



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera
División de Estudios de Posgrado
Doctorado en Ciencias y Tecnología de la Madera**

**IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA
PRODUCCIÓN DE MEDICARPINA EN
CULTIVOS *IN VITRO* DE
Dalbergia congestiflora Pittier**

TESIS

**Como requisito parcial para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias en Tecnología de la Madera**

**Presenta
M.C. Alejandra Hernández García**

**Director de tesis
D.C. Jorge Enrique Ambriz Parra**

**Co-director
D.C. Pablo López Albarrán**

Morelia Michoacán, septiembre 2020



El presente trabajo se realizó en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de los Dres. Jorge Enrique Ambriz Parra y Pablo López Albarrán, en la Facultad de de Ingeniería en Tecnología de la Madera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, en especial a la **Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera**, por todo el apoyo otorgado y haber realizado mis estudios de grado en esta institución.

Al **Dr. Jorge Enrique Ambriz Parra**, por sus enseñanzas, conocimientos, tiempo y dedicación para la realización y culminación de este trabajo. **Muchas gracias.**

Al **Dr. Pablo López Albarrán**, por sus enseñanzas, conocimientos y aportes en el desarrollo de este trabajo, que influyeron en mi formación profesional. **Muchas Gracias.**

A mis sinodales el **Dr. Rafael Herrera Bucio**, **Dr. Crisanto Velázquez Becerra**, **Dr. J. Jesús García Magaña** por sus aportes y recomendaciones, durante el desarrollo de esta investigación. **Gracias**

Al **Dr. Rafael Herrera Bucio** por el apoyo, recomendaciones y enseñanzas para la identificación de la medicarpina. **Gracias**

Al **M.C. Fredy Morales y Q.F.B. Rafael Ayala**, por apoyarme con sus conocimientos en el desarrollo del método de separación de medicarpina a partir de en los cultivos *in vitro*. **Gracias**

Al **Dr. Rafael Torres** por ayudarme a desarrollar las de técnicas de medición de la enzima PAL en células *in vitro*. **Gracias**

A la **M.C. Yoshira López**, por el apoyo en mantenimiento y selección de los cultivos *in vitro* de *D. congestiflora*. **Gracias**

A mis amigos y compañeros en el grupo de trabajo del Dr. Enrique Ambriz de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera **M.C. Jesús Morales y M.C. Yoshira López**, que siempre estuvieron apoyándome incondicionalmente, brindándome sus conocimientos para el desarrollo de la tesis. **Muchas gracias.**

A mis compañeros del doctorado **M.C. Wilber Montejó Mayo y M.C. Eduardo Moreno** por siempre estar ahí conmigo apoyándome incondicionalmente. **Gracias por su amistad**

A las secretarías **Estela Méndez y Claudia Hernández** por todo su apoyo durante mis estudios en **POSTECMA**. **Gracias**

DEDICATORIA

A mi esposo **Rafael Salgado Garciglia**, que siempre me motiva e impulsa para seguir adelante y creciendo, preparándome profesionalmente. **Gracias... te admiro y te amo.**

A mi hijo **Ari Sebastián Salgado Hernández**, que me motiva e inspira a seguir adelante, además me presta de su tiempo para seguir creciendo en mi profesión. **Gracias te quiero mucho.**

A mis Padres **Abel Hernández Guzmán y Lilia García Rodríguez** por apoyarme y estar conmigo incondicionalmente en cada momento. **Gracias**

A mis hermanos **Marisol, Walter, Abel y Lilia Lizeth**, por siempre estar conmigo, apoyarme en cada momento. **Gracias**

"Gracias por existir en mí vida"

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Dalbergia congestiflora</i> (Campincerán)	3
2.2. Medicago	4
2.2.1. Enantiómeros de la medicarpina	6
2.3. Inducción de síntesis de fitoalexinas	7
2.3.1. Elicitores abióticos y bióticos	8
2.4. Producción <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios	10
2.4.1. Cultivos de callos	11
2.4.2. Cultivos de células en suspensión	11
2.4.3. Inductores en cultivos <i>in vitro</i>	12
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
CAPÍTULO 1	
Establecimiento y determinación del crecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de callos y suspensiones celulares de <i>Dalbergia congestiflora</i>	19
1.1. Resumen	19
1.1.1. Abstract	19
1.2. Introducción	20
1.3. Materiales y métodos	21
1.3.1. Material biológico	21
1.3.2. Establecimiento de suspensiones celulares de <i>D. congestiflora</i>	23

	Pág.
1.3.2.1. Inducción de callo	23
1.3.2.2. Obtención de suspensiones celulares	24
1.3.3. Pruebas de viabilidad	24
1.3.4. Cinéticas de crecimiento	25
1.3.5. Determinación de crecimiento	25
1.4. Resultados	26
1.4.1. Inducción de callo	26
1.4.2. Obtención de suspensiones celulares	28
1.4.3. Pruebas de viabilidad	28
1.4.4. Cinéticas de crecimiento	29
1.5. Discusión	32
1.5.1. Inducción al callo	32
1.5.2. Obtención de suspensiones celulares	33
1.5.3. Cinéticas de crecimiento de callo y suspensiones celulares	34
1.6. Conclusión	35
1.7. Literatura citada	35
 CAPÍTULO 2	
Determinación de la producción de medicarpina en callos y en células en suspensión de <i>D. congestiflora</i>	37
2.1. Resumen	37
2.1.1. Abstract	37
2.2. Introducción	38
2.3. Materiales y métodos	39
2.3.1. Material	39
2.3.2. Métodos	40
2.4. Resultados	42
2.4.1. Extracción, purificación e identificación de medicarpina	42
2.4.2. Cinéticas de producción de medicarpina en callo y células en suspensión	43
2.5. Discusión	46
2.5.1. Extracción, purificación, identificación de medicarpina	46
2.5.2. Cuantificación de medicarpina en callo y células en suspensión	47
2.6. Conclusiones	49
2.7. Literatura citada	50

	Pág.
CAPÍTULO 3	
Evaluación del efecto de los inductores bióticos y abióticos sobre la producción de (+)-medicarpina en células en suspensión <i>D. congestiflora</i>	53
3.1. Resumen	53
3.1.1. Abstract	53
3.2. Introducción	54
3.3. Materiales y Métodos	55
3.3.1. Material Biológico	55
3.3.2. Extracción y cuantificación de medicarpina en células en suspensión	56
3.3.2.1. Extracción	56
3.3.2.2. Cuantificación	56
3.3.3. Inducción de la producción de (+)-medicarpina	57
3.3.3.1. Inducción por factores abióticos	58
3.3.3.2. Inducción por factores bióticos	58
3.3.4. Análisis estadístico	59
3.4. Resultados	59
3.4.2. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores abióticos	59
3.4.3. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores bióticos	61
3.5. Discusión	63
3.5.1. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores abióticos	63
3.5.2. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores bióticos	65
3.6. Conclusiones	66
3.7. Literatura citada	66
CAPÍTULO 4	
Actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en células en suspensión de <i>Dalbergia congestiflora</i> tratadas con sacarosa y filtrado estéril de <i>Fusarium solani</i>	69
4.1. Resumen	69
4.1.1. Abstract	69
4.2. Introducción	70
4.3. Materiales y Métodos	72
4.3.1. Material Biológico	72

	<i>Pág.</i>
4.3.1.1. Factor biótico	72
4.3.1.2. Factor abiótico	73
4.3.2. Extracción y determinación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)	73
4.3.3. Análisis estadístico	74
4.4. Resultados	74
4.4.1. Determinación de actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL)	74
4.5. Discusión	76
4.6. Conclusiones	78
4.7. Literatura citada	78
 7. CONCLUSIONES	 81
 8. LITERATURA GENERAL CITADA	 82

Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Medicarpina	4
Figura 2. Síntesis de medicarpina	5
Figura 3. Enantiómeros de medicarpina	6
Figura 4. Mecanismo general de respuesta al estrés en células vegetales	9
Figura 5. Plántula de <i>D. congestiflora</i> <i>in vitro</i>	22
Figura 6. Segmentos de plántulas <i>in vitro</i> de <i>D. congestiflora</i> para la inducción de callo: A) Tallo; B) Hoja; y C) Callo. A los 8 días del cultivo	26
Figura 7. Peso fresco y Peso seco a 30 días de cultivo en los tratamientos (BA/ANA)	27
Figura 8. Morfología de callos de <i>D. congestiflora</i> con tratamientos de BA/ANA: A) T1 (0.1/0.0); B) T3 (0.25/0.0); y C) T5 (1.5/0.1)	27
Figura 9. Células en suspensión de <i>D. congestiflora</i> con DFA al 0.5%: A) Conjunto de células; B) Células viables (fluorescentes con UV) y C) Células sin fluorescencia	28
Figura 10. Cinéticas de crecimiento de callo de <i>D. congestiflora</i> : A) Peso fresco; y B) Peso seco	29
Figura 11. Cinéticas de crecimiento de células en suspensión de <i>D. congestiflora</i> : A) Peso fresco; y B) Peso seco	31
Figura 12. Extracción de medicarpina a partir de callos de <i>D. congestiflora</i> . A) callo a los 21 días, B) macerado después de 5 días, y c) extraíbles después de evaporar	42
Figura 13. Purificación de medicarpina a partir de callos de <i>D. congestiflora</i> . A) Placa con el extracto y luz UV, B) Muestras en la placa con UV: 1) medicarpina estándar, 2) medicarpina purificada y 3) extracto y C) Lectura con el espectrofotómetro con los picos máximos de 264 y 274 nm	43

		Pág.
Figura 14.	Curva de calibración de medicarpina mg/mL ($\lambda=264$ nm)	45
Figura 15.	Cinéticas de producción de (+)-medicarpina en cultivos <i>in vitro</i> de <i>D. congestiflora</i> en callo y células en suspensión	45
Figura 16.	Hongos en estudio cultivados en medio PDA: A) <i>Botrytis cinerea</i> ; B) <i>Fusarium solani</i>	56
Figura 17.	Efecto del factor luz (luz y oscuridad) en el crecimiento celular (g/10 mL peso fresco) y en la producción de (+)-medicarpina (mg/g peso fresco), en células en suspensión de <i>Dalbergia congestiflora</i> , a los 16 días del cultivo	60
Figura 18.	Efecto de la fuente de carbono (sacarosa) y de nitrógeno (nitrato de amonio y de potasio) en el crecimiento celular (g/10 mL peso fresco) y en la producción de (+)-medicarpina (mg/g peso fresco), en células en suspensión de <i>Dalbergia congestiflora</i> , a los 16 días del cultivo	61
Figura 19.	Efecto de la adición al medio de cultivo de quitosano y los filtrados estériles de <i>Botrytis cinerea</i> y de <i>Fusarium solani</i> sobre el crecimiento celular (g/10 mL peso fresco) (A) y la producción de (+)-medicarpina (mg/g peso fresco) (B), en células en suspensión de <i>Dalbergia congestiflora</i> cultivadas en MST9, a los 16 días del cultivo	62
Figura 20.	Curva de calibración de ácido cinámico (mM) ($\lambda=290$ nm)	75
Figura 21.	Cinética de la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) en células en suspensión de <i>D. congestiflora</i> cultivadas por 20 días en medio MST9 (control), medio MST9 con 20 g/L de sacarosa y medio MST9 con 1 mg/mL de filtrado estéril de <i>Fusarium solani</i> .	76

Índice de Cuadros

		Página
Cuadro 1.	Metabolitos secundarios producidos <i>in vitro</i> a partir del cultivo de suspensiones celulares de árboles.	13
Cuadro 2.	Fitoalexinas producidas en células en suspensión con elicitores.	13
Cuadro 3.	Producción de medicarpina en cultivos <i>in vitro</i> con elicitores bióticos y abióticos.	14
Cuadro 4.	Constituyentes del medio de cultivo MS (pH 5.7) (Murashige y Skoog, 1962).	22
Cuadro 5.	Tratamientos para el establecimiento <i>in vitro</i> de callo de <i>D. congestiflora</i>	23
Cuadro 6.	¹ HNMR Comparación de (+)-Medicarpina con los reportados	44

RESUMEN

Dalbergia congestiflora (campincerán) es un árbol de la familia Fabaceae, en categoría de riesgo de extinción en México (NOM-059-ECOL-2010) y se caracteriza por producir medicarpina en el duramen, fitoalexina de tipo pterocarpano con propiedades medicinales y actividad antimicrobiana. Para realizar los estudios de la producción *in vitro* e identificación de este metabolito, se establecieron cultivos de callos y de células en suspensión, así como los métodos óptimos de extracción, purificación, identificación y cuantificación de medicarpina. Así mismo, se evaluó el efecto de factores abióticos (luz, oscuridad, diferentes concentraciones de sacarosa y de nitratos) y bióticos (quitosano, filtrados estériles de *Botrytis cinerea* y de *Fusarium solani*). En la condición de cultivo con un óptimo crecimiento y de producción de medicarpina, se determinó la actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL), para relacionar el contenido del compuesto con la actividad de esta enzima. La inducción de callo se obtuvo a partir de hojas y tallos de plántulas micropropagadas de *D. congestiflora*, mantenidas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), en los que se evaluó el efecto de diez tratamientos (T1-T10) con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y BA (0, 0.1, 0.25, 1.0 y 1.5 mg/L) sobre la producción de biomasa como gramo (g) de peso fresco (p.f.) y g de peso seco (p.s.), a los 30 días del cultivo. Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en condiciones del cuarto de cultivo (25°C, fotoperíodo de 16 h luz, 2000 luxes). El tratamiento T9 (MST9 con 1.5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA) fue el mejor para la inducción y el crecimiento de callo, con los valores de 2.29 g p.f.; 0.82 g p.s., además presentó mayor friabilidad. Este tratamiento (MST9) se seleccionó para el establecimiento de los cultivos de suspensiones celulares, con un inóculo de 2.5 g de callo en 50 mL de medio líquido, en condiciones de cuarto de cultivo en agitación orbital continua (120 rpm). Se realizaron tres subcultivos cada 16 días hasta obtener células de tamaño óptimo, libres, en división celular y con un 80% de viabilidad, la cual se determinó con el método de tinción con diacetato de fluoresceína. El crecimiento celular se determinó en cinéticas por 24 días en el medio MST9 en callos y suspensiones celulares, con la determinación del inóculo inicial para obtener la biomasa (p.f. y p.s.) cada cuatro días. Los callos con un inóculo inicial de 0.5 g p.f. y cultivados en cajas Petri, mostraron la mayor biomasa a los 24 días con (1.6 g p.f. y 0.9 g p.s.); mientras que las suspensiones celulares alcanzaron la mayor biomasa a los 16 días del cultivo, con una producción de 1.93 g p.f./mL (1.0 g p.s./mL), tres veces más que el inóculo inicial (0.5 g p.f./mL), con lo que se estableció el tiempo de los subcultivos, tanto para callos (24 d) y para las suspensiones celulares (16 d). Estos tiempos se seleccionaron para la determinación del contenido de medicarpina, con el establecimiento de las mejores condiciones de extracción, purificación, identificación y cuantificación de medicarpina. El método de extracción consistió en macerar tanto las células de callo y las suspensiones celulares, con diclorometano en una proporción de 100 mL por 10 g de células (peso fresco). La purificación se obtuvo mediante cromatografía en capa fina, con la que se obtuvo el valor de R_f (0.58); después de eluirse con el mismo disolvente, se caracterizó por espectrofotometría de absorción (200-800 nm), con la observación de los picos característicos (pico uno a 264 nm, pico dos a 274 nm), demostrando su purificación. La confirmación de su identificación se realizó con $^1\text{HRMN}$, con lo que se determinó el enantiómero (+)-medicarpina (6aS,

11aS). La cuantificación se realizó con una curva de calibración a diferentes concentraciones (0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1 y 2 mg/mL) de medicarpina pura (estándar). El contenido máximo de (+)-medicarpina en callos fue de 1.76 mg/g de p.f. a los 24 días, similar a la producción de las células en suspensión con 3.56 mg/g de p.f. a los 16 días del cultivo. Las células en suspensión de *D. congestiflora* con tres subcultivos fueron sometidas a los factores abióticos (luz y oscuridad), fuente de carbono (sacarosa, 20, 30 y 40 g/L) y de nitrógeno (nitratos de amonio y potasio, 50, 100 y 150 %), así como los factores bióticos como el quitosano (0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mg/mL) y filtrados estériles de *B. cinerea* (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/mL) y de *F. solani* (1.0, 5.0 y 10.0 mg/mL). A los 16 días, se determinó el crecimiento y contenido de (+)-medicarpina, obteniendo el mayor crecimiento celular en la condición de luz (1.8 g/10 mL p.f.) y una mayor producción de medicarpina en la oscuridad (1.58 mg/mL), aunque este valor es similar al presentado por las células cultivadas con luz (1.12 mg/mL); este comportamiento, de disminución del crecimiento, se observó en las células tratadas con diferentes concentraciones de sacarosa y de nitrógeno, y con la adición de quitosano, filtrado estéril de *B. cinerea*, notando una relación directa entre un menor crecimiento y un aumento en el contenido de (+)-medicarpina. La mayor producción de (+)-medicarpina se obtuvo con la adición de 1 mg/mL del filtrado estéril de *F. solani* (7.16 mg/mL) sin afectarse el crecimiento celular (1.79 g/10 mL), similar al de células no tratadas. La actividad de PAL fue determinada cada cuatro días en células suspensión cultivadas en MST9 por 20 días, con 20 g/L de sacarosa y 1 mg/mL del filtrado estéril de *F. solani*, utilizando una muestra de 0.5 g de células de cada tratamiento. La actividad de PAL fue determinada por un método espectrofotométrico, determinando la producción de cinamato ($\lambda=290$ nm), expresada en unidades pkat/g de peso fresco (p.f.). La mayor actividad de PAL se observó en las células cultivadas con el filtrado estéril de *F. solani*, alcanzando 434 y 408.34 pkat/g p.f., a los 4 y 16 días, respectivamente. Este incremento fue de 1.31 veces más que la actividad en células no tratadas y 1.14 veces más que las tratadas con 20 g/L de sacarosa, a los 4 días del cultivo. La alta actividad enzimática de PAL observada en las células de *D. congestiflora* sugiere que éstas reconocen a los fragmentos de la pared del hongo estéril (*F. solani*), activando la ruta metabólica de los fenilpropanoides para la producción de fitoalexinas, como la medicarpina. Este incremento de la actividad de la PAL se relaciona directamente con la mayor producción de medicarpina (7.16 mg/mL) por lo que las suspensiones celulares de *D. congestiflora* se proponen como un óptimo sistema para la producción de (+)-medicarpina.

Palabras clave: Callos, Campincerán, Células en Suspensión, *Dalbergia congestiflora*, fenilalanina amonioliase, medicarpina.

ABSTRACT

Dalbergia congestiflora (campincerán) is a tree of Fabaceae family, in the category of risk of extinction in Mexico (NOM-059-ECOL-2010) and is characterized by producing medicarpin in the heartwood, a pterocarpane-type phytoalexine with medicinal properties and antimicrobial activity. For studies of *in vitro* production and identification of this metabolite, the callus cultures and cell suspensions was established, as well as optimal methods of extraction, purification, identification and quantification of medicarpin. The effect of abiotic factors was also assessed (light, darkness, different concentrations of sucrose and nitrate) and biotics (quitosan, sterile filtrates of *Botrytis cinerea* and *Fusarium solani*). In the condition of culture with optimal growth and production of medicarpin, the activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL) was determined to relate the content of the compound to the activity of this enzyme. Callus induction was obtained from leaf and stem segments of micropropagated plantlets of *D. congestiflora*, maintained in the culture medium of Murashige and Skoog (MS) with 0.05 mg/L of benzyladenine (BA), evaluating the effect of ten treatments (T1-T10) with different concentrations of naphthalenacetic acid (ANA) and BA (0, 0.1, 0.25, 1.0 and 1.5 mg/L) over the biomass production as a grame (g) of fresh weight g (f.w.) and dry weight (d.w.), 30 days after cultivation. *In vitro* cultures were kept in the growing room conditions (25 °C, photoperiod of 16 h light, 2000 luxes). Treatment T9 (MST9 with 1.5 mg/L of BA and 0.1 mg/L of ANA) was optimal to achieve induction and higher growth of callus, with the highest biomass values (2.29 g f.w.; 0.82 g d.w.), in addition to having a high level of friability. This treatment (MST9) was selected for the establishment of cell suspensions, initiating the culture with an inoculum of 2.5 g of callus in 50 mL of liquid medium, incubated under room culture conditions in continuous orbital agitation (120 rpm), performing three subcultures every 16 days until obtaining cells with an optimal size, free, in cell division and with a high percentage of viability (80%), determined with the fluorescein diacetate method. Cell growth was determined by growth kinetics for 24 days in MST9 medium of both calluses and cell suspensions, for which the initial inoculum was established and biomass (f.w. and d.w.) was obtained every four days. Calluses with an initial inoculum of 0.5 g f.w. and grown in Petri dishes showed the highest biomass at 24 days with (1.6 g f.w. and 0.9 g d.w.); cell suspensions reached the highest biomass at 16 days of cultivation, producing 1.93 g f.w./mL (1.0 g d.w./mL), tripling the initial inoculum (0.5 g f.w./mL), thus setting the time of subcultures for both calluses (24 d) and cell suspensions (16 d). These times were selected for the determination of the medicarpin content, establishing the best conditions of extraction, purification, identification and quantification of medicarpin. The extraction method consisted of macerating both callus cells and cell suspensions, with dichloromethane at a proportion of 100 mL per 10 g of cells (f.w.). The purification was obtained by thin layer chromatography, identifying it as a band with a R_f of 0.58, which after elution with the same solvent, was characterized by absorption spectrophotometry (200-800 nm), presenting the characteristic peaks (peak one to 264 nm, peak two to 274 nm) that demonstrated its purification.

