. & Ferreira, M. J. 2009b. Tabernines A-C, beta-carbolines from the leaves of *Tabernaemontana elegans*. *Journal of Natural Products*, 72 (6): 1147-1150.
- Mulabagal, V. & Tsay, H. S. 2004. Plant Cell Cultures - An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 1: 29-48.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Namdeo, A., Patil, S. & Fulzele, D. P. 2002. Influence of Fungal Elicitors on Production of Ajmalicine by Cell Cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Progress*, 18: 159-162.
- Nita-Lazar, M., Heyraud, A., Gey, C., Braccini, I. & Lienart, Y. 2004. Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. rapidly induce PAL activity in *Rubus* cells. *Acta Biochimica Polonica*, 51 (3): 625-632.
- Nutt, D. J., King, L. A. & Phillips, L. D. 2010. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet*, 376: 1558-1565.
- Oliveira, A. J. B. de et al. 2003. In vitro multiplication of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* L. (Apocynaceae). *Revista Árvore*, 27 (4): 421-425.
- Park, I. S. & Kim, D. I. 1993. Significance of fresh weight to dry cell weight ratio in plant cell suspension cultures. *Biotechnology Techniques*, 7 (9): 627-630.
- Patel, H. & Krishnamurthy, R. Elicitors in Plant Tissue Culture. 2013. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (2): 60-65.

- Pawelka, K. H. & Stöckigt, J. 1983. Indole Alkaloids from Cell Suspension Cultures of *Tabernaemontana divaricata* and *Tabernanthe iboga*. *Plant Cell Reports*, 2: 105-107.
- Pereira, P. S., Tigli, F. K., de Castro França, S., de Souza Breves, C. M. & Lourenço, M. V. 2007. Enhanced triterpene production in *Tabernaemontana catharinensis* cell suspension cultures in response to biotic elicitors. *Química Nova*, 30 (8): 1849-1852.
- Rätsch, C. 2007. *Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen*. 8ª ed. AT Verlag, Aarau, Suíza.
- Salim, V. & de Luca, V. 2013. Towards Complete Elucidation of Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis Pathway: *Catharanthus roseus* as a Pioneer System. *Advances in Botanical Research*, 68: 1-37.
- Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F. A., Houbraken, J. A. M. P. & Frisvad, J. C. 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β -tubulin sequences. *Studies in Mycology*, 49: 175-200.
- Schripsema, J., Meijer, A. H., van Iren, F., Hens, ten Hoopen, H. J. G. & Verpoorte, R. 1990. Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22: 55-64.
- Schripsema, J., Peltenburg-Looman, A., Erkelens, C. & Verpoorte, R. 1991. Nitrogen metabolism in cultures of *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry*, 30 (12): 3951-3954.
- Schripsema, J. & Verpoorte, R. 1992. Search for factors related to the indole alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata*. *Planta Medica*, 58 (3): 245-249.
- Schripsema, J., Dagnino, D., Dos Santos, R. I. & Verpoorte, R. 1994. Breakdown of indole alkaloids in suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* and *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38: 299-305.
- Sennblad, B. & Bremer, B. 2002. Classification of Apocynaceae s.l. According to a New Approach Combining Linnaean and Phylogenetic Taxonomy. *Systematic Biology*, 51 (3): 389-409.

Sierra, M. I., van der Heijden, R., Schripsema, J. & Verpoorte, R. 1991. Alkaloid Production in Relation to Differentiation in Cell and Tissue Cultures of *Tabernaemontana pandacaqui*. *Planta Medica*, 57 (6): 543-547.

Sierra, M. I., van der Heijden, R., van der Leer, T. & Verpoorte, R. 1992. Stability of alkaloid production in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* during long-term subculture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 59-68.

Simoës, A. O., Endress, M. E. & Conti, E. 2010. Systematics and character evolution of *Tabernaemontana* (Apocynaceae, Rauvolfioideae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon*, 59 (3): 772-790.

Spinella, M. 2001. *The Psychopharmacology of Herbal Medicine: Plant Drugs That Alter Mind, Brain and Behavior*. MIT Press, EEUU.