Confirmation of identification was made with ¹HMRN, determining the enantiomer (+)-medicarpin (6aS, 11aS). The quantification was performed with a calibration curve

developed with different concentrations (0.01,0.02,0.1,0.2,1 and 2 mg/mL) of pure (standard) medicarpin. The maximum content of (+)-medicarpin in callus was 1.76 mg/g f.w. at 24 days, similar to that produced by cells in suspension with 3.56 mg/g of f.w. at 16 days of culture. The cells in suspension of *D. congestiflora* with three subcultures were subjected to changes in abiotic factors such as light (light and darkness), carbon source (sucrose, 20, 30 and 40 g/L) and nitrogen (ammonium and potassium nitrates, 50,100 and 150%), as well as biotic factors such as chitosan (0.1,0.5,1.0 and 5.0 mg/mL) and sterile filtered of *B. cinerea* (0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg/mL) and *F. solani* (1.0, 5.0 and 10.0 mg/mL). Both biomass growth and (+)-medicarpin content were determined at 16 days of cultivation, obtaining a high cell growth in light condition (1.8 g/10 mL f.w.) and higher production of medicarpin in the dark (1.58 mg/mL), although this value is similar to that presented by cells cultivated with light (1.12 mg/mL); this same behavior, of a decrease in growth, was observed in cells treated with different concentrations of sucrose and nitrogen, as well as with the addition of chitosan and sterile filtrated of *B. cinerea*, noting a direct relationship between lower growth and an increase in the content of (+)-medicarpin. The highest production of (+)-medicarpin was obtained with the addition of 1 mg/mL of sterile filtrated of *F. solani* (7.16 mg/mL) without affecting cell growth (1.79 g/10 mL), similar to that of untreated cells. PAL activity was determined every four days in suspension cells grown in MST9 for 20 days, with 20 g/L of sucrose and 1 mg/mL of sterile filtrated of *F. solani*, using a sample of 0.5 g of cells from each treatment. PAL activity was determined by a spectrophotometric method, determining the production of cinnamate ($\lambda=290$ nm), expressed in fresh weight pkat/g units (f.w.). The increased activity of PAL was observed in cells cultured with sterile filtrated of *F. solani*, reaching 434 and 408.34 pkat/g f.w., at 4 and 16 days, respectively. This increase was 1.31 times more than activity in untreated cells and 1.14 times more than those treated with 20 g/L of sucrose, 4 days after cultivation. The high enzymatic activity of PAL observed in *D. congestiflora* cells suggests that they recognize cell wall fragments of the sterile filtrated fungus (*F. solani*), activating the metabolic pathway of phenylpropanoids for the production of phytoalexins, such as medicarpin. This increase in PAL activity is directly related to the increased production of medicarpin (7.16 mg/mL), so the cellular suspensions of *D. congestiflora* are proposed as an optimal system for the production of (+)-medicarpin.

Keywords: Callus, Campincerán, Cells Suspensions, *Dalbergia congestiflora*, medicarpin, phenylalanine amonnia-lyase.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Dalbergia congestiflora Pittier es un árbol de la familia Fabaceae conocido en México como campincerán. Esta especie habita en el bosque tropical caducifolio y ocasionalmente en los bosques en transición con bosque de encinos y se distribuye en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla (Ledis-Linares *et al.*, 2015). Como principal característica presenta un duramen de color rojo-púrpura, considerado de alto valor económico por su durabilidad (Pittier, 1922). Martínez-Sotres *et al.* (2012) reportan que el duramen de los árboles adultos de campincerán contiene medicarpina, cuya molécula es una fitoalexina del grupo de los pterocarpanos, con actividad fungicida y propiedades medicinales.

La medicarpina es producida por diversas plantas, particularmente por especies de la familia Fabaceae como alfalfa, trébol, garbanzo y haba (Southon, 1994). Debido a que es una fitoalexina, su contenido es dependiente de la edad de la planta o de las condiciones de cultivo. Este compuesto puede ser inducido para su producción por factores bióticos como elicitores o inductores, que provienen de paredes celulares de microorganismos patógenos, principalmente de hongos, o por factores abióticos como el estrés hídrico (Guo y Paiva, 1995; Ramírez-Estrada *et al.*, 2006).

Con el método de inducción se han establecido diversos cultivos celulares *in vitro* para el estudio de la producción de diversas fitoalexinas desde hace unos 40 años, entre otros, la faseolina de *Phaseolus vulgaris* (Dixon y Lamb, 1979), el gossipol de *Gossypium hirsutum* (Heinstein y El-Shagi, 1981), la sanguinarina de *Papaver somniferum* (Eilert *et al.*, 1985), la gliceolina en *Glycine max* (Zacharius y Kalan, 1990), la camalexina en *Arabidopsis thaliana* (Zook, 1998), la pisatina en *Pisum sativum* (Borejsza-Wysocki *et al.*, 1997), y más recientemente, el capsidiol en *Capsicum annum* (Ma, 2008), la silimarina en *Silybum marianum* (Rahimi-Ashtiani *et al.*, 2010) y el resveratrol en *Vitis vinifera* (Santamaria *et al.*, 2011). Aunque se han realizado estudios de la producción de medicarpina *in vitro*, como en células en suspensión de

alfalfa (Kessmann *et al.*, 1990) y garbanzo (Mackenbrock *et al.*, 1993), no hay estudios sobre la producción o regulación de la síntesis de la medicarpina en cultivos celulares *in vitro* de *D. congestiflora*.

En la presente investigación se estableció como objetivo la determinación del contenido de medicarpina en cultivos *in vitro* (callos y células en suspensión) de *D. congestiflora*, y la determinación de las condiciones óptimas para el aumento en la producción de medicarpina mediante la aplicación de inductores abióticos y bióticos. En el primer capítulo, se presentan los resultados de las condiciones óptimas de crecimiento de callos y suspensiones celulares; en el segundo capítulo se aborda la identificación y determinación de la medicarpina en los cultivos óptimos de callos y suspensiones; para el tercer capítulo, con la medicarpina ya determinada, se estudiaron las condiciones óptimas para el aumento en la producción con la aplicación de inductores abióticos y bióticos; y finalmente, en el cuarto capítulo se identificó y reaccionó la actividad de la enzima relacionada con el metabolismo secundario y la medicarpina.

2. ANTECEDENTES

En México, el género *Dalbergia* está conformado por 20 especies de las cuales 5 especies son consideradas endémicas que son: *Dalbergia longependunculata*, *Dalbergia modesta*, *Dalbergia rhachiflexa*, *Dalbergia ruddae* y *Dalbergia palo-escrito*, (Linares y Sousa 2007; Ricker *et al.*, 2013). Las especies maderables del género *Dalbergia* se distinguen porque su duramen es considerado de alto valor económico por su belleza, durabilidad y excelentes propiedades físicas, mecánicas y acústicas (Pittier, 1922). Así mismo, hay especies de *Dalbergia* que producen metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas (Rutiaga-Quiñones *et al.*, 1995; Barragán-Huerta *et al.*, 2004; Rutiaga-Quiñones *et al.*, 2010) y de importancia en la etnomedicina (Saha *et al.*, 2013).

2.1. *Dalbergia congestiflora* (Campincerán)

Dalbergia congestiflora pertenece a la familia Fabaceae y es un árbol de hasta 10 m de altura que presenta hojas de 9-20 cm. Las inflorescencias son de 1-4 cm, paniculadas de apariencia capitada o glomerosa, agrupadas hacia el final de ramas defoliadas y ocasionalmente producidas en ramas con hojas. Las flores son sésiles de color blanco o crema, mientras que los frutos son oblongos, a veces pandurados, obtusos en el ápice, atenuados hacia la base, glabros y presentan una semilla por fruto. Esta especie se encuentra enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 de México como una especie en peligro de extinción (P) y también se encuentra enlistada en el Apéndice II de la CITES (SEMARNAT, 2010; CITES 2017).

La madera de *D. congestiflora* se usa para fabricar instrumentos musicales y muebles, además el duramen contiene pigmentos que se usan para dar color a artesanías y éstos pueden ser utilizados como colorantes de alimentos, ejemplo de uno de ellos es la neocandenatona (Barragán *et al.*, 1999; Gutiérrez-Zúñiga *et al.*, 2014). En Puebla, se reporta el uso del duramen para fabricar violines, para la obtención de tinte azul y para fabricar mangos de herramientas rústicas (Ledis-Linares *et al.*, 2015).

Se ha reportado que en el duramen de campincerán, la acumulación de medicarpina, un metabolito secundario de tipo fitoalexina, ha sido relacionada con la durabilidad del duramen y se le atribuye actividad fungicida contra *Trametes versicolor* (Martínez-Sotres *et al.*, 2012). En otras investigaciones, la medicarpina ha sido reportada con diferentes propiedades: antiinflamatorias, antibióticas, antioxidantes, citotóxicas y osteogénicas (Yu *et al.*, 2007; Lianhe *et al.*, 2011; Pérez-Gutiérrez y García-Baez, 2013; Tanejaa *et al.*, 2015).

2.2. Medicarpina

La medicarpina es un pterocarpano (Figura 1) derivada de los isoflavonoides y que es producida por especies de la familia Fabaceae como *Butea monosperma*, *Canavalia* spp., *Caragana* spp, *Centrolobium* spp., *Cicer* spp., *Glycyrrhiza pallidiflora*, *Arachis hypogaea* (cacahuete), *Medicago* spp., *Melilotus* spp., *Ononis* spp., *Tephrosia* spp., *Trifolium* spp., *Vicia faba*, *Vigna unguiculata* y especies del género *Dalbergia* (Southon, 1994).

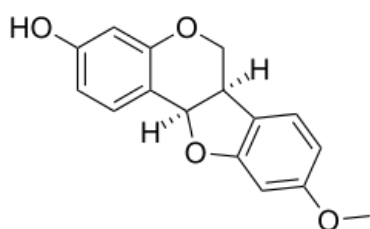


Figura 1. Medicarpina (9-Metoxi-6a,11a-dihidro-6H-[1]benzofuro[3,2-c]cromen-3-ol), $C_{16}H_{14}O_4$ de masa molecular de 270.27 g/mol.

La ruta biosintética de la medicarpina ha sido estudiada en diferentes plantas. En *Medicago truncatula* se elucidó que la ruta inicia con formononetina, una 4'-metoxi-isoflavona, de la cual se derivan la 2-hidroxiformononetina, vestitona, 4'-metoxi-isoflavan-2',4,7-triol, para finalmente formar la medicarpina. Los pterocarpanos en general son sintetizados vía la ruta de los fenilpropanoides, siendo el principal precursor la fenilalanina, la que es biosintetizada por la ruta del ácido shikímico y a

partir de este aminoácido se sintetizan el cumaroil-CoA y malonil-CoA, los cuales se condensan para formar la trihidroxichalcona, cuya molécula es isomerizada a la dihidroxiflavanona que continúa por la vía de los isoflavonoides hasta la síntesis de formononetina, el precursor inmediato de la medicarpina (Oommen, 1994) (Figura 2).

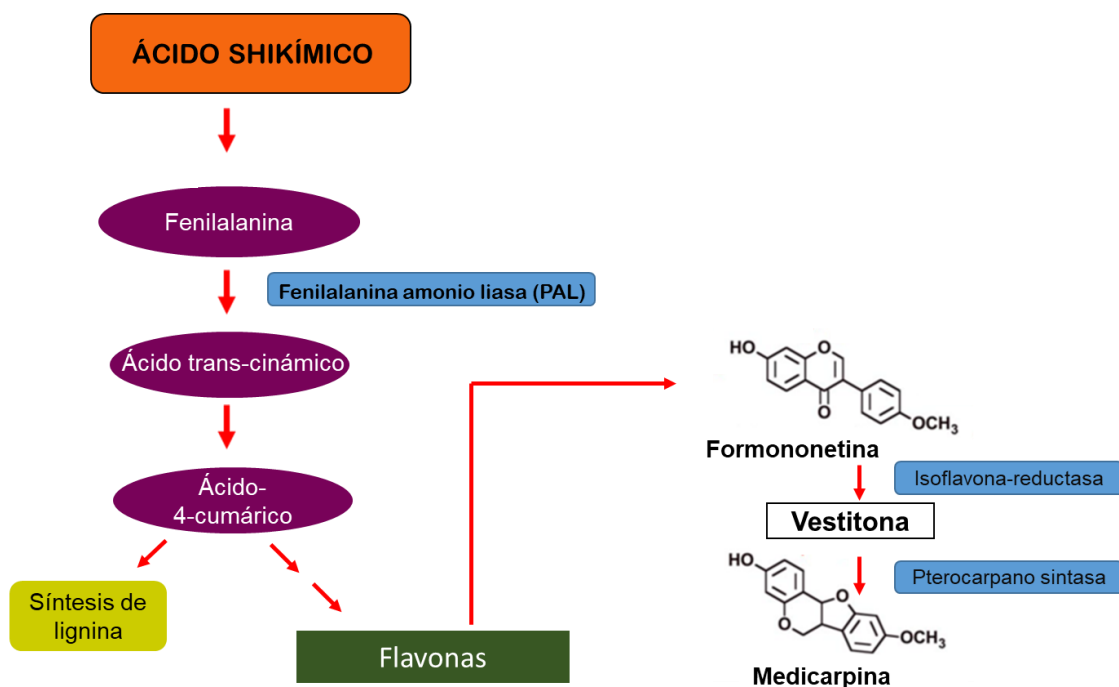


Figura 2. Síntesis de medicarpina (Modificado de Guo y Paiva, 1995; Allen *et al.*, 2000).

En alfalfa (*Medicago sativa*), la síntesis de la medicarpina se ha asociado al ataque de patógenos (Graham *et al.*, 1979) y su ruta biosintética está bien definida. La participación de las principales enzimas involucradas en su biosíntesis se ha elucidado, así como su regulación, la que es a nivel transcripcional (Dixon *et al.*, 1992).

En el duramen de diversos árboles, se producen compuestos del grupo de los fenoles como los ácidos fenólicos y flavonoides, los que proporcionan las propiedades químicas del duramen de plantas jóvenes o maduras (Latorraca *et al.*, 2010). En este

sentido, Haupt *et al.* (2003) encontraron una menor concentración de sustancias extraíbles de la madera en duramen juvenil de *Tectona grandis* (teca) en comparación con el duramen maduro, correspondiente a una baja durabilidad natural de la madera juvenil comparada con la madera madura.

2.2.1. Enantiómeros de la medicarpina

En la molécula de la medicarpina, mediante un análisis por electroforesis capilar (EC), se han descrito dos enantiómeros, (+)-medicarpina (6aS 11aS) y (-)-medicarpina (6aR 11aR), ambos son fitoalexinas que se producen como defensa al ataque de un patógeno. En la figura 3 se describe que ambos provienen de la 2' hidroxiformononetina, la diferencia es la S-vestitona y la R-vestitona (Allen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2017).

El enantiómero (+)-medicarpina se encuentra en alfalfa (*Medicago sativa*) y la (-)-medicarpina en cacahuate (*Arachis hypogea*), la frecuencia reportada es de 3-2 (Allen *et al.*, 2000). La (+)-medicarpina es un inhibidor del crecimiento micelial del hongo *Trametes versicolor* (Martínez-Sostres *et al.*, 2012), inhibe la osteogénesis con un efecto regulador sobre los niveles de expresión de dos genes osteogénicos (Runx-2 y BMP-2) (Goel *et al.*, 2015) y posee actividad citotóxica sobre células de leucemia (Trivedi *et al.*, 2014). Aunque se ha reportado la actividad biológica de este compuesto, en la mayoría de las investigaciones no se indica el tipo de enantiómero utilizado.

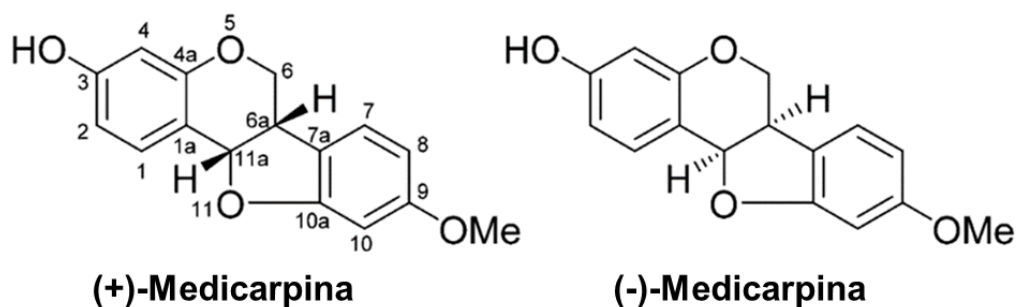


Figura 3. Enantiómeros de medicarpina (Yang *et al.*, 2017).

2.3. Inducción de la síntesis de fitoalexinas

La biosíntesis y acumulación de las fitoalexinas es regulada como una respuesta a diferentes tipos de estrés en plantas (Ingham, 1982). La ruta de síntesis en ciertas células responde a la presencia de “elicitores”, denominado también como inductores, los que activan a algunas enzimas en un periodo de 48 h, incrementando los niveles de la fitoalexinas (Blount *et al.*, 1992).

La respuesta al estrés es regulada por el reconocimiento de metabolitos de hongos y/o bacterias, considerados como elicitores o inductores bióticos, por receptores de la célula vegetal (Smith y Banks, 1986). Ebel (1986) definió a los inductores o “elicitores” como un término utilizado para referirse a compuestos que inducen la síntesis de fitoalexinas en plantas.

En varias especies de pinos se ha demostrado que la acumulación de estilbenos, principal fitoalexina de *Pinus* spp., ocurre desde las primeras semanas del crecimiento de las plántulas (Dercks y Creasy, 1989) y que su contenido aumenta en plantas jóvenes por irradiación con luz ultravioleta (UV) y diferentes tipos de estrés. Gelhert *et al.* (1990) demostraron un incremento de estas fitoalexinas en plántulas de *Pinus sylvestris* con luz UV y por el ataque del hongo *Botrytis cinerea*.

Todas las fitoalexinas del grupo de los pterocarpanos son fácilmente inducidas y muestran patrones de expresión tejido-específico, los que están estrechamente relacionados con las enzimas involucradas al inicio de la síntesis (Oommen, 1994). La actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la medicarpina, tales como la fenilalanil amonioliase (PAL), chalcona sintasa (CHS) e isoflavona reductasa, y los niveles de los correspondientes ARNm, se incrementan varias veces cuando ocurre una elicitación o inducción, por algún mecanismo que simula el ataque de algún patógeno (Dixon *et al.*, 1992).

2.3.1. Elicitores abióticos y bióticos

Según su origen, los elicitores se dividen en dos tipos: abiótico y biótico. Los abióticos pueden considerarse como sustancias de origen no biológico, siendo predominantemente compuestos inorgánicos como sales o factores físicos promoviendo el metabolismo secundario. Algunos ejemplos son la fuente de carbohidratos, nitratos, luz, rayos UV, temperatura y pH (Blount *et al.*, 1992).

Los elicitores bióticos son reconocidos por receptores específicos unidos a la membrana celular como polisacáridos y oligosacáridos, carbohidratos complejos de pared de hongos y plantas, que actúan como estímulo y transferido a la célula por un sistema de transducción de señal, produciendo cambios que conducen a la formación de fitoalexinas (Baenas *et al.*, 2014).

Algunos elicitores de tipo abiótico utilizados son: luz, carbohidratos, cloroformo, cloruro mercúrico, iones (N, C, P y K), vanadato sódico (Na_3VO_4), la irradiación por UV, lesiones mecánicas etc. (Orozco *et al.*, 2002). Los inductores bióticos provienen de hongos (*Phytophthora*, *Fusarium*) y bacterias (*Erwinia carotovora*), en donde químicamente aportan poli y oligosacáridos, péptidos y glicoproteínas. Entre los polisacáridos con actividad elicitora se encuentra la quitina (β -1,4-poliglucosamina) (Arias *et al.*, 2009; Enríquez-Guevara *et al.*, 2010).

La respuesta de las plantas al estrés inducido por el elicitor comienza en la membrana plasmática celular, aunque hay varios receptores en el citosol, asociados con el núcleo y la membrana citosólica (García-Brugger *et al.*, 2006). La transducción de la señal del elicitor es percibida por los receptores, lo que implica la acción al núcleo, que en segundos llega al ADN, desencadenando aún más la señal para otras reacciones en cascada, produciéndose una respuesta en la expresión y transcripción de genes, lo que aumenta los ARNm para la síntesis de enzimas relacionadas con la defensa de la planta y la producción de metabolitos secundarios tipo fitoalexina (Figura 4) (Ebel *et al.*, 1998).

Se han realizado diversas investigaciones para aislar moléculas de señal del elicitor e identificar los receptores correspondientes. Como los elicitores pueden inducir reacciones en diferentes especies, parecería que las plantas tienen receptores comunes para su percepción. Se han identificado varios sitios de unión de elicitor en membranas plasmáticas celulares para una gama de elicitores de diferentes estructuras químicas. Además, la variabilidad de estos mecanismos de acción implica una amplia gama de respuestas metabólicas (Zhao *et al.*, 2005).

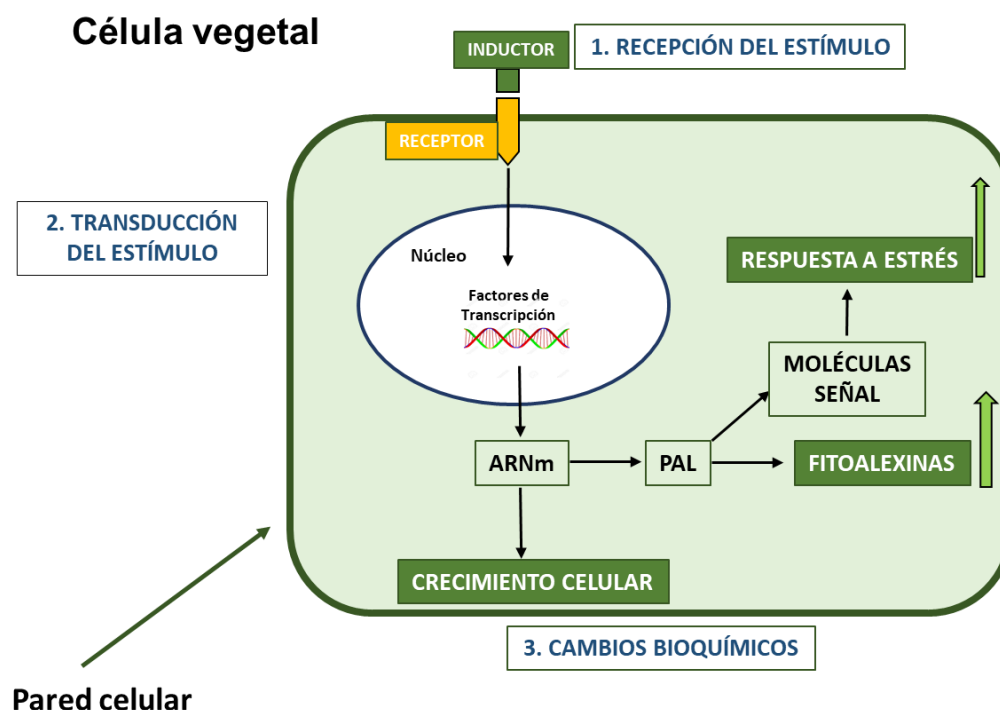


Figura 4. Mecanismo general de respuesta al estrés en células vegetales (Modificado de Sashimita *et al.*, 2018).

La inducción de la síntesis de fitoalexinas con el uso de elicitores tanto del tipo biótico como abiótico, se ha probado en cultivos celulares *in vitro*, como en callos y células en suspensión de diversos tipos de plantas, de aquí, la importancia del cultivo de tejidos vegetales como una herramienta biotecnológica para el estudio y producción de metabolitos secundarios *in vitro*, en particular del tipo fitoalexina (Pérez *et al.*, 1999).

2.4. Producción *in vitro* de metabolitos secundarios

Actualmente las técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* son aplicadas a una gran variedad de especies ofreciendo nuevas posibilidades para el desarrollo de estrategias de solución a problemas agrícolas y biodiversidad vegetal. Una gran parte de la investigación sobre productos vegetales se ha enfocado principalmente en la utilización de suspensiones celulares, con lo cual se han encontrado condiciones de cultivo óptimas para algunos compuestos de interés industrial (Pérez *et al.*, 1999). Los cultivos de órganos (brotes y raíces) son los que han superado las limitaciones y problemas en la síntesis y toxicidad de los metabolitos, en la actualidad existen diversos sistemas de producción de ciertos metabolitos secundarios.

La productividad de los cultivos *in vitro* puede incrementarse modificando las condiciones ambientales (temperatura, pH, luz), los componentes del medio (metales, sacarosa, aminoácidos) o la densidad del inóculo. Además, a través de esta técnica, se pueden obtener compuestos de menor complejidad y eliminar productos indeseables (Charlwood *et al.*, 1990; Luczkiewicz y Cisowski, 2001).

De acuerdo a Topete *et al.* (1991), las ventajas que presenta el cultivo de tejidos vegetales con respecto al cultivo tradicional de la planta completa son: 1) Independencia de las condiciones climáticas adversas y de los problemas de plagas; 2) Control del suministro del producto independiente de la disponibilidad de la planta; 3) Sistema de producción bajo condiciones controladas y optimizadas; 4) Producción más consistente en cuanto a calidad y rendimiento del producto; 5) Es posible lograr mejores rendimientos con respecto a los obtenidos por el cultivo de la planta completa; 6) Mínimas necesidades de espacio para el desarrollo de la producción; 7) Población celular uniforme y facilidad de extracción del producto.

Debido a lo anterior, el cultivo de tejidos representa una alternativa biotecnológica viable para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios. Los sistemas de cultivo

de callos y suspensiones celulares son dos de las herramientas del cultivo de tejidos de plantas, utilizados para el estudio y la producción de metabolitos secundarios.

2.4.1. Cultivos de callos

El tejido calloso está compuesto por células que muestran características similares a las del parénquima y sus características dependen de los reguladores de crecimiento utilizados, de la especie y del órgano del que fue tomado el explante inicial, así como de las condiciones físicas de incubación (Pérez *et al.* 1999). La inducción de callo a partir de una porción vegetal sucede cuando el inóculo ya aséptico se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua (Dodds y Roberts, 1995).

El cultivo de callo puede dividirse en las etapas siguientes: (Dodds y Roberts, 1995).

- a) Inducción.** En esta etapa, las células de inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- b) Proliferación celular.** Durante esta fase, el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- c) Inducción de la diferenciación.** En esta fase, se promueve la diferenciación celular y expresión de algunas vías metabólicas que llevan a la formación de metabolitos secundarios.
- d) Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.** Las células dejan de dividirse de manera exponencial, lo que las lleva a detener su crecimiento.

2.4.2. Cultivos de células en suspensión

Se le denomina cultivo de células en suspensión, al cultivo *in vitro* de células vegetales aisladas o en pequeños agregados, que provienen de tejidos callosos, distribuidas en un medio nutritivo líquido y en constante movimiento, las cuales presentan una alta tasa de división celular y una homogeneidad relativamente alta

(Pérez *et al.*, 1999). Éstas, se han utilizado como sistemas para llevar a cabo diferentes procesos como el aislamiento y purificación de enzimas de origen vegetal y para la producción de metabolitos secundarios importantes en la medicina, industria alimenticia y de perfumería (Pérez *et al.*, 1999).

Las ventajas de la producción de metabolitos secundarios en células en suspensión en comparación con la de plantas enteras, son: 1) Se producen compuestos útiles en condiciones controladas independientemente de los cambios climáticos o las condiciones del suelo; 2) Las células cultivadas están libres de microbios y otros organismos patógenos; 3) Las células de cualquier planta, tropical o alpina, podrían multiplicarse fácilmente para producir sus metabolitos específicos; 4) El control automatizado del crecimiento celular y la regulación racional de los procesos de metabolitos reducirían los costos de mano de obra y mejorarían la productividad; 5) Las sustancias orgánicas se pueden extraer por métodos convencionales de este tipo de cultivo *in vitro* (Dodds y Roberts, 1995).

En particular, otra ventaja de los cultivos celulares es que, cuando se requieren de altas cantidades de metabolitos de árboles, que presenten un lento crecimiento, difícil propagación y con un escaso número de individuos, dichos metabolitos pueden producirse sin utilizar este tipo de árboles. Es por eso, que con el método de cultivo *in vitro*, se han establecido suspensiones celulares de árboles para estudiar y producir metabolitos secundarios de gran interés (Cuadro 1).

2.4.3. Inductores en cultivos *in vitro*

El uso de elicitores o inductores es una de las técnicas más eficientes utilizadas actualmente para mejorar la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* como callos y células en suspensión (Ramírez-Estrada *et al.*, 2006). Para la producción de fitoalexinas en cultivos *in vitro*, diversos estudios del efecto de inductores bióticos (filtrados de hongos, quitosano, glucanos) y abióticos (ácido salicílico, jasmonatos, peróxidos etc.), algunos se describen en el (Cuadro 2).

Cuadro 1. Metabolitos secundarios producidos *in vitro* a partir del cultivo de suspensiones celulares de árboles.

Especie	Uso	Metabolitos secundario	Referencia
<i>Podophyllum exandrum</i>	Desinfectante y aséptico	Podofilotoxinas	Van Uden, 1993
<i>Taxus chinensis</i>	Medicina anticancerígenos	Taxoides	Dong y Zhong, 2002
<i>Catharanthus roseus</i>	Alcaloides	Ajmalicina	Shohael <i>et al.</i> , 2006
<i>Azadirachta Indica</i> (neem)	Bioinsecticida	Azaridactina	Orozco-Sánchez y Rodríguez- Monroy, 2007
<i>Eucalyptus cinerea</i> (eucalipto)	Antifúngicos y antibacterianos	1,8-Cineol	Orozco <i>et al.</i> , 2009
<i>Prosopis laevigata</i> (mezquite)	Goma	Arabino galactano	Trejo <i>et al.</i> , 2010

Cuadro 2. Fitoalexinas producidas en células en suspensión con elicitores.

Fitoalexina	Especie	Inductor	Referencia
Faseolina	<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Dixon <i>et al.</i> , 1982
Glyceolina	<i>Glycine max</i> L. (soya)	<i>Phytophthora megasperma</i>	Fett y Zacharius 1982
Pisatina	<i>Pisum sativum</i> L. (chícharo)	Glucanos	Borejsza-Wysocky <i>et al.</i> , 1997
Resveratrol	<i>Vitis vinífera</i> (uva)	Ácido salicílico, jasmonatos, quitosano	Righetti <i>et al.</i> , 2007
Capsidiol	<i>(Capsicum annum</i> L.) (chile)	Ácido jasmónico peróxido de hidrógeno	Sülün <i>et al.</i> , 2014

La producción de medicarpina se ha estudiado con el uso de inductores en cultivos tanto de callos como de suspensiones celulares, en plantas como la alfalfa, frijol y el trébol (Cuadro 3). En los cultivos de callos de frijol, se ha reportado 42.5 µg/g de medicarpina, en células en suspensión de alfalfa (*Medicago sativa*) Cv. Apolo A-12 se logró producir 0.155 µL/g de medicarpina mediante la inducción con pared celular de *C. lindemuthianum*.

Cuadro 3. Producción de medicarpina en cultivos *in vitro* con elicitores bióticos y abióticos.

Especie	Cultivo	Inductor	Fitoalexina	Contenido µg/g	Referencia
<i>Canavalia ensiformis</i> (frijol)	callos	<i>Pithomyces chartarum</i>	Medicarpina	42.5	Gustine y Sherwood, 1978
<i>Trifolium repens</i> (trébol)	callos	Cloruro de mercurio DDT		0.1, 0.15	Gustine, 1987
<i>Medicago sativa</i> Cv. Apolo A-12 (alfalfa)	Células suspensión	Pared celular <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>		0.155	Ni et al., 1996
<i>Cicer arietinum</i> (garbanzo)	Células suspensión	Enzima		270.27 (24 h)	Mackenbrock et al., 1993

3. JUSTIFICACIÓN

La madera de *Dalbergia congestiflora* es comercializada para diferentes usos y actualmente, el duramen adquirió un valor agregado por la presencia de sustancias como colorantes, fungicidas y medicinales. Entre las sustancias fungicidas se encuentra la medicarpina, la cual es un metabolito secundario que aporta durabilidad natural al duramen.

Como los estudios de identificación y cuantificación de medicarpina se han realizado solo en árboles adultos de *D. congestiflora*, se considera de principal interés estudiar su producción en cultivos *in vitro* como son los callos y suspensiones celulares. Esto tiene el propósito de conocer y analizar los mecanismos que lleven al aumento de la producción al variar las condiciones de cultivo y al utilizar inductores abióticos y bióticos. Lo anterior, con fines de proponer el uso de cultivos *in vitro* de *D. congestiflora* para la extracción de medicarpina, sin explotar los individuos silvestres, debido al estado de vulnerabilidad en que se encuentran sus poblaciones.

4. HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* de callos y suspensiones celulares de *Dalbergia congestiflora* sintetizan medicarpina de acuerdo a las condiciones de cultivo.

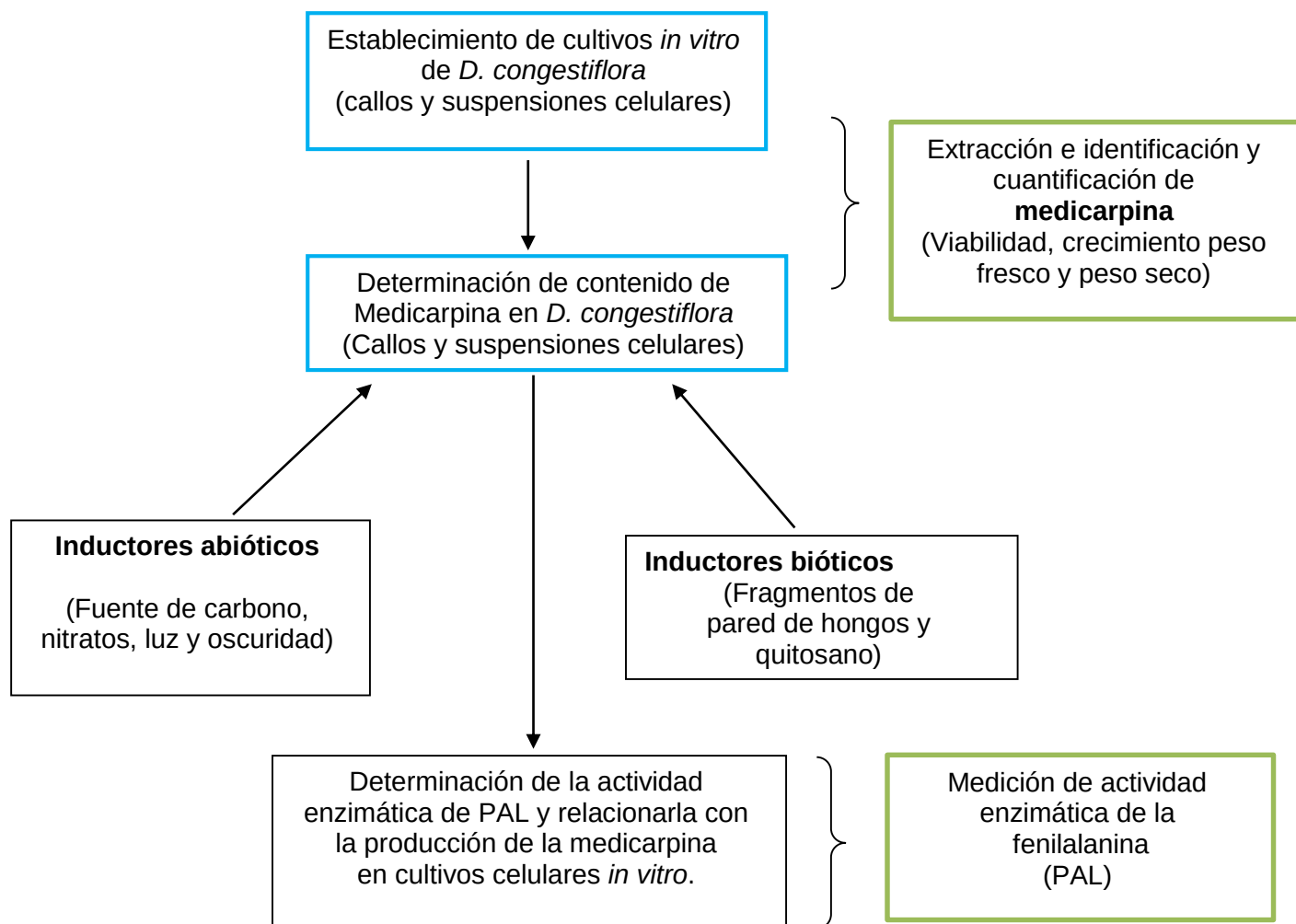
5. OBJETIVO GENERAL

Identificar y evaluar la producción de medicarpina en callo y suspensiones celulares de *Dalbergia congestiflora* en diferentes condiciones de cultivo.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer y determinar el crecimiento de cultivos *in vitro* de callos y suspensiones celulares de *D. congestiflora*.
2. Determinar la producción de medicarpina en callos y en células en suspensión de *D. congestiflora*.
3. Evaluar el efecto de los inductores bióticos y abióticos sobre la producción de medicarpina en células en suspensión *D. congestiflora*.
4. Determinar la actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL) en células *in vitro* de *D. congestiflora* y relacionarla con la producción de medicarpina.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO 1

Establecimiento y determinación del crecimiento de cultivos *in vitro* de callos y suspensiones celulares de *Dalbergia congestiflora*

1.1. Resumen

Dalbergia congestiflora (campincerán: Fabaceae) es un árbol en categoría de riesgo de extinción en México (NOM-059-ECOL-2010) y se caracteriza por producir la fitoalexina medicarpina entre otros metabolitos secundarios. Para realizar estudios de producción *in vitro* de este metabolito, se establecieron cultivos para la inducción de callo y obtención de suspensiones celulares, determinando el desarrollo mediante cinéticas de crecimiento. La inducción de la formación de callos fue por segmentos de tallo y hojas de plántulas micropropagadas de *D. congestiflora*, mantenidas en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), evaluando el efecto de diez tratamientos con diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y BA (0, 0.1, 0.25, 1.0 y 1.5 mg/L) a los 30 días del cultivo. Los cultivos *in vitro* fueron mantenidos en condiciones del cuarto de cultivo 25°C, fotoperíodo de 16 h luz, 2000 luxes. El tratamiento T9 (MST9) fue el mejor para lograr la inducción y el mayor crecimiento de callo, ya que en éste se presentaron los valores más altos de biomasa 2.29 g peso fresco, p.f.; 0.82 g peso seco, p.s., además se presentó mayor friabilidad. El tratamiento MST9 fue seleccionado para establecer el cultivo de suspensiones celulares, iniciando con 2.5 g de callo como inóculo en 50 mL del medio MST9, mantenidas en condiciones de cuarto de cultivo, agitación orbital continua de 120 rpm, realizando tres subcultivos por 15 días hasta obtener células de tamaño óptimo, libres, en división celular y con 80% de viabilidad, determinada con el método de tinción con diacetato de fluoresceína. Los resultados demuestran que se establecieron las condiciones y medios de cultivo mejores para la inducción y crecimiento de callo de *D. congestiflora*, logrando establecer las suspensiones celulares. Con el fin de determinar el crecimiento celular, se realizaron cinéticas de crecimiento durante 24 días en medio MST9 tanto de callos y suspensiones celulares, se estableció el inóculo inicial y se obtuvo la biomasa p.f. y p.s. cada cuatro días. Los callos con un inóculo inicial de 0.5 g p.f. y cultivados en cajas Petri, mostraron la mayor biomasa a los 24 días con 1.6 g p.f. y 0.9 g p.s., las suspensiones celulares alcanzaron la mayor biomasa a los 16 días del cultivo, produciendo 1.93 g p.f./mL (1.0 g p.s./mL), triplicando el inóculo inicial (0.5 g p.f./mL). Con estos resultados el tiempo seleccionado para realizar los subcultivos y realizar las determinaciones de medicarpina para estudios posteriores es en callos (24 d) y para las suspensiones celulares (16 d).

Palabras clave: Callos, campincerán, cultivos *in vitro*, medicarpina, suspensiones celulares.

1.1.1. Abstract

Dalbergia congestiflora (campincerán: Fabaceae) is a tree in category of risk of extinction in Mexico (NOM-059-ECOL-2010) and is characterized by producing the

phytoalexin medicarpin and other secondary metabolites. In order to realize studies for *in vitro* production of this metabolite, *in vitro* cell cultures of *D. congestiflora* were established for the induction of callus and cell suspensions, determining cell development through growth kinetics. The induction of callus formation was carried out in segments of stem and leaves (explants) of micropropagated plantlets of *D. congestiflora*, maintained in the culture medium of Murashige and Skoog (MS) with 0.05 mg/L benzyladenine (BA), evaluating the effect of ten treatments (T1-T10) with different concentrations of naphthalenacetic acid (NAA) and BA (0, 0.1, 0.25, 1.0 and 1.5 mg/L) within 30 days of culture. The *in vitro* cells were kept in conditions of the culture room (25° C, photoperiod of 16 h light, 2000 Lux). Treatment T9 (MST9) was optimal for induction and the better growth of callus, since this presented the highest values of biomass (2.29 g fresh weight, f.w.; 0.82 g dry weight, d.w.), in addition to present a high degree of friability. This treatment (MST9) was selected for the establishment of cell suspensions, starting the cultures with an inoculum of 2.5 g of callus in 50 mL of the medium MST9 incubated under conditions of culture room in continuous orbital agitation with 120 rpm, making three subcultures every 15 days until obtaining cells with an optimum size, free cells, cell division, and with a high percentage of viability (80%), determined with the method of staining with fluorescein diacetate. The results showed that the conditions and culture media were determined for obtain an optimum induction and growth of callus of *D. congestiflora* and to established cell suspensions. In order to determine the cellular growth, growth kinetics of callus and cell suspension were realized for 24 days on MST9 medium, establishing the initial inoculum to obtain biomass as fresh and dry weight (f.w. and d.w.) every four days. Callus with an initial inoculum of 0.5 g f.w. and grown in Petri dishes, showed the highest biomass content at 24 days with 1.6 g f.w. (0.9 g d.w.); cell suspensions achieved greater biomass to the 16 days of the culture, producing 1.93 g f.w./mL (1.0 g d.w./mL), three times the initial inoculum (0.1 g f.w./mL). With these results is proposed to select the time to realize subcultures for callus (24 d) and for cell suspensions (16 d), as well as to make determinations of medicarpin in subsequent studies.

Keywords: Callus, campincerán, *in vitro* cultures, medicarpin, cell suspensions.

1.2. Introducción

Las células de las plantas son importantes biocatalizadores que pueden ser usados para la obtención de diferentes tipos de productos como: farmacéuticos, fragancias, saborizantes, colorantes y bioinsecticidas (Lee, 1996). Las células también pueden utilizarse para metabolizar un amplio conjunto de compuestos suministrados exageradamente, proceso conocido como biotransformación y lo realizan a través de varias reacciones (Orozco, 2002). Sin embargo, la producción de los compuestos

anteriores implica un conocimiento de la biotecnología vegetal, en especial de la técnica de cultivo de tejidos para manipular una serie de variables (Sajc *et al.*, 2000).