Stevens, L. H., Blom, T. J. M. & Verpoorte, R. 1993. Subcellular localization of tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and strictosidine glucosidase in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* and *Tabernaemontana divaricata*. *Plant Cell Reports*, 12: 573-576.

Suhartono, L. van Iren, F., de Winter, W., Roytrakul, S., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. 2005. Metabolic comparison of cryopreserved and normal cells from *Tabernaemontana divaricata* suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83: 59-66.

Tang, Z., Rao, L., Peng, G., Zhou, M., Shi, G. & Liang, Y. 2011. Effects of endophytic fungus and its elicitors on cell status and alkaloid synthesis in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (11): 2192-2200

Van Beek, T. A., Verpoorte, R., Svendsen, A. B., Leeuwenberg, A. J. & Bisset, N. G. 1984. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 10 (1): 1-156.

Van Beek, T. A., Verpoorte, R. & Svendsen, A. B. 1985. Antimicrobially active alkaloids from *Tabernaemontana chippii*. *Journal of Natural Products*, 48 (3): 400-423.

Van der Heijden, R., Brouwer, R. L., Verpoorte, R., Wijnsma, R., van Beek, T. A., Harkes, P. A. A. & Baerheim Svendsen, A. 1986. Indole alkaloids from a callus culture of *Tabernaemontana elegans*. *Phytochemistry*, 25 (4): 843-846.

Van der Heijden, R., Verheij, E. R., Schripsema, J., Baerheim Svendsen, A., Verpoorte, R. & Harkes, P. A. A. 1988a. Induction of triterpene biosynthesis by elicitors in suspension cultures of *Tabernaemontana species*. *Plant Cell Reports*, 7: 51-54.

Van der Heijden, R., Hermans-Lokkerbol, A., de Kool, L. P., Lamping, P. J., Harkes, P. A. A. & Verpoorte, R. 1988b. Accumulation of indole alkaloids in a suspension culture of *Tabernaemontana divaricata*. *Planta Medica*, 54 (5): 393-397.

Van der Heijden, R., Louwe, C. L., Verheij, E. R., Harkes, P. A. A. & Verpoorte, R. 1989. Characterization of a suspension culture of *Tabernaemontana elegans* on growth, nutrient uptake, and accumulation of indole alkaloids. *Planta Medica*, 55 (2): 158-162.

Verma, P., Sharma, A., Khan, S. A., Shanker, K. & Mathur, A. K. 2015. Over-expression of *Catharanthus roseus* tryptophan decarboxylase and strictosidine synthase in rol gene integrated transgenic cell suspensions of *Vinca minor*. *Protoplasma*, 252: 373-381.

Vesonder, R. F. & Golinski, P. 1989. Metabolites of *Fusarium*. En: Chelkowski, J. (Ed.). *Fusarium: Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-39.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (Eds.). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Nueva York, pp. 315-322.

Whitmer, S., Canel, C., Hallard, D., Goncalves, C. & Verpoorte, R. 1998a. Influence of Precursor Availability on Alkaloid Accumulation by Transgenic Cell Line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*, 116: 853-857.

Whitmer, S., Verpoorte, R. & Canel, C. 1998b. Influence of auxins on alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53: 135-141.

Ziegler, J. & Facchini, P. J. 2008. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 735-769.

Zocoler, M. A., de Oliveira, A. J. B., Sarragiotto, M. H. , Grzesiuk, V. L. & Vidotti, G. J. 2005. Qualitative Determination of Indole Alkaloids of *Tabernaemontana fuchsiaefolia* (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16 (6B): 1372-1377.

Recursos electrónicos:

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: Monografías de plantas medicinales*. Disponible en URL [Online]:

http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cojón_de_gato&id=7163

Acceso agosto 10, 2015.

Encyclopedia of Life (EOL). *Tabernaemontana*, Milkwood. Disponible en URL [Online]:

<http://eol.org/pages/61385/overview>

Acceso agosto 10, 2015.