El duramen de *D. congestiflora*, es de color púrpura y se ha reportado que contiene un metabolito secundario llamado medicarpina, cuya molécula es una fitoalexina del grupo de los pterocarpanos con actividad fungicida y propiedades medicinales (Bhargavan *et al.*, 2012, Martínez-Sotres *et al.*, 2012). Esta especie está reportada en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2010). Algunas poblaciones se encuentran en el estado de Michoacán y es conocida con el nombre de campincerán (SEMARNAT, 2010). Es de interés el conocer, producir y aplicar las técnicas de cultivo de tejidos en esta especie ya que se han realizado estudios de obtención de este metabolito en células en suspensión en Fabaceas como la alfalfa (Oor *et al.*, 1998), pero no en *D. congestiflora*. Por ello, el objetivo de este capítulo fue el de establecer y determinar el crecimiento de los cultivos de callos y células en suspensión de *D. congestiflora* para poder continuar con estudios de biotecnología para la producción de medicarpina.

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Material biológico

Los explantes se obtuvieron de segmentos de hoja y tallo de plántulas micropropagadas de *Dalbergia congestiflora* (Figura 5), para el establecimiento *in vitro* de callos, mismos que se mantuvieron *in vitro* en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) (Cuadro 4) con 0.05 mg/L de benciladenina (BA) (Hernández, 2014) y se incubaron en el cuarto de cultivo del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en condiciones de temperatura de 25°C y un fotoperíodo de 16 horas luz con una intensidad de 2000 luxes.



Figura 5. Plántula de *D. congestiflora* in vitro.

Cuadro 4. Constituyentes del medio de cultivo MS (pH 5.7) (Murashige y Skoog, 1962).

Componente	mg/L
(NH ₄) NO ₃	1 650
KNO ₃	1 900
Ca Cl ₂ 2 H ₂ O	440
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	370
FeSO ₄ 7 H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.25
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	0.025
Co Cl ₂ 6 H ₂ O	0.025
Myo-Inositol	100
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	0.1
Glicina	2.0
Sacarosa	30 000

1.3.2. Establecimiento de suspensiones celulares de *D. congestiflora*

Este proceso se llevó a cabo en dos etapas: la primera fue la obtención de callo celular y la segunda el establecimiento de las suspensiones celulares.

1.3.2.1. Inducción de callo

Los explantes ya establecidos fueron sembrados en el medio MS con diferentes concentraciones de benciladenina y ácido naftalenacético (BA/ANA) para inducir la formación de callo. Las combinaciones de BA/ANA dieron lugar a diez tratamientos (T1-T10), en concentraciones de mg/L (Cuadro 5).

Fue utilizado el medio MS con agar (8 g/L), sacarosa (30 g/L) y un pH de 5.7. Los reactivos del medio MS fueron de la marca J. Baker® y Sigma®. Los parámetros evaluados fueron diámetro de crecimiento (cm), peso fresco (p.f.) y peso seco (p.s.) a los 30 días de cultivo.

Cuadro 5. Tratamientos para el establecimiento *in vitro* de callos de *D. congestiflora*.

TRATAMIENTOS	BA (mg/L)	ANA (mg/L)
T1	0.1	0.0
T2	0.1	0.1
T3	0.25	0.0
T4	0.25	0.1
T5	0.5	0.0
T6	0.5	0.1
T7	1.0	0.0
T8	1.0	0.1
T9	1.5	0.1
T10	1.5	1.0

1.3.2.2. Obtención de suspensiones celulares

El establecimiento de las suspensiones celulares se realizó en el medio de mejor de crecimiento de callo (MST9, 30 g/L de sacarosa, suplementado con 1.5 de BA y 0.1 ANA mg/mL) y mantenido en líquido sin agar con un pH de 5.7. Las suspensiones fueron obtenidas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo y 2.5 g de callo (peso fresco), que fueron incubados en agitación continua en un agitador orbital a 120 rpm, con un fotoperiodo 16 h/luz y temperatura de 25 °C (Dodds y Roberts, 1995).

Posteriormente se realizaron tres subcultivos de cada 15 días cada uno, que consistieron en tomar inóculos de 10 mL por cada matraz y cultivar en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de medio MST9 líquido. Esto se realizó hasta obtener suspensiones celulares con un mínimo de agregados celulares, una óptima división celular y con alta viabilidad celular.

1.3.3. Pruebas de viabilidad

Las pruebas de viabilidad se realizaron en base la técnica de Widholm (1972), utilizando diacetato de fluoresceína (DAF) a una concentración de 5 mg/L (esta solución se almacena a 0°C). La tinción se realiza con la mezcla de 10 µL de la solución de DAF y 10 µL de la suspensión celular en un portaobjetos. Después de 1 minuto se observó al microscopio (Nikon®) de fluorescencia (250 nm) y se procedió a realizar el conteo de células fluorescentes (viables) y total de células presentes. Para el conteo se ubicaron tres campos al azar en cada muestra y se obtuvo la media de los valores. La viabilidad se expresó en (%) y se determinó de la manera siguiente:

$$\% \text{ VIABILIDAD} = \frac{\text{NÚMERO DE CÉLULAS FLUORESCENTES}}{\text{NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS}} \times 100$$

1.3.4. Cinéticas de crecimiento

Cinética de crecimiento del cultivo de callo. Las cinéticas de crecimiento de callos se realizaron por la siembra inicial de 0.5 g de peso fresco en cajas Petri de 5 cm de diámetro con el medio de crecimiento MST9. El crecimiento en condiciones de cultivo fue por 24 días y se determinaron los parámetros de peso fresco (g) y seco (g) del callo cada 4 días (n=3).

Cinética de crecimiento en suspensiones celulares. Para realizar las cinéticas de crecimiento de las suspensiones celulares, se iniciaron con un inóculo de 0.5 g de células establecidas de las suspensiones celulares. La siembra se realizó en matraces Erlenmeyer de 25 mL con un volumen de 10 mL del medio MST9. La cinética de crecimiento se realizó a lo largo de 24 días de cultivo, tomando muestras cada 4 días (n=3), obteniendo el peso fresco (g/mL) y peso seco (g/mL).

1.3.5. Determinación de crecimiento

Cultivo de callo. El peso fresco (p.f.) fue determinado para cada muestra. La masa celular se colocó sobre papel filtro y se pesó en la balanza analítica (marca MC1 Analytic AC Santorius, USA). El peso seco (p.s.) fue determinado para cada muestra en una estufa de secado a temperatura de 50 °C por 24 h y después las muestras se pesaron en la balanza analítica sobre papel filtro.

Suspensiones celulares. El p.f. fue determinado para cada muestra de la forma siguiente: la masa celular se solocó sobre papel filtro Whatman No.1 (tarado previamente) y se realizó un filtrando al vacío por 2 minutos y después se pasó al pesando de las muestras en balanza analítica. El p.s. fue determinado para cada muestra a una temperatura de 50 °C por 24 h y después se pasó al pesado en la balanza analítica.

1.4. Resultados

1.4.1. Inducción al callo

En los segmentos de hoja y tallo, a los ocho días de cultivo se presentó la formación de nuevo tejido celular nombrado callo (Figura 6). A los 30 días se evaluaron los parámetros de crecimiento en los diez diferentes tratamientos con las diversas concentraciones de BA/ANA.

En la figura 7 se observa el crecimiento de los segmentos, la evaluación del peso fresco mostró valores menores en los tratamientos T1, T2, T4, T5, T6, T7 y T8 con valores inferiores de 1.72 g. En el T3 y en el T9, se obtuvo el mayor crecimiento con un peso (fresco) de 2.05 g y 2.29 g, respectivamente. El peso seco de los segmentos indica que el mayor contenido de biomasa se logró con el tratamiento T9 con 0.82 g y el menor peso se obtuvo en el T3 con 0.18 g. Al observar en conjunto los resultados obtenidos con las variables p.f. y p.s., el T9 presentó la mayor cantidad de biomasa, por lo que fue seleccionado como el óptimo para obtener mayor volumen del desarrollo de callo y para el establecimiento de suspensiones celulares de *D. congestiflora*. Adicionalmente al observar la morfología del crecimiento del callo (Figura 8), se notó que generalmente fue radial y la mejor apariencia de segmentos friables con un 70%, característica que se requiere para establecer células en suspensión (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).



Figura 6. Segmentos de plántulas *in vitro* de *D. congestiflora* para la inducción de callo: A) Tallo; B) Hoja; y C) Callo. A los 8 días del cultivo.

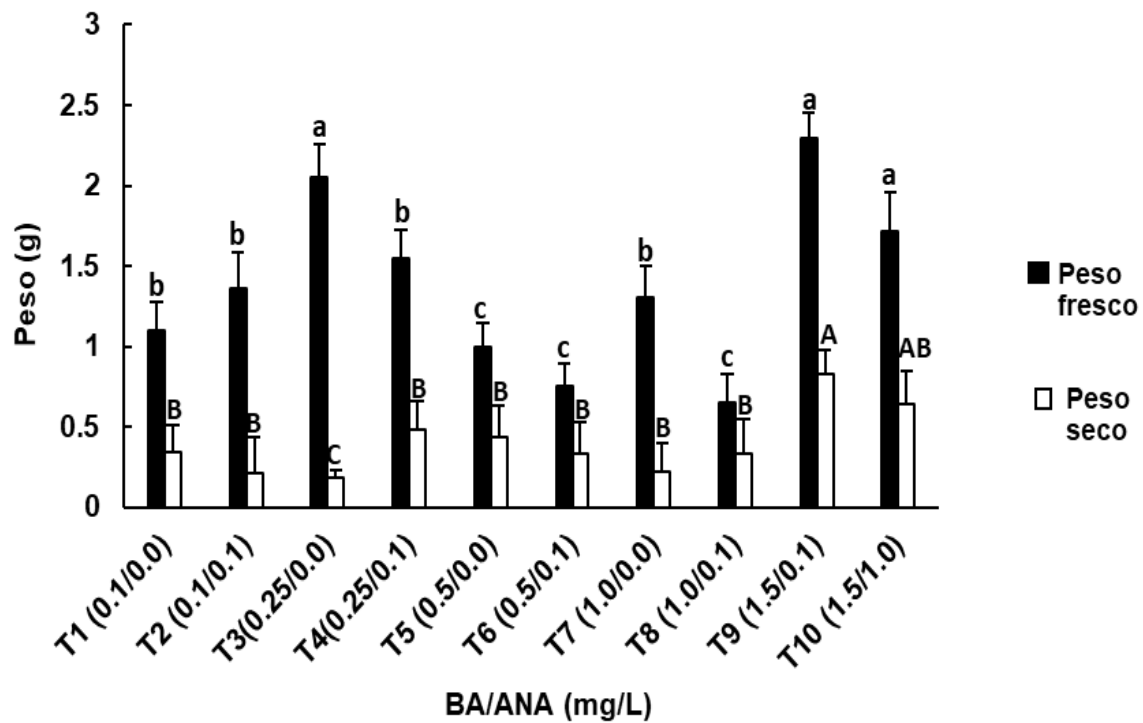


Figura 7. Peso fresco y Peso seco a 30 días de cultivo en los tratamientos (BA/ANA). *Letras diferentes indican diferencias significativas (n=5, $p<0.05$).

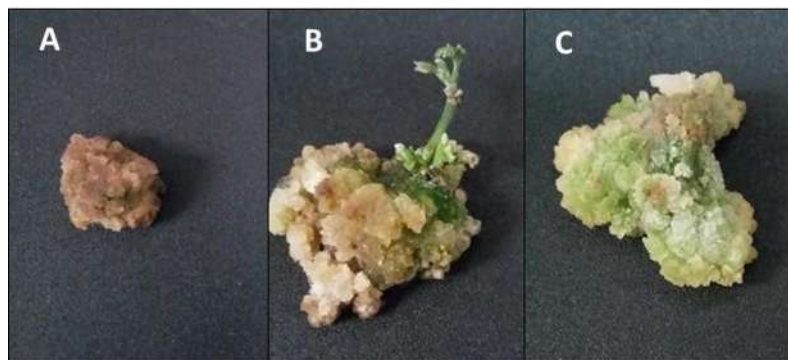


Figura 8. Morfología de callos de *D. congestiflora* con tratamientos de BA/ANA: A) T1 (0.1/0.0); B) T3 (0.25/0.0); y C) T5 (1.5/0.1).

1.4.2. Obtención de suspensiones celulares

Se realizó el establecimiento de las células en suspensión en medio líquido MST9 y al primer cultivo se le verificó la viabilidad celular como característica de crecimiento (Figura 6), se observaron células en división celular, pequeños agregados celulares, células libres y algunas de ellas de forma esférica, tales características deben considerarse para lograr establecer una óptima suspensión celular (Calva y Pérez, 2005).

1.4.3. Pruebas de viabilidad

Se realizó una primera prueba de viabilidad a los 14 días del primer subcultivo y el resultado fue de 80% como se observa en la Figura nueve, el valor persistió en los subcultivos posteriores. Al material obtenido del tercer subcultivo, se le realizó la evaluación de la cinética de las suspensiones celulares.

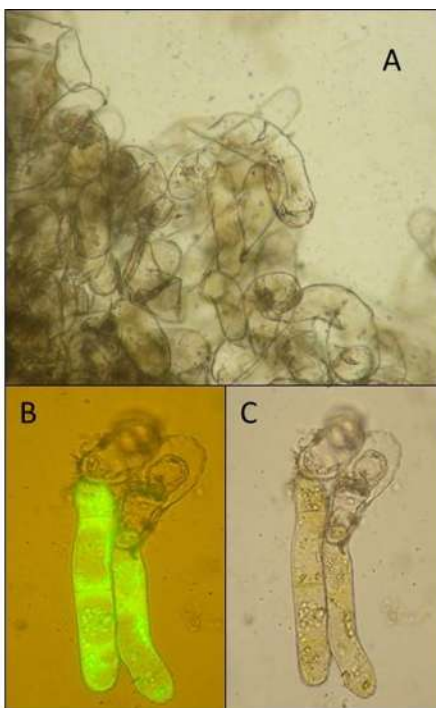


Figura 9. Células en suspensión de *D. congestiflora* con DFA al 0.5%: A) Conjunto de células; B) Células viables (fluorescentes con UV) y C) Células sin fluorescencia.

1.4.4. Cinéticas de crecimiento

Cinética de crecimiento de callo. En los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento del callo en peso fresco (Figura 10A), se observa que la biomasa alcanzó un peso máximo de 1.6 g a los 24 días de cultivo que es 3 veces más en relación al inóculo inicial. Sin embargo, en el periodo de los 20 a los 24 días no se observó un aumento significativo por lo que se debe considerar que el crecimiento óptimo del callo en peso fresco es a los 24 días de cultivo.

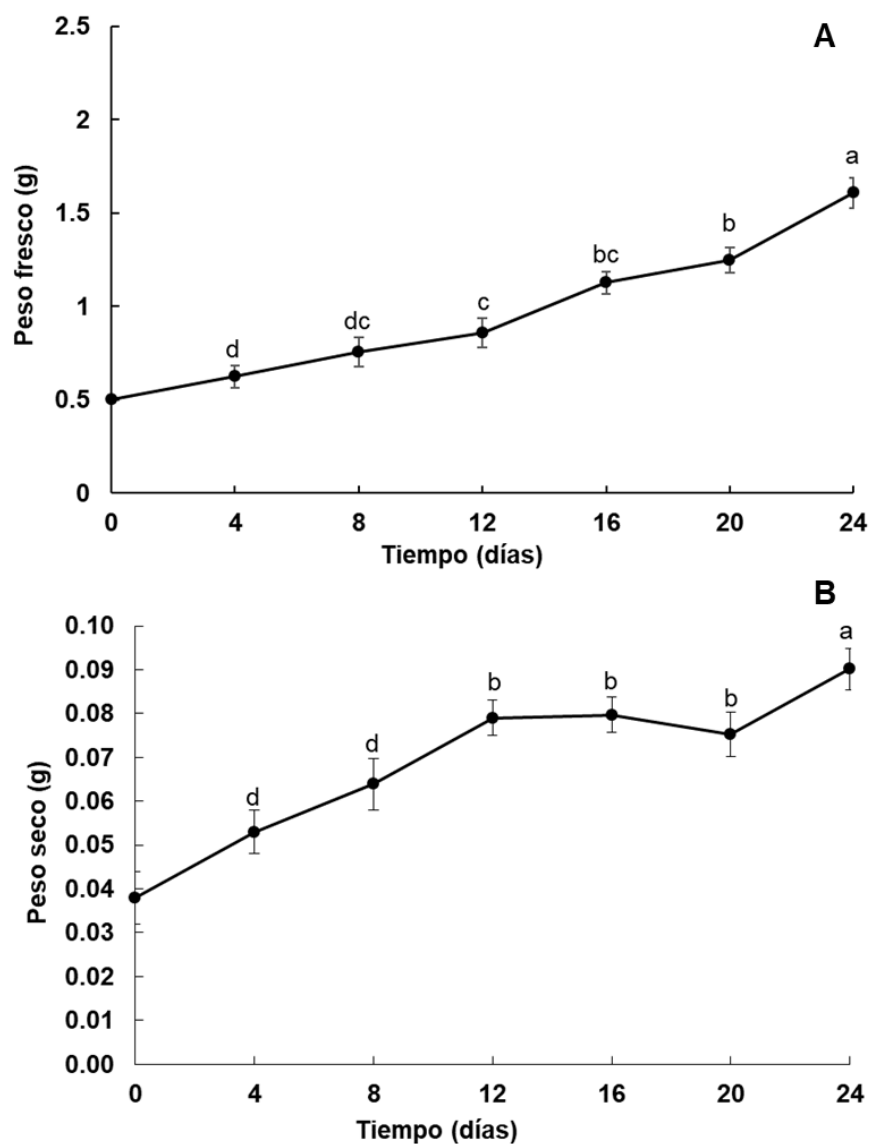


Figura 10. Cinéticas de crecimiento de callo de *D. congestiflora*: A) Peso fresco; y B) Peso seco.

Respecto a los resultados de la cinética al crecimiento del callo en peso seco (Figura 10B) se observa un crecimiento de 0.9 g a los 24 días, que no mostró diferencias significativas con lo obtenidos en los días subsiguientes.

Con base en los resultados de las cinéticas de crecimiento de peso fresco y peso seco para callo, es que a los 24 días de cultivo alcanza su mayor crecimiento y por ello, a este tiempo se realizarán los subcultivos y se tomarán todas las muestras para las determinaciones de los estudios posteriores.

Cinética de crecimiento de suspensiones celulares. En la cinética de las células en suspensión, a los 24 días en peso fresco se observaron todas las fases de una curva de crecimiento (Figura 11A), a los cuatro días se presentó la fase de adaptación, de los 4 a los 12 días se presentó la fase de crecimiento y de los 12 a los 16, la fase exponencial, alcanzando al final de ésta, una biomasa de 1.93 g/10 mL p.f., cantidad tres veces mayor que el inóculo (0.1 mg/10 mL p.f.).

En la fase de latencia, a los 20 y 24 días, los datos de biomasa arrojaron valores promedio semejantes con 1.924 g/10 mL p.f. Al observar los valores de los tratamientos no hay diferencia significativa entre ellos y se observa que la biomasa aumento 4 veces más que el inóculo inicial. La fase de muerte inició a los 24 días con la disminución de la biomasa. Con estos resultados, establece que el día 16 es el óptimo para el crecimiento de las suspensiones celulares, en consecuencia, este periodo de tiempo será empleado para realizar los subcultivos y determinar el efecto de los factores bióticos y abióticos sobre la producción de la medicarpina en los estudios posteriores.

Respecto al comportamiento de ganancia de biomasa en peso seco (Figura 11B), se observó un crecimiento lento en los primeros 8 días del cultivo, con una marcada fase exponencial de los 8 a los 12 días, con un incremento hasta los 0.84 g/10 mL p.s. y con un ligero aumento a los 16 días de cultivo (0.7 mg/10 mL p.s.) para después entrar en fase de muerte a los 20 días, la cual se continuó hasta los 24 días.

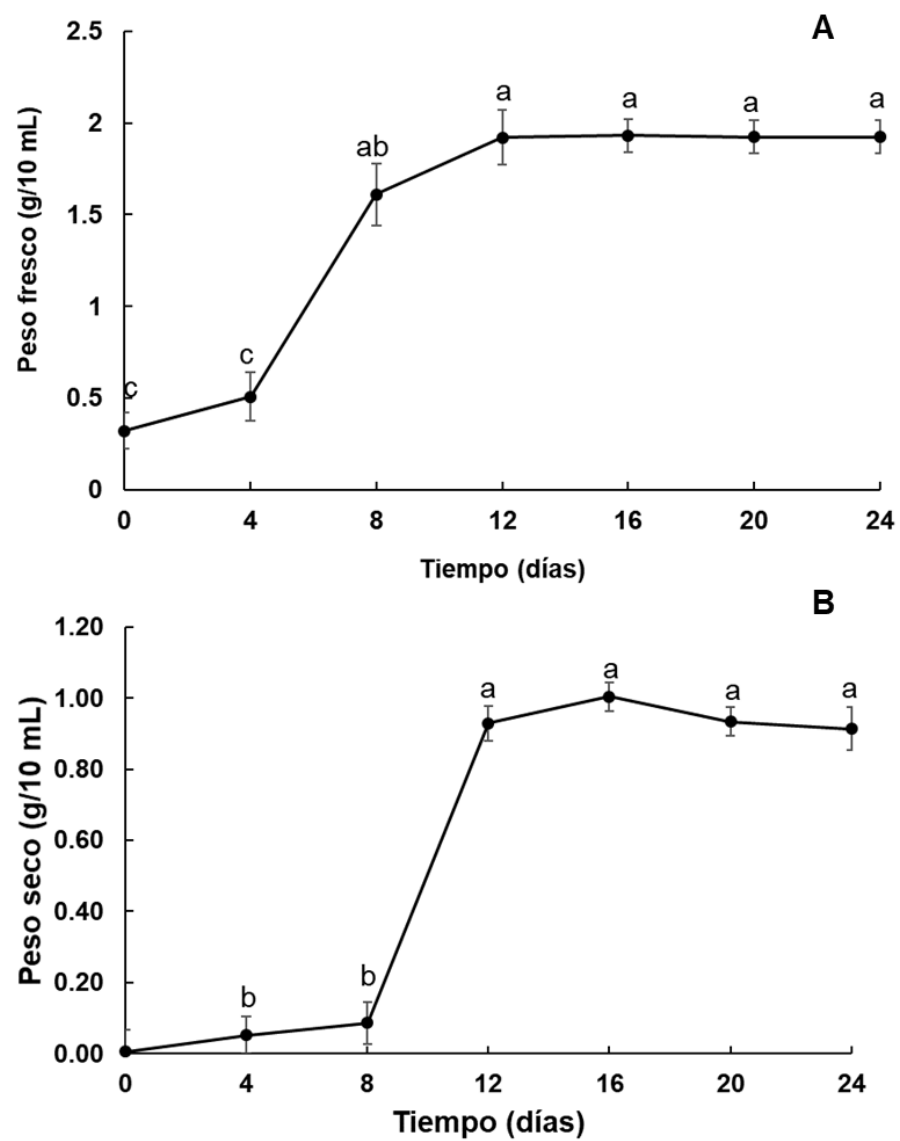


Figura 11. Cinéticas de crecimiento de células en suspensión de *D. congestiflora*: A) Peso fresco; y B) Peso seco.