Global Commission on Drug Policy (GCDP). 2014. *Taking Control: Pathways to Drug Policies that Work*. Disponible en URL [Online]:

http://www.ycsg.yale.edu/assets/downloads/taking_control.pdf

Acceso octubre 25, 2015.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). 2014. *World Drug Report 2014*. Disponible en URL [Online]:

https://www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf

Acceso octubre 25, 2015.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Pesos frescos de cultivos de células en suspensión derivados de cuatro diferentes lotes de callo utilizados para trazar las curvas de cinética de crecimiento.

Días después de iniciados los cultivos	Repetición	Peso fresco (g/ml)			
		L-OCH1	LAH1	LCH1	LFH1
1	1	0,0700	0,0200	0,0100	0,0100
	2	0,0600	0,0200	0,0100	0,0200
	3	0,0700	0,0100	0,0100	0,0200
	\emptyset	0,0666	0,0166	0,0100	0,0166
	σ	0,0047	0,0047	0	0,0047
4	1	0,0242	0,0193	0,0099	0,029
	2	0,0384	0,0270	0,0176	0,0172
	3	0,0374	0,0179	0,0305	0,0208
	4	0,0803	0,0161	0,0188	0,0259
	5	0,0463	0,0147	0,0134	0,0161
	\emptyset	0,0453	0,0190	0,0180	0,0218
	σ	0,0188	0,0042	0,0069	0,0049
7	1	0,0486	0,0193	0,0251	0,0202
	2	0,0886	0,0157	0,0265	0,0233
	3	0,1209	0,0233	0,0245	0,0590
	4	0,0722	0,0136	0,0207	ND
	5	0,0754	0,0175	0,0064	0,0270
	\emptyset	0,0811	0,0178	0,0206	0,0323
	σ	0,0236	0,0033	0,0073	0,0155
9	1	0,0754	0,0219	0,0203	0,0246
	2	0,0959	0,0332	0,0359	0,0291
	3	0,0759	0,0217	0,0451	0,0336
	4	0,0593	0,0132	0,0219	0,0340
	5	0,0812	0,0324	0,0249	0,0381
	\emptyset	0,0775	0,0244	0,0296	0,0318
	σ	0,0117	0,0074	0,0094	0,0046
11	1	0,1278	0,0211	0,0232	0,0325
	2	0,1412	0,0230	0,0266	0,0343
	3	0,1605	0,0152	0,0187	0,0393
	4	0,1371	0,0192	0,0175	0,0371
	5	0,1145	0,0188	0,0446	0,0219
	\emptyset	0,1362	0,0194	0,0261	0,0330
	σ	0,0152	0,0026	0,0097	0,0060

\emptyset = promedio; σ = desviación estándar

Anexo 2. Pesos frescos y secos de células en suspensión del lote L-OCH1 cultivadas en dos distintos medios nutritivos.

Repetición	Medio II			Medio I		
	PF (g)	PS (g)	PF/PS (%)	PF (g)	PS (g)	PF/PS (%)
1	14,1680	1,1150	7,8698	7,4669	0,8328	11,1532
2	23,9317	1,3382	5,5917	8,3513	0,8378	10,0319
3	9,2402	0,7853	8,4987	7,1249	0,8564	12,0198
4	12,2025	1,0500	8,6047	7,7244	0,7963	10,3088
5	17,3831	1,1657	6,7059	7,0003	0,7267	10,3809
Ø	15,3850	1,0908	7,4542	7,5335	0,8100	10,7789
σ	5,0280	0,1802	1,1503	0,4818	0,0459	0,7234

Medio II = medio MS con 2,4-D y kinetina (2 mg/l y 0.2 mg/l, respectivamente)

Medio I = medio MS con ANA, AIA, AIB y BA (1 mg, 1 mg, 1 mg y 0.2 mg/l, respectivamente)

PF = peso fresco; PS = peso seco

Ø = promedio; σ = desviación estándar

Anexo 3. Pesos frescos y secos de células en suspensión elicidadas con diferentes concentraciones de MeJA y rendimientos de extractos orgánicos.