1.5. Discusión

1.5.1. Inducción al callo

En la etapa del establecimiento de los cultivos *in vitro* de tejidos vegetales para la obtención de callos y suspensiones celulares, la elección de explante es una de las decisiones más críticas (Oncina *et al.*, 2000), porque la síntesis y acumulación del metabolito depende del tipo de tejido. Feeney *et al.* (2007) reportan que el proceso de dediferenciación y división celular es intensivo en la formación del callo y depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento, su concentración y combinación.

Estas especificaciones fueron tomadas en cuenta para lograr el establecimiento *in vitro* de tejidos de *D. congestiflora* y asegurar la producción de medicarpina, por tal razón, los cultivos *in vitro* se establecieron a partir de segmentos de hoja de plántulas establecidas y mantenidas en MS con 0.05 mg/mL de benciladenina (BA) (Figura 5 y 6).

En virtud de que se ha reportado que la producción del metabolito depende del tipo de explante como por ejemplo los callos de *Taxus chinensis* originados de hoja producen taxol en mayor cuantía que los procedentes de otros tejidos (Parc *et al.*, 2002) y Brukhin *et al.* (1996) obtuvieron una menor producción de taxol en callos de segmentos de tallos de *Taxus baccata*, lo que permite inferir que el origen del explante podría influir en la producción de la medicarpina.

Aunque la inducción de formación de callo ocurrió en diferentes tratamientos, el mayor crecimiento de peso fresco fue de 2.29 g y 0.825 g de peso seco que fue obtenido con segmentos de hojas de *D. congestiflora* cultivados en MST9 que consistió en medio MS con 1.5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA. Este resultado indica que se requiere adicionar un mayor contenido de BA, observando un callo con características idóneas para el establecimiento de suspensiones celulares, como la alta friabilidad y un rápido

crecimiento, de acuerdo a lo descrito por Abdelnour y Escalante (1994) y Martínez *et al.*, (2009).

Se ha observado que a mayor concentración de citocininas como BA, promueven este crecimiento en callos de árboles como lo reportado para *Eucalyptus cinerea* (Orozco *et al.*, 2009) que requiere de 1 a 2 mg/L de BA, o en callos de guayaba que se desarrollan con 1.0 mg/L de BA (Capote *et al.*, 2009). En diversos cultivos *in vitro* tanto de callos como suspensiones celulares de diversas plantas, la adición de este tipo de regulador de crecimiento promueve la división celular y evita el envejecimiento celular que es la principal función de las citocininas (Calva y Pérez, 2005).

Actualmente, no hay reportes de cultivos *in vitro* en callos y suspensiones celulares de especies de *Dalbergia* dirigidos a la obtención y producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, el cultivo *in vitro* de tejidos por embriogénesis somática y organogénesis se ha establecido para las especies *D. sisso*, *D. latifolia*, *D. lanceolaria*, *D. paniculata* y *D. retusa* (Dwari y Chand, 1996; Das *et al.*, 1997; Pradhan *et al.*, 1998; Sreedevi *et al.*, 1999; Valverde y Alvarado, 2004).

1.5.2. Obtención de suspensiones celulares

En las células en suspensión desde el primer cultivo y hasta el tercer subcultivo se logró un 80% de viabilidad y células libres de división celular. Estos resultados conciden con los de Pierick (1990), quien reporta un éxito para las suspensiones celulares con porcentajes por arriba del 70% y presentar células libres.

En contraste, en estudios con *Eucalyptus cinerea* se reporta un éxito de solo 30% (Orozco *et al.*, 2009) y con *Prosopis laevigata* que se logró un 60% de viabilidad (Trejo *et al.*, 2010); en ambas citas se logró establecer el cultivo de células en suspensión, aunque con porcentajes bajos de viabilidad y por ello los resultados obtenidos de este trabajo se consideran los más recomendables para el establecimiento de las células en suspensión de *D. congestiflora*.

1.5.3. Cinéticas de crecimiento de callo y suspensiones celulares

En el medio seleccionado, la máxima cantidad de biomasa se logró a los 24 días de cultivo y con una morfología de 70% de friabilidad de los callos; en las suspensiones celulares y el mismo medio el evento ocurrió a los 16 días. La determinación de la dinámica del crecimiento para callo y suspensiones celulares es un factor de importancia porque en esta fase exponencial se presenta el mayor crecimiento de las células y su expresión es el peso de la biomasa (Kosky, 1998).

El máximo crecimiento en ambos sistemas celulares no ocurrió en la misma línea de tiempo, debido a que un cultivo de callo tiene diferentes requerimientos de nutrientes y tasa de división celular respecto a las suspensiones celulares. Los callos son cultivos celulares de crecimiento desdiferenciado, la materia prima para mantener los cultivos *in vitro* y con características óptimas para establecer las suspensiones celulares.

El cultivo de células libres permite tener contacto con el medio comportándose como biocatalizadores, es por ello que autores como Abdelnour y Escalante (1994) y Pierick (1993) señalan a los cultivos *in vitro*, como una opción viable para obtener metabolitos secundarios. El resultado del crecimiento de las suspensiones celulares de *D. congestiflora* a los 16 días, concuerda con lo reportado para *Galipea longiflora* que a los 15 días presentó un crecimiento 4 veces mayor que el inóculo inicial (Paz *et al.*, 2007).

También se ha reportado que para lograr el máximo crecimiento celular, depende de la especie vegetal debido a que algunas necesitan más tiempo para llegar a su mayor crecimiento, por ejemplo, las células de eucalipto (*Eucalyptus cinerea*) ocupa 30 días para triplicar el inóculo inicial. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con *D. congestiflora* del presente estudio.

1.6. Conclusión

La combinación de BA/ANA favoreció la inducción de formación de callo de *D. congestiflora* en las concentraciones de 1.5 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA denominado el medio MST9, medio seleccionado como el mejor para la inducción de biomasa.

En este mismo medio de cultivo se establecieron las células en suspensión de *D. congestiflora*, produciendo células libres y una óptima división celular, manteniendo un 80% de viabilidad.

El resultado de las cinéticas de crecimiento para callo y suspensiones celulares de *D. congestiflora*, evidenciaron un mejor crecimiento, ya que se obtuvo un incremento en la biomasa en peso fresco y peso seco durante el tiempo de cultivo.

Con esta información se estableció que el periodo de tiempo para el mayor crecimiento de callo es de 24 días y para las suspensiones celulares de 16 días.

1.7. Literatura citada

Bhargavan B., Gautam K.A., Mishra S.J., Kumar A., Goel A., Dixit M. Pandey R., Manickavasagam L., Dwivedi S.D., Ramachandran R., Maurya R., Trivedi A., Chattopadhyay N. y Sanya S. 2012. Medicarpin a legume phytoalexin, stimulates osteoblast differentiation and promotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor β -mediated osteogenic action of medicarpin. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 23(1):27–38.

CITES. (2017). The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Appendices I and II. https://cites.org/sites/default/files/notif/F-Notif-2016-043_0.pdf. (Valid from 4 October 2017).

Hernández G. A., 2014. Propagación *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* (campincerán) a partir de estacas cultivadas en invernadero. Tesis maestría. Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera. UMSNH. 72 p.

Kosky R. G., 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara. pp. 57-77.

La NOM-059-SEMARNAT-2010. 11 y 12 de junio de 2015 en CONABIO.
<http://bios.conabio.gob.mx/especies/6050274>

Lee H. B. 1996. Fundamentals of Food Biotechnology. VCH Publishers. United Kingdom, 431 pp.

Martínez-Sotres C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quiñones J.G, Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R., 2012. Medicarpin an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. International Biodeterioration & Biodegradation. 69:38-40.

Pérez-Alonso N., y Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal. 11(4)

Orozco S. F., Hoyos S.R. Arias Z. M., 2002. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinérea*. Revista Colombiana de Biotecnología Vol. IV No.1. 43-48.

Orr D.J., Edwards R y Dixon R., 1998. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiol. 101: 847-856

Sajc L., D. Grubisic, y Vunjak-Novakovic G. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochem. Eng. J. 4: 89-99.

Widholm J.M., 1972. The Use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranine for Determining Viability of Cultured Plant Cells. Biotechnic & Histochemistry. 47:189-194.

CAPÍTULO 2

Determinación de la producción de medicarpina en callos y en células en suspensión de *D. congestiflora*

2.1. Resumen

La medicarpina es un pterocarpano que se produce en el duramen de *Dalbergia congestiflora*, un árbol de la familia Fabaceae en peligro de extinción que habita en la selva baja caducifolia del estado de Michoacán. La especie presenta potencial para la producción de medicarpina caracterizada por sus propiedades antifúngicas y medicinales. En la presente investigación, se implementaron los métodos de extracción, purificación, identificación y cuantificación de la medicarpina, con cultivos celulares de callo de *D. congestiflora* como materia prima, con el propósito de determinar el contenido de este metabolito en callos y suspensiones celulares, durante 24 y 16 días de cultivo, respectivamente. La medicarpina fue extraída con diclorometano en una proporción de 100 mL por 10 g de callo (peso fresco), obteniendo su purificación mediante cromatografía en capa fina, identificándola como una banda con un Rf de 0.58, la cual después de eluirse con el mismo disolvente, se caracterizó por espectrofotometría de absorción (200-800 nm), presentando los picos característicos (pico uno a 264 nm, pico dos a 274 nm) que demostraron su purificación, la identificación por ¹HRMN, resultó que es el enantiómero (+)-medicarpina (6aS, 11aS). La cuantificación se realizó con una curva de calibración desarrollada con concentraciones de 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1 y 2 mg/mL de medicarpina pura estándar. El contenido máximo de medicarpina en callos fue de 2.23 mg/g de peso fresco a los 24 días, similar al producido por las células en suspensión con 3.56 mg/g de peso fresco a los 16 días del cultivo. Este resultado demuestra que en las suspensiones celulares se produce mayor contenido de medicarpina en menor tiempo.

Palabras clave: Callos, campincerán, cultivos *in vitro*, medicarpina, suspensiones celulares.

2.1.1. Abstract

Medicarpin is a pterocarpano produced in the heartwood of *Dalbergia congestiflora*, a tree of the endangered Fabaceae family that habits in the lowland deciduous of the state of Michoacán, which presents a potential for its production by its antifungal and medicinal properties. In the present research, the methods of extraction, purification, identification and quantification of the medicarpin were implemented, using cell cultures of callus of *D. congestiflora* as raw material, with the purpose of determining the content of this metabolite in both callus and cell suspensions of this plant, during its growth kinetics. The medicarpin was extracted with dichloromethane in a proportion of 100 mL per 10 g of callus (fresh weight), obtaining its purification by thin layer chromatography, identifying as a band with an Rf of 0.58, which after elute with the same solvent, is it was characterized by absorption spectrophotometry (200-800 nm),

presenting two characteristic peaks (peak one at 264 nm, peak two at 274 nm) that showed their purification. Quantification was performed with a calibration curve developed with different concentrations (0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1.0 and 2.0 mg/mL) of pure medicarpin (standard). The production of medicarpin was dependent on the growth of the cells, finding a higher content in the cell suspensions. The maximum content of medicarpin in callus was 2.23 mg/g fresh weight at 24 days, less than produced by the cell suspensions with 3.56 mg/g of fresh weight at 16 days of culture, which had an increase of 66 times compared to the initial inoculum. This result shows that cell suspensions produced a higher content of medicarpin and in a shorter time than callus.

Keywords: Callos, campinceran, *in vitro* cultures, medicarpin, cell suspensions.

2.2. Introducción

Dalbergia congestiflora Pittier es un árbol reportado en peligro de extinción (NOM-059-2010) que pertenece a la familia Fabaceae y es conocido en México como campincerán. Su duramen contiene el metabolito secundario medicarpina, una fitoalexina del grupo de los pterocarpanos con propiedades medicinales y actividad fungicida y con un gran potencial de uso (Martínez-Sostres *et al.*, 2012). Debido a las restricciones existentes para la explotación de su madera y subproductos como la medicarpina, es necesario implementar estrategias para la obtención de este compuesto que no ponga en riesgo la permanencia de este árbol.

Una alternativa para producir medicarpina es el uso de los cultivos *in vitro* de plantas o cultivo de tejidos vegetales, herramienta que ofrece la biotecnología moderna de plantas para la producción de metabolitos secundarios. Una de las ventajas del cultivo *in vitro* de células vegetales es el potencial de proveer de manera continua y reproducible los metabolitos secundarios de interés, sin que algunas variables como el clima, condiciones del suelo y la interacción con otros organismos afecten su producción (Orozco *et al.*, 2002 B; Arias *et al.*, 2009; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Con el cultivo *in vitro* de callos y células en suspensión se ha logrado la producción de metabolitos secundarios sintetizados por árboles como el taxol que se obtiene de callos y células en suspensión de *Taxus brevifolia* (Hansen *et al.*, 1994) utilizado en

en la industria farmacéutica; la azadiractina que es un bioinsecticida producido en células *in vitro* de *Azadirachta indica* (neem) (Orozco-Sánchez y Rodríguez- Monroy, 2007); o la producción del aceite esencial en células *in vitro* de *Eucalyptus cinerea* (Orozco *et al.*, 2002 A).

Con la estandarización de diversos métodos de extracción, cuantificación e identificación de compuestos, se ha encontrado la producción *in vitro* de metabolitos secundarios en sistemas de callos y suspensiones celulares (Verpoorte y Memelink, 2002; Peters *et al.*, 2009). En diversas investigaciones se ha establecido como prioridad la realización de cinéticas de crecimiento, se evalúa el crecimiento con la determinación de paquete celular, número de células, peso y viabilidad, para establecer la cantidad de inóculo y las condiciones óptimas de cultivo, y su relación con la producción del metabolito en estudio (Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990; Zhong y Yoshida, 1995; Chiou *et al.* 2001).

Por las razones anteriores, el objetivo de este capítulo fue la determinación de medicarpina en callos y células en suspensión de *D. congestiflora*, implementando las técnicas de su extracción, purificación, identificación y cuantificación.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Material

Cultivo de callos. Para la determinación de la presencia y cinética de producción de medicarpina, los callos de *D. congestiflora* fueron cultivados por 24 días en el medio sólido MST9 con la adición de 1.5/0.1 de BA/ANA mg/mL bajo ambiente de cultivo a 25°C, intensidad de 2000 luxes y fotoperiodo de 16 h luz.

Suspensiones celulares. Las células en suspensión de *D. congestiflora* empleadas para realizar la cinética de producción de medicarpina, provienen del tercer subcultivo que resultó en 80 % de viabilidad, el medio de cultivo fue MST9 líquido a 120 rpm que

se mantuvo en condiciones de cuarto de cultivo previamente especificadas en el Capítulo 1.

Medicarpina. La medicarpina utilizada como estándar fue identificada por Resonancia Magnética Nuclear y donada por el Dr. Rafael Herrera Bucio del Laboratorio de Síntesis de química orgánica del Instituto Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Además, se empleó medicarpina aislada por el Dr. Pablo López Albarrán de la Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

2.3.2. Métodos

Extracción, purificación, identificación y cuantificación de medicarpina. Los métodos para la identificación y cuantificación de medicarpina se procesaron con callos cultivados. La extracción fue realizada con el método de maceración con diclorometano como disolvente. A 10 g de callo fresco de *D. congestiflora* pulverizado mediante la molienda con nitrógeno líquido, se adicionaron 100 mL de diclorometano a una relación de 1:10. La mezcla se sometió a maceración por 5 días a 4°C. Posteriormente se filtró en embudo con papel filtro Whatman No.1 y el filtrado se evaporó a sequedad en rotavapor al vacío a 35°C. Finalmente, los extraíbles se resuspendieron en 1 mL de diclorometano y se almacenaron en viales ámbar a -20°C.

La purificación se realizó por cromatografía en capa fina (placas de gel de sílice 60 con fluoresceína, 20 x 20 cm), se empleó una fase móvil compuesta con hexano: acetato de etilo:isopropanol:ácido acético (40:20:5:1), esta mezcla fue propuesta por Baez (2014). La banda correspondiente a la medicarpina se observó mediante luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) comparada con una solución estándar de medicarpina purificada e identificada previamente por Martínez-Sostres *et al.* (2012) y Morales (2016).

La identificación de la medicarpina se realizó a partir del raspado y elución con diclorometano de la banda correspondiente por espectrofotometría de barrido (200-800 nm), en un espectrofotómetro modelo UV 2550 marca Shimadzu y los picos correspondientes a este compuesto, comparados con la medicarpina purificada por Martínez-Sostres *et al.* (2012) y Morales (2016). Además, se realizó una segunda identificación por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con el equipo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

La cuantificación de la medicarpina purificada se realizó en una curva de calibración que se preparó con una solución inicial a una concentración de 2 mg de medicarpina disuelta en 1 mL de diclorometano (2 mg/mL). De esta solución se prepararon diferentes concentraciones (0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1 y 2 mg/mL). Las lecturas se realizaron a una λ 264 nm en un espectrofotómetro UV/VIS modelo VE-5100UV Científica Vela Quin, México

Cinéticas de producción de medicarpina en callo y células en suspensión. De los cultivos de células de suspensión y de callo, se tomaron muestras de 0.5 g de peso fresco con tres replicas para ambos cultivos mismos que fueron colectados cada 4 días hasta los 24 respectivamente. De cada muestra colectada, la extracción de medicarpina se obtuvo con la maceración directa en 2 mL de diclorometano, y triturado por 10 veces con una varilla de vidrio en un tubo de ensaye, manteniendo una relación de (1:2). El macerado se llevó a refrigeración por 24 h a temperatura de 4°C. A continuación, se colectó la parte líquida del macerado y se pasó por papel filtro Whatman No. 1 y se dejó en sequedad total con nitrógeno líquido. Posteriormente se resuspendió en 1 mL de diclorometano estandarizando la concentración a 0.5 g/mL para la cuantificación de medicarpina. Cada muestra de extracto de callo o suspensión celular, fue sometida a separación por cromatografía de capa fina bajo las condiciones anteriormente descritas, cada banda fue eluída con 1 mL de diclorometano y se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro UV/VIS a una λ 264 nm. El contenido de medicarpina (mg/g peso fresco) se consiguió de la curva de calibración por las lecturas de absorbancia obtenidas de cada muestra.

2.4. Resultados

2.4.1. Extracción, purificación e identificación de medicarpina

Para la obtención de medicarpina, después de la maceración de callo de *D. congestiflora*, se obtuvo un extracto de textura pastosa, café cristalino en la parte inferior y café oscuro en la parte superior como se observa en la Figura 12C. De la parte cristalina, después de la separación de fases y evaporación del disolvente, se obtuvo el total de extraíbles con un contenido total de 0.01088 g/10 g callo peso fresco.

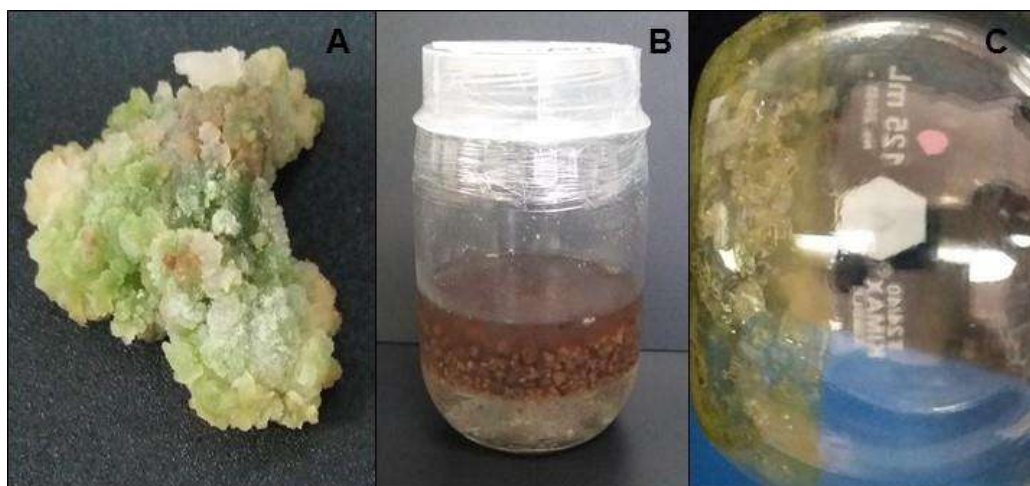


Figura 12. Extracción de medicarpina a partir de callos de *D. congestiflora*. A) callo a los 21 días, B) macerado después de 5 días, y C) extraíbles después de evaporar.

Para continuar con el proceso de purificación de la medicarpina, los extraíbles fueron disueltos en 1 mL de diclorometano y sometidos a separación por cromatografía en capa fina por 60 min cada corrida y con diferentes bandas al revelarse con luz UV (Figura 13A). Después de la elución de la banda correspondiente a la medicarpina, se confirmó la pureza al someterse de nuevo en las condiciones de cromatografía en capa fina. La medicarpina se presentó con un R_f de 0.58 cm por presentar un valor similar a la de medicarpina purificada (Figura 13B). La medicarpina purificada de callos de *D. congestiflora*, se caracterizó por espectrofotometría de barrido (200-800 nm) y

presentó dos picos principales, uno a 265 nm y otro a 274 nm, que coinciden con la medicarpina pura (Figuras 13C).

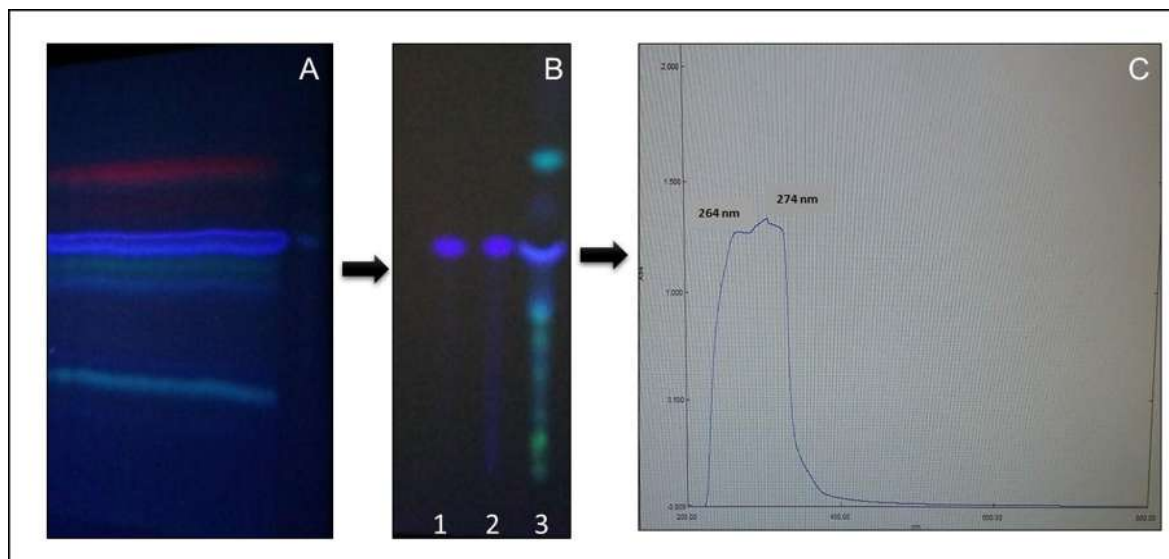


Figura 13. Purificación de medicarpina a partir de callos de *D. congestiflora*. A) Placa con el extracto y luz UV, B) Muestras en la placa con UV:1) medicarpina estándar, 2) medicarpina purificada y 3) extracto y C) Lectura con el espectrofotómetro con los picos máximos de 264 y 274 nm.

En el Cuadro 6 se observa que la medicarpina obtenida en los callos y en las células en suspensión es el enantiomero (+)-Medicarpina, ya que los datos coinciden con lo reportado por Martínez-Sostres *et al.*, (2012) y Deesamer *et al.*, (2009).

2.4.2. Cinéticas de producción de medicarpina en callo y células en suspensión

El contenido de medicarpina en callos y células en suspensión de *D. congestiflora* fue determinado con la ecuación $X=(Y/1.00031) - 0.0475$ obtenida de la curva de calibración de medicarpina (mg/mL) y se presenta en la figura 14. La lectura máxima obtenida fue de 1.997 nm en la concentración de 2 mg/mL y en una mínima de 0.0330 nm en la concentración de 0.01 mg/mL, cuyo coeficiente de regresión fue de 0.9936. Los callos de *D. congestiflora* presentaron un contenido basal de medicarpina desde el inicio del cultivo de 1.76 mg/g en peso fresco, mismo que se mantuvo en un promedio de 1.58 mg/g durante los 24 días (Figura 15).

Cuadro 6. ¹HNMR Comparación de (+)-Medicarpina con los reportados

	Medicarpina (Deesamer <i>et al.</i> , 2009)	(+)-Medicarpina <i>D. congestiflora</i> duramen (Martínez- Sostres <i>et al.</i> 2012)	(+)-Medicarpina <i>D. congestiflora</i> callos y células en suspensión
Posición H/C	δ ¹ H ppm	δ ¹ H ppm	δ ¹ H ppm
1		7.37 d <i>J</i> = 8.4	7.37 d <i>J</i> = 8.4
2		6.55 dd <i>J</i> = 8.4, 2.5	6.55 dd <i>J</i> = 8.4, 2.6
3			
4		6.41 d <i>J</i> = 2.5	6.42 d <i>J</i> = 2.4
4a			
6 ax	3.65 dd, <i>J</i> = 10.9, 10.9	3.62 t <i>J</i> = 10.9	3.64 t <i>J</i> = 11.0
6 eq	4.26 dd <i>J</i> = 10.9, 4.8	4.24 dd <i>J</i> = 10.9, 5.0	4.22 dd <i>J</i> = 11.1, 4.7
6a	3.55 m	3.52 ddd <i>J</i> = 10.2, 7.5, 4.1	3.52 ddd <i>J</i> = 13.9, 7.0, 3.0
6b			
7		7.13 d <i>J</i> = 8.7	7.13 d <i>J</i> = 8.7
8		6.46 dd <i>J</i> = 5.8, 2.1	6.45 dd <i>J</i> = 5.1, 2.8
9			
10		6.45 s	6.43 s
10a			
11a	5.23 d <i>J</i> = 6.7	5.50 d <i>J</i> = 6.7	5.47 d <i>J</i> = 6.8
11b			
OMe de C-9		3.77 s	3.77 s

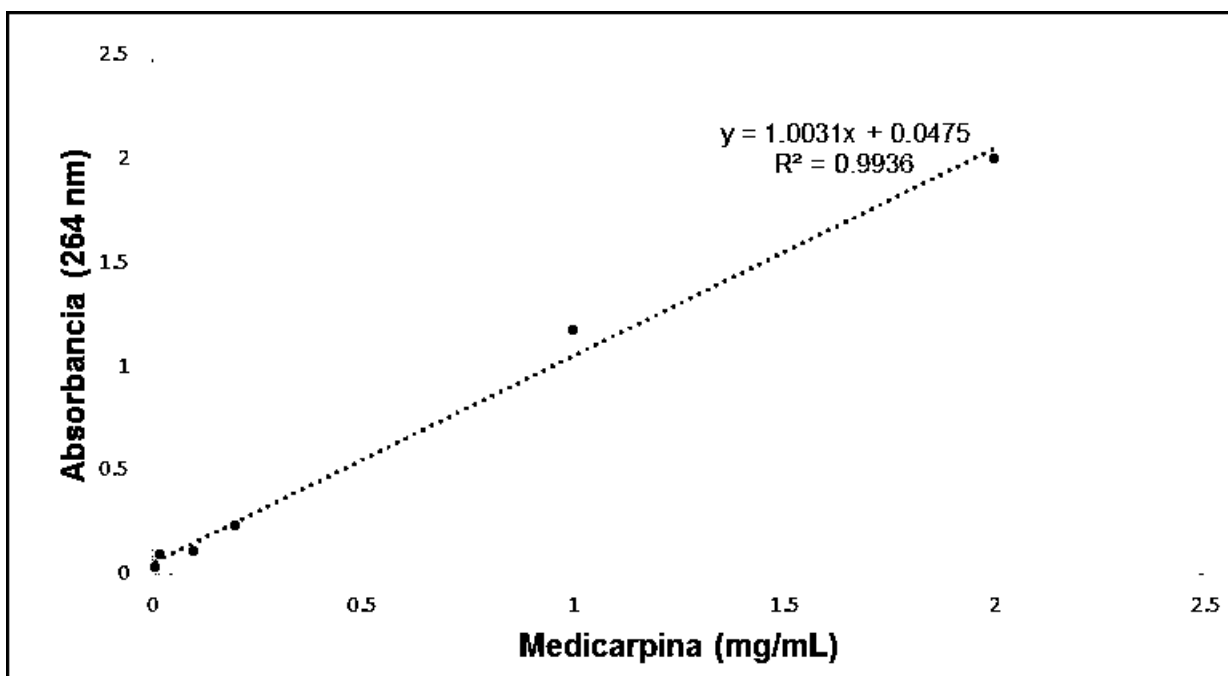


Figura 14. Curva de calibración de medicarpina mg/mL ($\lambda=264$ nm).

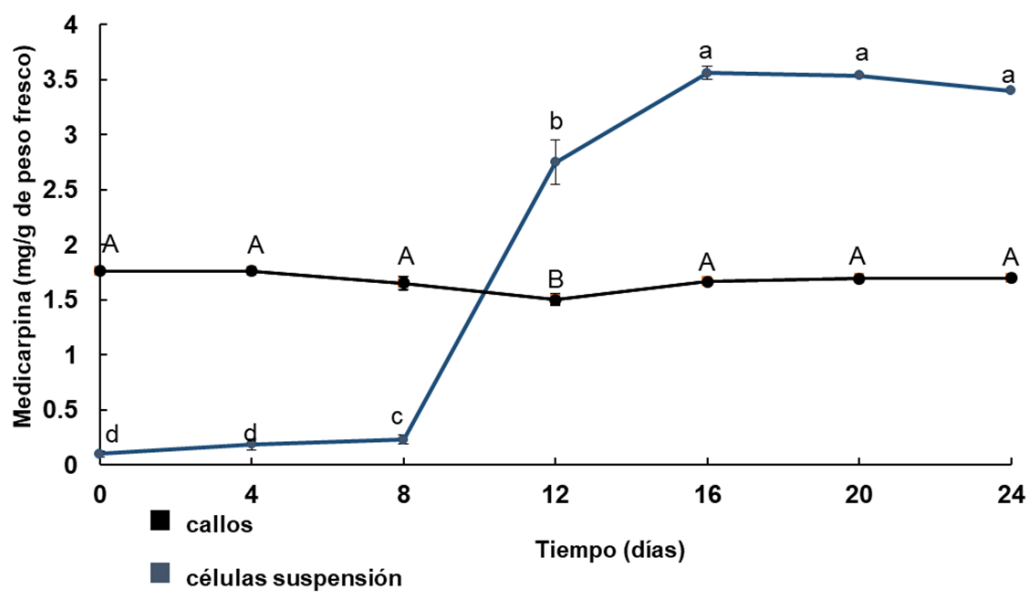


Figura 15. Cinéticas de producción de (+)-medicarpina en cultivos *in vitro* de *D. congestiflora* en callo y células en suspensión. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$, $n = 5$).

En células en suspensión, el contenido basal de medicarpina fue de 0.05 mg/g valor que creció de los 8 hasta los 16 días (0.23 mg/g). La mayor concentración de medicarpina fue de 1.12 mg/g (Figura 15). El aumento en el contenido de medicarpina en células en suspensión fue de hasta 4.8 veces mayor que el del inóculo inicial. La producción de medicarpina disminuyó después del día 16 hasta 3.34 mg/g en el día 24, lo que significa 20.86 veces más respecto al contenido inicial.

2.5. Discusión

2.5.1. Extracción, purificación, identificación de medicarpina

Para el método de extracción, se estableció el uso del disolvente diclorometano como el apropiado para la obtención de la medicarpina, ya que se obtuvo un 17.7% de rendimiento en los callos, correspondiente 0.01088 mg/g, respecto a los extraíbles obtenidos. Se eligió el diclorometano para la obtención de medicarpina del duramen de *D. congestiflora* en virtud de que Quevedo-Tinoco *et al.* (2012) obtuvieron resultados favorables con su empleo.

La medicarpina pura utilizada como compuesto estándar y la obtenida mediante el proceso establecido de purificación de los cultivos *in vitro* de *D. congestiflora* (callos y células en suspensión) presentaron un espectro similar y característico (pico 1 a 265 nm, pico 2 a 274 nm) (Figura 13) de la medicarpina reportado por Gustine y Sherwood (1978), donde hacen referencia a la presencia de dos picos a 255 nm y 269 nm, aunque diluida en metanol. Otros autores como Vaziri (1981), también encuentran estos picos característicos en la medicarpina diluida en etanol (pico uno a 279, pico 2 a 284 nm). Por lo anterior, el espectro obtenido en la muestra purificada de los cultivos *in vitro* de *D. congestiflora* demuestra que corresponde a la medicarpina y además por mostrar el mismo espectro de absorción en UV de la medicarpina estándar.

Mediante el análisis por $^1\text{HNMR}$, se confirmó que el compuesto aislado y purificado de callos y células en suspensión de *D. congestiflora*, correspondió al el enantiómero (+)-medicarpina, de acuerdo a los sitios presentados (6a S y 11a S, Cuadro 6), lo que concuerda con lo reportado por Deesamer *et al.* (2009) y Martínez-Sostres *et al.* (2012). Estos últimos autores identificaron este enantiómero de la medicarpina en el duramen de *D. congestiflora*. Es la primera vez que se reporta la identificación del enantiómero (+)-medicarpina a partir de callos y células en suspensión de esta especie.

La presencia de la medicarpina se ha estudiado en diversas especies de *Dalbergia*, encontrando los dos enantiómeros en las especies; el enantiómero (-)-medicarpina ha sido reportado en el duramen de *D. stevensonii* (Donnelly *et al.*, 1973) y *D. odorifera* (Choi *et al.*, 2009); también se identificó (+)-medicarpina en las flores de *D. volubilis* (Chawla *et al.*, 1976). Al encontrar el enantiómero (+)-medicarpina en los cultivos *in vitro* de *D. congestiflora* abre la posibilidad para su posible obtención y uso, ya que éste es el enantiómero más utilizado por su actividad biológica.

2.5.2. Cuantificación de medicarpina en callo y células en suspensión

En las cinéticas de callo de *D. congestiflora* se observa una producción constante de medicarpina desde el inicio del cultivo, aunque con una leve disminución a los 16 días del cultivo, lo que sugiere que este cultivo celular mantiene su crecimiento con una misma producción de medicarpina. Kreis (2007) indica que la producción de metabolitos secundarios en callos generalmente es muy baja debido a su lento crecimiento. El paclitaxel y otros taxoides se producen en muy bajas concentraciones en callos de *Taxus chinesis* (Ketchum *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001), sin embargo, su producción es mayor en células en suspensión (Cusidó *et al.*, 2002).

La producción de medicarpina en los cultivos de células en suspensión, ésta mostró un incremento desde los ocho días del cultivo el que se mantuvo hasta el día 16, que coincide con la fase exponencial de la cinética de crecimiento de este tipo de células

(Figura 15). Estos resultados coinciden con los reportes relacionados con la producción de metabolitos secundarios en células en suspensión de diversas plantas, en los que se demuestra que este tipo de cultivo presenta una mayor ventaja que los cultivos de callos (Vanisree *et al.*, 2004; Vanisree y Tsay, 2007). En células en suspensión de diversas plantas como *Taxum chinensis* y *Morinda royoc*, se ha conseguido una alta producción de metabolitos secundarios como el taxol y la morindina, respectivamente (Cusidó *et al.*, 2002; Capote *et al.*, 2008).

Aunque la mayor producción se obtiene al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria (Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990; Bougard *et al.*, 2001), también se ha observado la acumulación de metabolitos secundarios asociada al crecimiento, encontrando que la producción es proporcional a la biomasa generada durante la fase exponencial, esto último ocurre en suspensiones celulares que sintetizan betalainas, carotenoides y azadiractina (Bougard *et al.*, 2001; Prakash y Srivastana, 2005; Prakash y Srivastava, 2006). Con los resultados de la presente investigación, se demuestra que para una óptima producción *in vitro* de medicarpina de *D. congestiflora*, es necesario el cultivo de células en suspensión.

Aunque la medicarpina es una fitoalexina, un grupo de compuestos que requieren de inductores bióticos o abióticos para inducir su biosíntesis, en callos y células en suspensión de *D. congestiflora* la producen de forma basal. En las células en suspensión ésta incrementa hasta 20.86 veces, sin la adición de inductores. La producción de diversos metabolitos secundarios en cultivos celulares sin el uso de inductores ha sido reportada en diversas investigaciones, como en células en suspensión de chile (*Capsicum annuum*) que producen capsaicina (Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990) y la producción de fenoles en *Bixa orellana* (Jiménez *et al.*, 2008).

Lo anterior explica que con el solo hecho de ser cultivos de células indiferenciadas en medio líquido, las condiciones artificiales de cultivo estimulan la producción de algunos metabolitos secundarios, ya que se induce la expresión de genes involucrados en la

síntesis de esos productos, consideradas como un tipo de estrés (Jiménez *et al.*, 2008). Además, algunos metabolitos secundarios pueden ser sintetizados por el efecto de factores como la luz, pH, nutrientes, e incluso por el tipo y concentración de ciertos reguladores de crecimiento (Irani *et al.*, 2003).

Los resultados de producción de medicarpina en células en suspensión de *D. congestiflora* indican que es un cultivo ideal para su producción y para realizar estudios que eleven la producción de este metabolito, así como para evaluar los posibles mecanismos involucrados en su síntesis.

2.6. Conclusiones

Los callos y células en suspensión de *D. congestiflora* producen medicarpina, la cual fue cuantificada con el establecimiento de los métodos óptimos de su extracción, purificación e identificación. La medicarpina purificada presentó un R_f de 0.58, con picos de absorbancia a 264 y 274 nm, correspondientes al estándar de medicarpina purificada.

En callos, se obtuvo un rendimiento de un 17% de medicarpina respecto a los extraíbles obtenidos.

La producción de medicarpina en callos y células en suspensión fue diferente con 1.76 mg/g y 3.56 mg/g peso fresco, respectivamente, las suspensiones celulares son consideradas como cultivo *in vitro* óptimo para la acumulación de la medicarpina, ya que ésta está asociada al crecimiento. Por estas características, este sistema de producción se utilizó para realizar los posteriores estudios de incrementar la producción de la medicarpina.

2.7. Literatura citada

Arias Z.M., Angarita V.M.J., Aguirre C.A.M., Restrepo F.J.M. y Montoya V.C. 2009. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 62(1): 4881-4895.

Báez-Magaña M. 2014. Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Bougard F., Gravot A., Milesi S. y Gontier E. 2001. Production of secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 161(5): 839-851.

Chiou S., Su W. y Su Y. 2001. Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. Journal of Biotechnology. 85(3): 247-57.

Cusidó R.M., Palazón J., Bonfill M., Navia-Orsorio A., Morales C. y Piñol M.T. 2002 Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. Biotechnol. Prog. 18:418-423.

Deesamer S. W., Chavasiri N., Chaichit N., Muangsin U. y Kokpol. 2009. "9-Methoxy-6a, 11a-dimethyl-6a, 11a-dihydro-6H-1-benzofuro [3, 2-c] chromen-3-ol from *Dalbergia oliveri*." Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online. 65(10):02387-02387. DOI.10.1107/S1600536809034485

Gustine L.D. y Sherwood T.R. 1978. Regulation of phytoalexin synthesis in jackbean callus cultures. Plant Physiol. 61:226-230.

Hansen R.C., Cochran K.D., Keener H.M. y Croom Jr. E.M. 1994. *Taxus* populations and clippings yields at comercial nurseries. Hort Technology. 4(4):372-377.

Irani N.G., Hernández J.M. y Grotewold E. 2003. Regulation of anthocyanin pigmentatium. Rev. Adv. Phytochem. 38:59-78.

Jiménez L.S., Castaño I.H., Quintana J.C. Gelmy L.C., Quinchia L. y Estrada S. 2008. Establecimiento de suspensiones celulares de *Bixa Orellana* L. productoras de compuestos fenolicos antiofidicos. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Medellin Colombia. 15: 70-75.

Ketchum R., Gibson D., Croteau R. y Shuler M.L. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotech. Bioeng. 62:97-105.

Kreis W. 2007. *In vitro* culturing techniques of medicinal plants. En: Kayser O., Quax W. (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. 157-185.

NOM-059-SEMARNAT-2010. 11 y 12 de junio de 2015 en CONABIO. <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6050274>

Martínez-Sotres C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quiñones J.G, Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R. 2012. Medicarpin an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 69: 38-40.

Morales-Palacios F. 2016. Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis maestría. Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera. UMSNH. 195 p.

Orozco S.F., Hoyos S.R. y Arias Z.M.E., 2002 A. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea*. *Rev. Colombiana de Biotecnología*. 4(1): 43-48.

Orozco S.F., Hoyos S.R y Arias Z.M.E. 2002 B. Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios *Rev. Fac. Nal. Agr., Medellín*. 55(1): 1473-1495.

Orozco-Sánchez F. y Rodríguez-Monroy M. 2007. Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6(3): 251-258.

Prakash G. y Srivastava A. 2005. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Jyss) suspension cultures. *Process Biochemistry*. 40(12):3795-3800.

Prakash, G. y Srivastava A. 2006. Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal*. 29(1-2): 62-68.

Pérez-Alonso N. y Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 11(4):195-211.

Peters S., Velzen E. y Janssen H.G. 2009. Parameter selection for peak alignment in chromatographic sample profiling: objective quality indicators and use of control samples. *Anal. Bioanal. Chem*. 394: 1273-1281.

Quevedo T.L., Morales P.F.G., Martínez S.M.C., López A.P., Tamariz M.J. y Herrera B.R. 2012. Medicarpina aislada e identificada de *Dalbergia congestiflora* Pittier. *Rev. Latinoamericana Química*. 39:357-384.

Salgado-Garciglia R. y Ochoa A.N. 1990. Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell*. 8: 617-620.

Vaziri A., Keen N.T. y Erwin D.C. 1981. Correlation of medicarpin production with resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. medicaginis in alfalfa seedlings. *Phytopathology*. 71: 1253-1238.

Verpoorte R. y Memelink J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(2): 181-187.

Wang C., Wu J, y Mei X. 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 55: 404-410.

Zhong, J. y Yoshida T. 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme and Microbial Technology*. 0229(95):1073-1079.