MeJA (μ M)	PF (g)	PS (g)	PF/PS (%)	HEX (g)	HEX/PS (%)	MeOH (g)	MeOH/ PS (%)	TA (g)	TA/PS (%)
0-1	14,1680	1,1150	7,8698	0,0967	8,6726	0,2886	25,8834	0,0013	0,1166
0-2	23,9317	1,3382	5,5917	0,1112	8,3097	0,3541	26,4609	0,0018	0,1345
0-3	9,2402	0,7853	8,4987	0,1046	13,3198	0,1371	17,4583	0,0017	0,2165
0-4	12,2025	1,0500	8,6048	0,0385	3,6667	0,1683	16,0286	0,0017	0,1619
0-5	17,3831	1,1657	6,7059	0,1606	13,7771	0,2518	21,6008	0,0018	0,1544
Ø	15,3851	1,0908	7,4542	0,1023	9,5492	0,2400	21,4864	0,0017	0,1568
σ	5,0281	0,1802	1,1503	0,0389	3,7149	0,0791	4,2451	0,0002	0,0338
10-1	11,8427	1,0425	8,8029	0,0874	8,3837	0,2829	27,1367	0,0012	0,1151
10-2	16,7019	1,2038	7,2076	0,0871	7,2354	0,2844	23,6252	0,0030	0,2492
10-3	18,5699	1,2087	6,5089	0,0704	5,8244	0,2950	24,4064	0,0014	0,1158
10-4	14,1243	1,2139	8,5944	0,0323	2,6608	0,2504	20,6277	0,0012	0,0989
10-5	13,0696	0,8984	6,8740	0,1982	22,0614	0,2646	29,4524	0,0008	0,0890
Ø	14,8617	1,1135	7,5976	0,0951	9,2332	0,2755	25,0497	0,0015	0,1336
σ	2,4498	0,1254	0,9282	0,0553	6,6947	0,0159	3,0244	0,0008	0,0587
100-1	12,4188	1,1337	9,1289	0,0854	7,5329	0,2995	26,4179	0,0010	0,0882
100-2	14,8816	1,2555	8,4366	0,1012	8,0605	0,1039	8,2756	0,0005	0,0398
100-3	13,8371	1,1855	8,5675	0,0985	8,3087	0,2801	23,6272	0,0005	0,0422
100-4	13,0111	1,0758	8,2683	0,0400	3,7182	0,1811	16,8340	0,0002	0,0186
100-5	11,6470	1,0030	8,6117	0,2027	20,2094	0,2383	23,7587	0,0019	0,1894
Ø	13,1591	1,1307	8,6026	0,1056	9,5659	0,2206	19,7827	0,0008	0,0756
σ	1,1210	0,0871	0,2890	0,0533	5,5760	0,0711	6,5685	0,0006	0,0613
200-1	15,1220	1,2203	8,0697	0,0991	8,1210	0,3005	24,6251	0,0011	0,0901
200-2	11,2977	1,0653	9,4294	0,1187	11,1424	0,2817	26,4433	0,0014	0,1314
200-3	17,9054	1,4521	8,1098	0,0797	5,4886	0,3317	22,8428	0,0012	0,0826
200-4	15,1505	1,3343	8,8070	0,0457	3,4250	0,2217	16,6155	0,0007	0,0525
200-5	14,7098	1,3697	9,3115	0,1610	11,7544	0,2549	18,6099	0,0015	0,1095
Ø	14,8371	1,2883	8,7455	0,1008	7,9863	0,2781	21,8273	0,0012	0,0932
σ	2,1042	0,1341	0,5749	0,0385	3,2007	0,0377	3,6792	0,0003	0,0265

PF = peso fresco; PS = peso seco; HEX = extracto hexánico; MeOH = extracto metanólico; TA = extracto alcaloideo;

Ø = promedio; σ = desviación estándar

Anexo 4. Pesos frescos y secos de células en suspensión elicidadas con diferentes cantidades de micelio de *Fusarium* sp. y rendimientos de extractos orgánicos.