CAPÍTULO 3

Evaluación del efecto de los inductores bióticos y abióticos sobre la producción de (+)-medicarpina en células en suspensión *D. congestiflora*

3.1. Resumen

Se utilizaron células en suspensión de *Dalbergia congestiflora* del tercer subcultivo para estudiar el efecto en el crecimiento celular y la producción de (+)-medicarpina, utilizando factores de inducción abióticos como luz, fuente de carbono y de nitrógeno, así como factores bióticos quitosano y filtrados estériles de *Botrytis cinerea* y de *Fusarium solani*. Las células fueron cultivadas en medio basal MST9 por 16 días a 120 rpm, con 16 h luz y 25°C. A este tiempo, el crecimiento celular fue determinado en peso fresco y la (+)-medicarpina fue cuantificada en base a una curva de calibración con el compuesto purificado mediante espectrofotometría. Los resultados muestran un mayor crecimiento en luz continua con una mayor producción de medicarpina en la oscuridad. Se observó en las células tratadas con diferentes concentraciones de sacarosa y de nitrógeno, así como con quitosano y el filtrado estéril de *B. cinerea* una relación indirecta entre el crecimiento y el contenido de (+)-medicarpina. La mayor producción de (+)-medicarpina se obtuvo con el filtrado estéril de *F. solani* sin afectarse el crecimiento celular.

Palabras clave: Suspensiones celulares, *Dalbergia congestiflora*, medicarpina, factores abióticos y bióticos.

3.1.1. Abstract

In this research, suspension cells of *Dalbergia congestiflora* from the third subculture were used to study the effect on cell growth and production of (+) - medicarpin, using abiotic induction factors such as light, carbon and nitrogen sources, as well as sterile filtered chitosan and biotic factors of *Botrytis cinerea* and *Fusarium solani*. The cells were cultivated in MST9 basal medium for 16 days at 120 rpm, with 16 h light and 25°C. At this time, cell growth was determined in fresh weight and (+)-medicarpin was quantified based on a calibration curve with the compound purified by spectrophotometry. The results show a higher growth in continuous light with a higher production of medicarpin in the dark. An indirect relationship between growth and content of (+)-medicarpin was observed in cells treated with different concentrations of sucrose and nitrogen, as well as chitosan and sterile filtrate of *B. cinerea*. The highest production of (+)-medicarpin was obtained with the sterile filtrate of *F. solani* without affecting cell growth.

Keywords: cell suspensions, *Dalbergia congestiflora*, medicarpin, abiotic and biotic factors.

3.2. Introducción

En los últimos años, las células en suspensión se han utilizado como una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios de importancia farmacéutica, cosmética, alimenticia, entre otras aplicaciones (Foley y Moore, 2005). El éxito de utilizar este tipo de cultivos, es que permite la implementación de estrategias para incrementar la productividad del metabolito y el abastecimiento de materia prima sin utilizar plantas completas, sobre todo de especies que se encuentran en categorías de protección (Arias *et al.*, 2009).

Algunas estrategias biotecnológicas, específicamente para la producción de estos compuestos, son la aplicación de los factores bióticos y abióticos que constituyen una estrategia para estimular la síntesis de metabolitos secundarios de plantas cultivadas *in vitro* ((Vanisree y Tsay, 2007; Zhang y Memelink, 2009). Para utilizar estos factores se requiere la determinación de la dosis óptima, tiempo del cultivo y los efectos combinados, ya que las células activan mecanismos de defensa desviando los nutrientes y la energía hacia el metabolismo secundario (Thanh *et al.*, 2005, Zhao *et al.*, 2005).

Existen pocos estudios de células en suspensión de especies maderables y no hay trabajos sobre el género *Dalbergia* para la obtención de metabolitos de tipo fitoalexinas por esta técnica. El interés de establecer cultivos celulares de este tipo de plantas, se debe a que producen compuestos secundarios con diversas propiedades y todas las especies de este género están consideradas en riesgo de extinción (CITES 2017). En particular, la especie de *Dalbergia congestiflora* produce medicarpina, un metabolito secundario tipo fitoalexina del grupo de los pterocarpanos (Naoumkina *et al.*, 2007), con actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antioxidante, citotóxica, osteogénica y antifúngica (Yu *et al.*, 2007; Lianhe *et al.*, 2011; Martínez-Sotres *et al.*, 2012; Pérez-Gutiérrez y García-Baez, 2013; Tanejaa *et al.*, 2015). Por estas propiedades, la medicarpina de esta especie se extrae del duramen (Martínez-Sotres *et al.*, 2012), pero debido a que se encuentra en peligro de extinción en México (NOM-

059-ECOL-2010), existe la necesidad de encontrar estrategias para su producción y coadyuvar en la conservación de este árbol.

El cultivo de células en suspensión es un sistema que permite estudiar la producción de este tipo de metabolitos como las fitoalexinas, inducidos por factores abióticos y bióticos. En la presente investigación se utilizaron células en suspensión de *D. congestiflora* para determinar el efecto de la luz, fuente de sacarosa y de nitrógeno, así como la adición de quitosano y filtrados estériles de los hongos *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani*, para el crecimiento celular y la producción de medicarpina.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Material Biológico

Se utilizaron células en suspensión de *D. congestiflora* con un 80% de viabilidad de tres subcultivos, provenientes de un cultivo de callo de segmentos de hoja y tallo de plántulas cultivadas *in vitro* y mantenidas en medio nutritivo MS con 1.5 mg/L de benciladenina (BA) y 0.1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) denominado MST9, suplementado con 30 g/L de sacarosa y pH 5.6, en condiciones de agitación orbital continua (120 rpm) a 25°C en condiciones de luz (2000 luxes de intensidad).

Los hongos fuente del filtrado estéril utilizados fueron *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani*, pertenecientes al cepario del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (Figura 16).

Cada hongo fue cultivado por 16 días en medio sólido de agar dextrosa papa (PDA) marca Bioxon®. Para el experimento se utilizó la técnica de filtrado de hongo estéril reportado por (Dixon y Fuller, 1977), que consistió en pesar un gramo de hongo con agar y disolver en 100 mL de agua, obteniendo una solución (1 g/100 mL) que se llevó a esterilización por 30 minutos, tiempo reportado de inocuida por Huerta-Olalde

(2015). En condiciones asépticas de campana de flujo laminar se obtuvo un filtrado estéril de cada hongo, utilizado como inductor biótico para la producción de medicarpina.

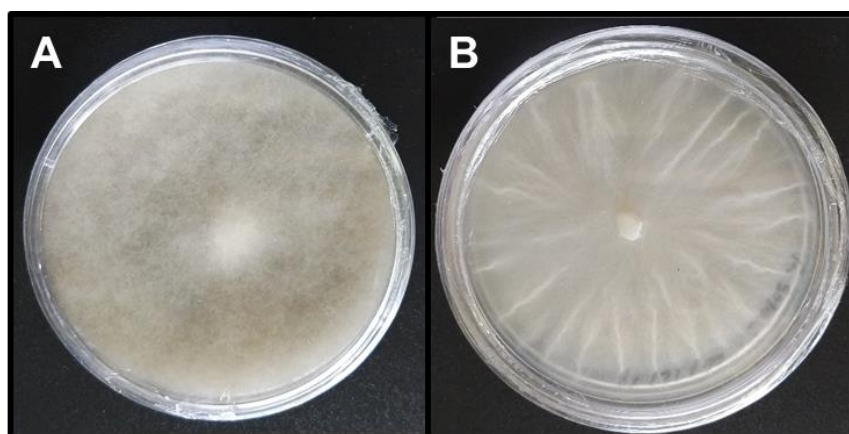


Figura 16. Hongos en estudio cultivados en medio PDA: A) *Botrytis cinerea*; B) *Fusarium solani*.

3.3.2. Extracción y cuantificación de medicarpina en células en suspensión

3.3.2.1. Extracción

La extracción de medicarpina se realizó por maceración en diclorometano por 24 h en refrigeración, de células obtenidas por filtración y pulverizadas con varilla de vidrio por 10 veces en presencia del disolvente, utilizando 2 mL por gramo de células. Posteriormente, mediante una jeringa se rescató el sobrenadante, filtrando con papel filtro Whatman (No. 1) en equipo de filtración Millipore, lo que se almacenó en un vial hasta su análisis.

3.3.2.2. Cuantificación

La cuantificación de medicarpina se determinó mediante cromatografía en capa fina y espectrofotometría, utilizando como estándar, medicarpina purificada e identificada previamente por Martínez-Sostres *et al.* (2012) y Morales (2016). El método consistió en realizar cromatografías en placas de gel de sílice 60 con fluoresceína (5 x 10 cm),

utilizando una fase móvil compuesta con hexano:acetato de etilo:isopropanol:ácido acético (40:20:5:1), de acuerdo a Baez (2014), con corrimientos de 250 μ L del extracto obtenido de las células en suspensión. Después de cada corrimiento, las placas fueron secadas a temperatura ambiente y fueron reveladas con luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm) determinando el *R_f* de la banda correspondiente de la solución estándar de medicarpina.

Para la cuantificación de la medicarpina, se raspó la banda identificada y se colocó en un vial agregando 1 mL de diclorometano, para después someterse a filtración (papel filtro Whatman No. 1) y obtener los valores de absorbancia en espectrofotómetro de luz fija UV/VIS marca Vela Quinn, modelo VE-5100UV a una longitud de onda de 264 nm, que corresponde a la máxima absorción de este compuesto. El contenido de medicarpina se obtuvo utilizando una curva de concentraciones de la solución estándar de medicarpina, como se describe en Capítulo II.

3.3.3. Inducción de la producción de (+)-medicarpina

Para la producción de medicarpina en células en suspensión de *D. congestiflora*, se probaron factores abióticos como luz (luz y oscuridad), fuente de carbono (sacarosa) y de nitrógeno (nitratos); y factores bióticos como quitosano y filtrados estériles de los hongos *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani*.

Para determinar el efecto de cada factor de inducción de producción de medicarpina, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 50 mL con 10 mL de medio MST9 estéril y en condiciones asépticas (campana de flujo laminar), con un inóculo por matraz de 0.5 g de células en suspensión de *D. congestiflora*. Todos los matraces (n=5) se mantuvieron a 120 rpm a 25 °C por 16 días, tiempo al que se obtuvo el peso fresco (p.f.) realizando un filtrado con el equipo millipore acoplado a una bomba de vacío, utilizando papel filtro Whatman No.1 (previamente tarado). Después de obtener las células filtradas y obtener el peso, se tomaron 0.5 g para la cuantificación de medicarpina como se describió anteriormente.

3.3.3.1. Inducción por factores abióticos

Factor luz.- Para la inducción de la producción de medicarpina con el factor luz (luz y oscuridad), los matraces con células en suspensión fueron incubados bajo dos condiciones: condición 1, luz continua por 24 h a una intensidad de 2000 luxes; condición 2, oscuridad continua, cubriendo los matraces con papel aluminio.

Factor fuente de carbono.- Para este inductor fisicoquímico se preparó el medio MST9 y se modificó la concentración de sacarosa obteniendo los tratamientos de 20, 30 y 40 g/L con pH 5.7.

Factor fuente de nitrógeno.- El medio MST9 fue modificado en el porcentaje de nitrógeno con tratamiento de 50, 100 y 150 %, que corresponden a las concentraciones de 1.8, 3.6 y 5.3 g de nitrógeno en forma de nitratos (nitratos de amonio y potasio).

3.3.3.2. Inducción por factores bióticos

Quitosano.- El quitosano (poli(1,4- β -D-glucopiranosamina) (Aldrich®) se preparó en una solución de 1g/L con ácido glutámico con agitación vigorosa y se ajustó a un pH de 5 con hidróxido de potasio (KOH) al 1N según Zhang *et al.*, (2000). Esta solución se agregó a cada matraz con el medio MST9 en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mg/mL.

Filtrado estéril de *B. cinerea* y *F. solani*.- A los matraces con el medio MST9 se agregó la solución del filtrado estéril de cada uno de los hongos en concentraciones de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/mL para *B. cinerea* y de 1.0, 5.0 y 10.0 mg/mL para *F. solani*.

3.3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA en una vía y una prueba de Tukey. Los datos analizados fueron el peso fresco y la producción de medicarpina en suspensiones celulares de *D. congestiflora* con una $n=5$, utilizando el paquete estadístico JP8.

3.4. Resultados

3.4.2. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores abióticos

Factor luz. A los 16 días del cultivo de las células en suspensión en condiciones de luz y oscuridad continua, se observó una disminución en el peso celular en ausencia de luz, presentándose 1.3 g p.f./10 mL, con diferencia significativa al alcanzado por las células cultivadas en luz, con un peso fresco de 1.8 g/10 mL (Figura 17). Sin embargo, la mayor producción de medicarpina fue mostrado por las células cultivadas en oscuridad (1.58 mg/mL), también con diferencia significativa al valor presentando por las células cultivadas en luz continua (1.12 mg/mL) (Figura 17). La producción de medicarpina se favoreció en la condición de oscuridad con un mayor contenido (0.46 mg/mL) que el producido en las células crecidas en luz continua. Además, se observó una relación entre un menor crecimiento y la mayor producción de medicarpina (Figura 17).

Factor fuente de carbono y de nitrógeno. Los resultados obtenidos con la variación de la concentración de sacarosa y de nitrógeno, demuestran un mayor crecimiento en p.f. de las células en suspensión de *D. congestiflora* en el medio de cultivo con 150% de nitrógeno, obteniendo 1.94 g/10 mL, sin diferencia significativa con el presentado por las células cultivadas en el tratamiento control (1.81 g/L). En los tratamientos con 20 g/L y 40 g/L de sacarosa, no se favoreció el aumento en p.f., incluso con mayor cantidad de sacarosa, el crecimiento celular disminuyó (0.23 g/10 mL) (Figura 18).

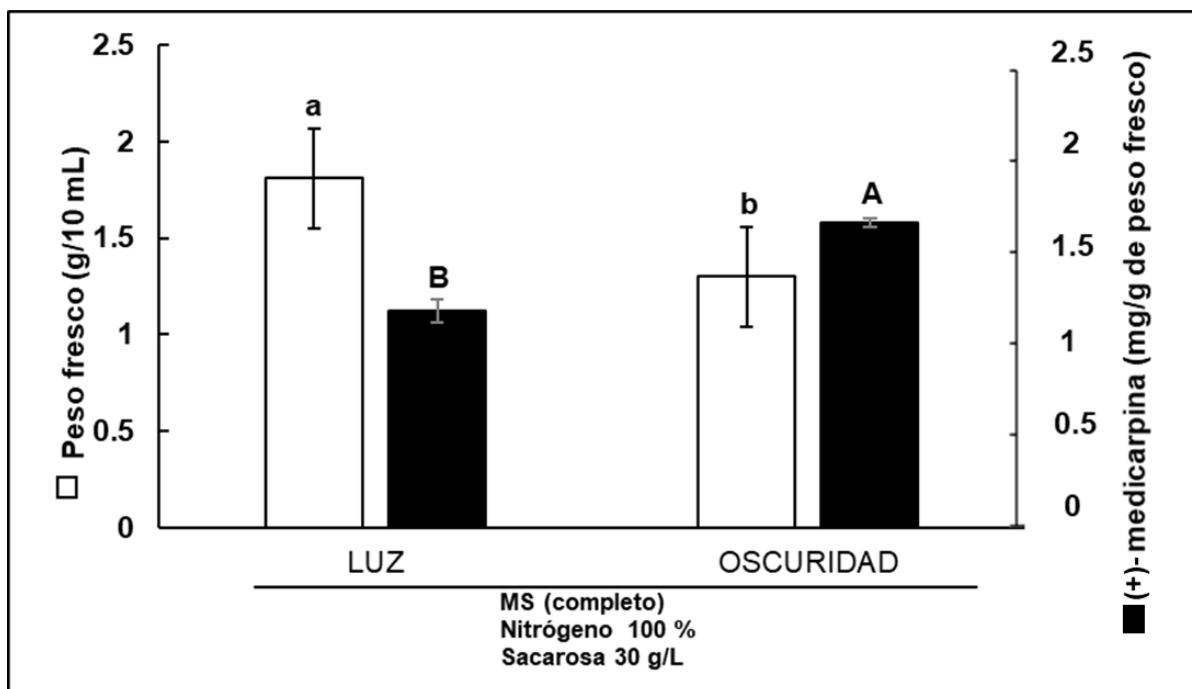


Figura 17. Efecto del factor luz (luz y oscuridad) en el crecimiento celular (g/10 mL peso fresco) y en la producción de (+)-medicarpina (mg/g peso fresco), en células en suspensión de *Dalbergia congestiflora*, a los 16 días del cultivo. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$, $n = 5$).

La producción de medicarpina en las células tratadas con los factores de fuente de carbono y de nitrógeno, fue variable dependiente de cada uno de los tratamientos. La mayor producción de medicarpina se obtuvo en la concentración más baja de sacarosa (20 g/L) con 2.32 mg/mL, con diferencias significativa respecto a los otros tratamientos (Figura 18). Las células cultivadas en el tratamiento control (30 g/L de sacarosa), el contenido de medicarpina fue de 1.12 mg/mL, un valor similar, aunque con diferencia significativa al presentado por las células cultivadas con 50 % de nitrógeno (1.29 mg/mL). La producción de medicarpina en las células cultivadas en los medios de cultivo con la más alta concentración de sacarosa (40 g/L) y de nitrógeno (150%), fue significativamente menor si se compara con los demás medios de cultivo, 0.17 y 0.45 mg/mL, respectivamente.

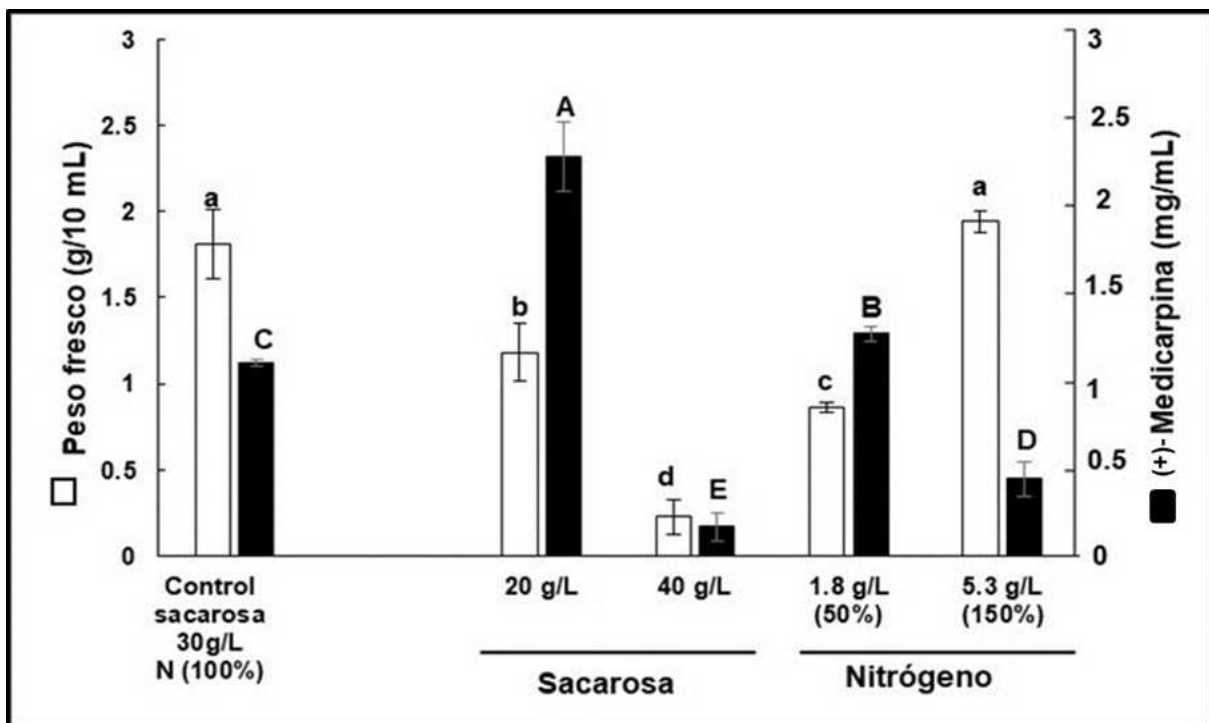


Figura 18. Efecto de la fuente de carbono (sacarosa) y de nitrógeno (nitrato de amonio y de potasio) en el crecimiento celular (g/10 mL peso fresco) y en la producción de (+)-medicarpina (mg/g peso fresco), en células en suspensión de *Dalbergia congestiflora*, a los 16 días del cultivo. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$, $n = 5$).

Como indican estos resultados, el factor sacarosa tuvo el mayor efecto en la producción de medicarpina, considerando que en el tratamiento con 20 g/L de sacarosa se obtiene el más alto contenido, ya que se produjo 2.32 mg/mL, aunque se presentó una considerable disminución del crecimiento celular. Lo anterior lleva a seleccionar al medio de cultivo control como el mejor para continuar con la investigación, ya que muestra un óptimo crecimiento de las células de *D. congestiflora*, con una producción de medicarpina por arriba de 1 mg/mL (Figura 18), con el que se comparará al utilizar los factores de inducción biológicos.

3.4.3. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores bióticos

El crecimiento de las células de *D. congestiflora* disminuyó en los tratamientos con las diferentes concentraciones de quitosano y el filtrado estéril de *B. cinerea*, pero no así

en las concentraciones de 1, 5 y 10 mg/mL del filtrado estéril de *F. solani*, en las que se mostró un crecimiento similar (1.79, 1.66 y 1.56 g/10mL peso fresco, respectivamente) al presentado por las células no tratadas (1.81 g/10 mL), sin diferencias significativas entre éstas (Figura 19A).