Micelio (g/l)	PF (g)	PS (g)	PF/PS (%)	HEX (g)	HEX/PS (%)	MeOH (g)	MeOH/PS (%)	TA (g)	TA/PS (%)
0-1	5,3633	0,2924	5,4519	0,0744	25,4446	0,0915	31,2927	0,0037	1,2654
0-2	3,9153	0,2911	7,4349	0,0497	17,0732	0,0579	19,8901	0,0019	0,6527
0-3	4,9521	0,2947	5,9510	0,0923	31,3200	0,0498	16,8985	0,0021	0,7126
0-4	5,0329	0,2955	5,8714	0,0658	22,2673	0,0471	15,9391	0,0018	0,6091
0-5	5,0929	0,3274	6,4286	0,1303	39,7984	0,0800	24,4349	0,0055	1,6799
Ø	4,8713	0,3002	6,2275	0,0825	27,1807	0,0653	21,6911	0,0030	0,9839
σ	0,4975	0,0137	0,6787	0,0276	7,8187	0,0175	5,6395	0,0014	0,4213
0.54-1	5,3984	0,3374	6,2500	0,0786	23,2958	0,1398	41,4345	0,0033	0,9781
0.54-2	5,5230	0,5368	9,7194	0,0552	10,2832	0,3047	56,7623	0,0016	0,2981
0.54-3	4,9952	0,2947	5,8997	0,0991	33,6274	0,0751	25,4835	0,0022	0,7465
0.54-4	4,9300	0,3793	7,6937	0,0616	16,2404	0,1289	33,9837	0,0035	0,9228
0.54-5	4,9928	0,3093	6,1949	0,1348	43,5823	0,0662	21,4032	0,0023	0,7436
Ø	5,1679	0,3715	7,1515	0,0859	25,4058	0,1429	35,8134	0,0026	0,7378
σ	0,2434	0,0875	1,4271	0,0288	11,9593	0,0859	12,5552	0,0007	0,2389
5.45-1	5,5257	0,3557	6,4372	0,0741	20,8322	0,1327	37,3067	0,0031	0,8715
5.45-2	4,6395	0,3821	8,2358	0,0480	12,5622	0,1095	28,6574	0,0014	0,3664
5.45-3	6,4471	0,3836	5,9500	0,0842	21,9499	0,1330	34,6715	0,0022	0,5735
5.45-4	4,6312	0,4435	9,5764	0,0515	11,6122	0,1602	36,1218	0,0038	0,8568
5.45-5	5,4944	0,4326	7,8735	0,1327	30,6750	0,1460	33,7494	0,0035	0,8091
Ø	5,3476	0,3995	7,6146	0,0781	19,5263	0,1363	34,1014	0,0028	0,6955
σ	0,6748	0,0332	1,3007	0,0305	6,9714	0,0168	2,9813	0,0009	0,1965
54.5-1	4,5058	0,7292	16,1836	0,0713	9,7778	0,1489	20,4196	0,0045	0,6171
54.5-2	8,1907	0,9179	11,2066	0,0514	5,5997	0,4258	46,3885	0,0017	0,1852
54.5-3	10,8781	0,9747	8,9602	0,1023	10,4955	0,4303	44,1469	0,0016	0,1642
54.5-4	8,2645	0,8964	10,8464	0,0795	8,8688	0,2971	33,1437	0,0008	0,0892
54.5-5	9,3190	0,9788	10,5033	0,1401	14,3134	0,3654	37,3314	0,0033	0,3371
Ø	8,2316	0,8994	11,5400	0,0889	9,8111	0,3335	36,2860	0,0024	0,2786
σ	2,1010	0,0909	2,4448	0,0303	2,8059	0,1042	9,2365	0,0013	0,1875

PF = peso fresco; PS = peso seco; HEX = extracto hexánico; MeOH = extracto metanólico; TA = extracto alcaloideo

Ø = promedio; σ = desviación estándar