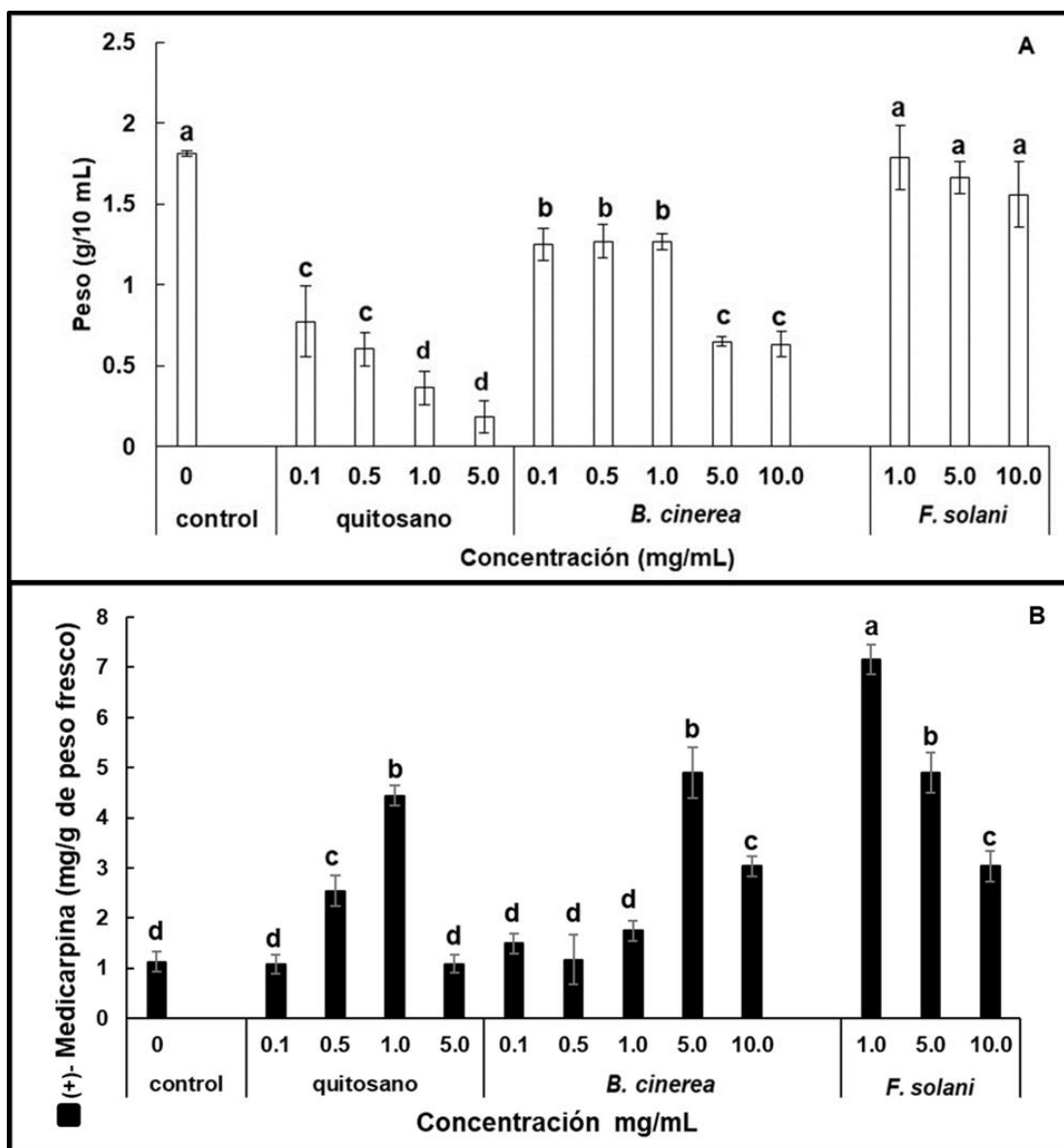


Figura 19. Efecto de la adición al medio de cultivo de quitosano y los filtrados estériles de *Botrytis cinerea* y de *Fusarium solani* sobre el crecimiento celular (g/10 mL peso fresco) (A) y la producción de (+)-medicarpina (mg/g peso fresco) (B), en células en suspensión de *Dalbergia congestiflora* cultivadas en MST9, a los 16 días del cultivo. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$, $n = 5$).

Aunque las células en suspensión de *D. congestiflora* presentaron un aumento en la producción de medicarpina al ser inducidas por quitosano y el filtrado estéril de *B. cinerea*, en los tratamientos de 1 y 5 mg/mL, con 4.4 y 4.9 mg/mL, esta producción fue mayor en la células tratadas con el filtrado estéril de *F. solani*, alcanzando hasta 7.16 mg/mL en el tratamiento de 1 mg/mL, más de 7 veces que lo producido por las células del tratamiento control, así como 1.5 y 1.63 veces más que el contenido de medicarpina en células tratadas con 1 mg/mL de *B. cinerea* y 1 mg/mL de quitosano (Figura 19B).

Es importante señalar que en la concentración de 5 mg/mL del filtrado estéril de *F. solani*, también se presentó un alto contenido de medicarpina con 4.89 mg/mL, mayor al del tratamiento control y sin diferencias significativas con lo observado en las concentraciones de 1 mg/mL de quitosano y 5 mg/mL del filtrado estéril de *B. cinerea* (Figura 19B).

3.5. Discusión

3.5.1. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores abióticos

Factor luz. El efecto de la luz fue contundente en la producción de la (+)-medicarpina en las células en suspensión de *D. congestiflora*, ya que al cultivarse en oscuridad, tuvieron una mayor producción de medicarpina (1.58 mg/mL), pero mostraron un crecimiento inferior a las crecidas en luz (Figura 17). Esto indica que la ausencia de luz influye en el crecimiento de estas células, lo que concuerda con lo reportado para cultivos celulares de *Coffea arabica*, donde la presencia de la luz influye positivamente en el crecimiento y producción de metabolitos secundarios (Zhong *et al.*, 2002).

Además, está reportado que los factores fisicoquímicos como la luz y la oscuridad en las células en suspensión, son los primeros en evaluarse, ya que tienen un efecto directo sobre la producción de metabolitos secundarios. Aunque son células vegetales, al cultivarse en condiciones *in vitro*, se comportan como los organismos

heterótrofos, en los que la luz es determinante en la regulación de rutas metabólicas encaminadas para la producción de metabolitos primarios y secundarios, lo que puede variar dependiendo de la especie (especie-específica) (Yu *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2009), y en células vegetales cultivadas en biorreactores, presentándose cambios en el crecimiento de las células dependientes de la luz (Gomez-Torres *et al.*, 2014).

Factor fuente de carbono y nitrógeno. En las células de *D. congestiflora*, el aumento de las fuentes de carbono y nitrógeno, tuvo un efecto drástico en la disminución del contenido de (+)-medicarpina (Figura 18), no así con las concentraciones más bajas (20 g/L y 50 % de nitrógeno), factores que llevaron a un incremento de este compuesto. Sin embargo, en estos tratamientos se observó un crecimiento menor al presentado por las células cultivadas en el medio control, en el que se obtuvo un óptimo crecimiento.

La disminución del crecimiento celular en altas concentraciones de azúcar es debido a la alta presión osmótica que ejercen en el medio de cultivo, según lo reportado por Akalezi *et al.* (1999) y Arias *et al.* (2009). La concentración de 30 g/L, que se utiliza en la preparación del medio de cultivo MS, ha comprobado ser la óptima para la absorción de agua y de nutrientes, que lleva a un crecimiento celular apropiado (Murashige y Skoog, 1962) y en algunos cultivos celulares para la producción de metabolitos secundarios (Akalezi *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2009).

Los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado en células en suspensión de *Taxus chinensis* y *Panax notoginseng*, en las que, las bajas concentraciones de sacarosa incrementan el crecimiento celular y la producción del metabolito (Zhan *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999).

Con un aumento en el factor nitrógeno (125 %), se favoreció el crecimiento celular con un peso fresco de 1.9 g/10 mL, confirmando que el nitrógeno es un componente fundamental para este crecimiento ya que se utiliza en la síntesis de proteínas y ácidos

nucleicos (Shlatmann *et al.*, 1996). Además, en forma de nitrato favorece el crecimiento y la producción de metabolitos (Arias *et al.*, 2009).

En las células de *D. congestiflora* en suspensión, se obtuvo un aumento del crecimiento celular en la más alta concentración de nitrógeno, pero no así de medicarpina, esto concuerda con lo reportado por Zhong y Wang (1998), quienes describen que el nitrógeno en altas concentraciones, puede resultar inhibitorio para la producción de metabolitos secundarios.

3.5.2. Inducción de la producción de (+)-medicarpina por factores bióticos

En diversos cultivos de células en suspensión, se han utilizado exitosamente la adición de inductores bióticos, como el quitosano y filtrados estériles de hongos para la obtención de metabolitos secundarios (Zhang *et al.*, 2000; Takeshi *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2010). Aunque se ha reportado que la adición de quitosano puede aumentar la biomasa en células en suspensión, como en *Eurycoma longifolia* (Chan *et al.*, 2010), en las células de *D. congestiflora* no se presentó este incremento en la biomasa, pero si en la producción de (+)-medicarpina (Figura 19).

Al adicionar los filtrados estériles de *B. cinerea* y de *F. solani* en las células en suspensión de *D. congestiflora*, aumentó la producción de (+)-medicarpina, solamente con el de *F. solani* se favoreció un incremento en la biomasa y la producción de (+)-medicarpina, destacando el tratamiento de 1 mg/mL de filtrado estéril, obteniendo 7.16 mg/mL de (+)-medicarpina que significa un incremento del 6.35 %. Este resultado coincide con lo reportado para células en suspensión de *Cistanche deserticola*, en las que se obtuvo un aumento de producción de feniletanoides del 100% sin afectar el crecimiento de la biomasa (Cui-tao y Xing-guo, 2003).

El género *Fusarium* se ha utilizado como elicitador para la producción de metabolitos secundarios en células en suspensión (Daayf *et al.*, 2003), sin embargo, hay pocos reportes del uso de la especie *F. solani* en células en suspensión para la inducción de

la producción de metabolitos secundarios *in vitro*. Este es el primer reporte de la producción de (+)-medicarpina en células en suspensión de *D. congestiflora* y el efecto en el incremento tanto de biomasa como de este metabolito, con el uso de del filtrado estéril de *F. solani*.

Con estos resultados obtenidos, se eligió el medio MST9 con 1 mg/mL del filtrado estéril de *F. solani*, con 30 g/L de sacarosa y el contenido del 100% de nitratos del medio MS, como el mejor tanto para la obtención de biomasa como para la producción de (+)-medicarpina.

3.6. Conclusiones

En las células en suspensión de *Dalbergia congestiflora*, los factores abióticos y bióticos estimularon un aumento en la producción de (+)-medicarpina, aunque afectando drásticamente el crecimiento celular.

El mayor crecimiento se obtuvo en células cultivadas en luz continua con 1.8 g/10 mL peso fresco y en las tratadas con el filtrado estéril (1 mg/mL) de *Fusarium solani* (1.79 mg/mL), tratamiento con el que se consiguió la mayor producción de medicarpina (7.16 mg/mL), 6.35% veces más que el contenido en células no tratadas.

III.7. Literatura citada

Arias Z.M., Angarita V.M.J., Aguirre C.A, Restrepo F.J.M. y Montoya V.C. 2009. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín.62(1):4881-4895.

Akalezi C., Liu S., Li Q., Yu J. y Zhong J. 1999. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. Process Biochemistry. 34(6):639-642.

Báez-Magaña M. 2014. Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

CITES. 2017. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES). Apéndice I y II.

Cui-tao y Xing-guo. 2003. Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. Biotechnology Letters 25:1437–1439.

Daayf F., Bellaj M., Hassni M., J'Aiti F., y Hadrami I. 2003. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture médium. Environmental and Experimental botany. 9(1) 41-47.

Dixon R.A. y Fuller K.W. 1977. Characterization of components from culture filtrates of *Botrytis cinerea* which stimulate phaseollin biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. Physiological Plant Pathology. 11(3):287-296.

Foley W. y B. Moore. 2005. Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores-from physiological regulation to ecosystem function. Current Opinion in Plant Biology 8(4):430-435.

Gómez-Torres L.M., Moreno-Gómez B., Velásquez-Lozano M.E., Aguirre-Mancilla C., Aguado-Santacruz G.A. 2014. Cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión. Establecimiento y perspectivas de aplicación. Fitotecnia Mexicana. 37(2):165-179.

Huerta-Olalde A. 2015. Obtención de plantas mutantes por radiación gamma de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi) tolerantes a *Botrytis cinerea*. Tesis de Maestría. Facultad de Farmacobiología. UMSNH. 80 pp.

Lianhe Z., Li W., Xing H., y Zhengxing C. 2011. Antioxidant activities of seed extracts from *Dalbergia odorifera* T. Chen. African Journal of Biotechnology. 10(55)

Martínez-Sotres C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quñones J.G, Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R. 2012. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. International Biodeterioration & Biodegradation. 69:38-40.

Morales-Palacios F. 2016. Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis maestría. Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera. UMSNH. 195 p.

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 15:473-479.

Naoumkina M., Farag A. M., Summer W. L., Tang Y., Liu C. y Dixon R. 2007. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. 104 (46): 17909-17915.

Pérez-Gutiérrez R.M., y García-Baez E., 2013. Citotoxic activity of isoflavan-cinnamylphenols from *Dalbergia congestiflora* on HeLa cells. Academic Journals. 7(40): 2992-2998.

Schlatmann J.E., Moreno P.R.H., Selles S., Vinke J.L., Tenhoopen H.J.G., Verpoorte R. y Heijnen J.J. 1995. Two stage batch process for the production of ajmalicine by *Catharanthus roseus*: the link between growth and production stage. Biot. Bioeng. 47: 53-59.

Takeshi Y., Minami E., Ueki J., y Shibuya N., 2005. Elicitor-induced Activation of Phospholipases Plays an Important Role for the Induction of Defense Responses in Suspension-cultured Rice Cells. *Plant and Cell Physiology*. 46(4): 579-587.

Thanh N., H. Murthy, K. Yu, E. Hahn and K. Paek. 2005. Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors. *Applied Microbial and Biotechnology*. 67(2):197-201

Vanisree M. y Tsay, H.S. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal *Elicitors en la producción de cardenólidos* 61 plants of Taiwan. *Medicinal plant biotechnology*. 267-285.

Wang H., Yu J. y Zhong J. 1999. Significant improvement of taxane production in suspensión culture of *Taxus Chinensis* by sucrose feeding strategy. *Process Biochemistry*. 35(5): 479-483.

Yu K.W., Murthy H.N., Jeong C.S., Hahn E.J y Paek. 2005. Organic germanium stimulates the growth of ginseng adventitious roots and ginsenoside production. *Process Biochemistry*. 40(9):2959-2961.

Zhao J., Davis L., y Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23(4): 283-333.

Zhang H., Memelink, J. 2009. Regulation of secondary metabolism by jasmonate hormones. En: Osbourn, AE.; Lanzotti, V. (Eds). *Plant-derived Natural Products*. 181-194.

Zhan Y., Zhong J. y Yu J. 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspensión cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of médium sucrose. *Journal of Biotechnology*. 51(1):49-56.

Zhong J. y Wang S. 1998. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process Biochemistry*. 33(6): 671-675.

Zhong J. 2002. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94(6): 591-599.

CAPÍTULO 4

Actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en células en suspensión de *Dalbergia congestiflora* tratadas con sacarosa y filtrado estéril de *Fusarium solani*

4.1. Resumen

Se utilizaron células en suspensión de *Dalbergia congestiflora* cultivadas el medio basal MST9 y mantenidas por 20 días a 120 rpm, con 16 h luz y 25 °C, para determinar el efecto de la sacarosa y el filtrado estéril de *Fusarium solani* sobre la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Las células fueron tratadas con 20 g/L de sacarosa (factor abiótico) y con 1 mg/mL del filtrado estéril de *F. solani* (factor biótico) para determinar la actividad de la PAL cada 4 días. Una muestra de 0.5 g de células de cada tratamiento de factor abiótico o factor biótico se utilizó para la determinación durante 20 días. La actividad de PAL fue comprobada por un método espectrofotométrico que consiste en determinar la producción de cinamato ($\lambda=290$ nm). La actividad inicial de la PAL (Tiempo 0) en las células del tratamiento control fue de 331.04 pkat/g p.f. Dos picos de actividad de la PAL se encontraron en las células control: una actividad de 405.3 y 366.06 pkat/g p.f. a los 4 y 16 días, respectivamente. Sin embargo, en las células tratadas con el factor abiótico, se observó una reducción a esos mismos días con valores de 380.12 y 327.58 pkat/g p.f, respectivamente. La mayor actividad de PAL fue observada en las células tratadas con el factor biótico con picos de 434 y 408.34 pkat/g p.f., a los 4 y 16 días, respectivamente. La alta actividad enzimática de PAL observada en las células de *D. congestiflora* sugiere que reconocen los fragmentos de la pared del hongo estéril y activan la ruta metabólica de los fenilpropanoides para la producción de fitoalexinas, como la medicarpina. Este incremento de la actividad de la PAL se relaciona directamente con la mayor producción de medicarpina (7.16 mg/mL) descrita en el Capítulo III.

Palabras clave: fenilalanina amonio liasa (PAL), suspensiones celulares, *Dalbergia congestiflora*, medicarpina, factores abióticos y bióticos.

4.1.1. Abstract

In this research, *Dalbergia congestiflora* suspension cells cultured in the basal MST9 medium (1.5 mg/L benzyladenine and 0.1 mg/L naphthalenacetic acid) and kept for 20 days at 120 rpm, with 16 h light and 25 °C, were used to to determine the effect of sucrose and sterile filtrate of *Fusarium solani* on the activity of the enzyme phenylalanine ammonium lyase (PAL). The cells were treated with 20 g/L of sucrose (abiotic factor) and with 1 mg / mL of the sterile filtrate of *F. solani* (biotic factor), to determine the activity of PAL every 4 days, using a sample of 0.5 g of cells from each treatment (abiotic factor and biotic factor) was used for detection for 20 days. PAL activity was determined by a spectrophotometric method consisting of determining the production of cinnamate ($\lambda = 290$ nm), expressed in units pkat / g of fresh weight (p.f.).

The initial PAL activity (Time 0) in the untreated cells (control), grown in the MST9 medium, was 331.04 pkat / g mp, finding two peaks of PAL activity were found in all the cultures, presenting control cells: an activity of 405.3 and 366.06 pkat / g pf at 4 and 16 days, respectively. However, in the cells treated with the abiotic factor (sucrose 20 g / L), a decrease was observed on these same days, with values of 380.12 and 327.58 pkat / g p.f, respectively. The highest PAL activity was observed in the cells treated with the biotic factor (sterile filtering of *F. solani*), with peaks reaching 434 and 408.34 pkat / g p.f., at 4 and 16 days, respectively. This increase was 1.31 times more than PAL activity in untreated cells and 1.14 times more than those treated with 20% sucrose, 4 days after culture. The high enzymatic activity of PAL observed in *D. congestiflora* cells suggests that they recognize fragments of the wall of the sterile fungus (*F. solani*), and activate the metabolic pathway of phenylpropanoids for the production of phytoalexins, such as medicarpine. This increase in PAL activity is directly related to the higher production of medicarpine (7.16 mg / mL) described in Chapter III.

Keywords: Abiotic and biotic factors, cell suspensions, *Dalbergia congestiflora*, medicarpine, phenylalanine ammonium lyase (PAL).

4.2. Introducción

La producción *in vitro* de metabolitos secundarios se ha estudiado en células en suspensión de diferentes plantas como *Panax ginseng* (Mohammad *et al.*, 2006), *Cocos nucifera* (Chakraborty *et al.*, 2009) y de *Arnerbia euchroma* (Syklowska-Baranek *et al.*, 2012), entre otras, en las que se evaluó la actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). En estos trabajos se descubrió una relación de la producción de compuestos de origen fenólico, como ácidos fenilpropanoides, flavonoides, lignanos y taninos. Algunos compuestos de esta vía metabólica, del grupo de los flavonoides, son denominados fitoalexinas, metabolitos que se sintetizan como respuesta a una infección microbiana, aunque diversos factores pueden disparar la síntesis de éstas (García-Mateos y Pérez-Leal, 2003).

La fenilalanina es el metabolito precursor para la formación de este tipo de compuestos fenólicos, aminoácido aromático que es transformado por la PAL para sintetizar el ácido trans-cinámico, iniciando con esto, una de las rutas más importantes del metabolismo secundario de plantas: la ruta del ácido shikímico. A partir de esta ruta metabólica se sintetizan diferentes ácidos fenólicos como los fenilpropanoides,

flavonoides, antocianinas y taninos, incluidas las fitoalexinas del grupo de los flavonoides (Buchanan, 2000).

La actividad de esta enzima puede ser regulada por diferentes factores, ya sea disminuyendo o incrementando dicha actividad. Los factores pueden ser tanto abióticos (temperatura, luz, pH, fuente de carbono, de nitrógeno y de otros minerales) como bióticos (fragmentos de pared de hongos, quitosano y hongos fitopatógenos). La respuesta depende de la información genética de la célula al reconocer el inductor de la actividad de la enzima, que son conocidos como “elicitores” o inductores, término utilizado para referirse a compuestos que inducen la síntesis de fitoalexinas en plantas (Ebel, 1986; Ramírez-Estrada *et al.*, 2006).

La mayoría de la fitoalexinas derivadas de esta ruta metabólica, se han identificado en especies de leguminosas (familia Fabaceae) como la gliceolina, la faseolina y la medicarpina, son ejemplos de éstas (García-Mateos y Pérez-Leal, 2003). En particular, la medicarpina, un pterocarpano del grupo de los flavonoides, es producida en diversas plantas, aunque en bajas concentraciones en alfalfa, garbanzo y haba (Vaziri *et al.*, 1981, Kraft *et al.*, 1987 y Hargreaves *et al.*, 1976), así como en el duramen de algunas especies de *Dalbergia* (*D. stevensonii*, *D. odorifera*, *D. oliveri* y *D. congestiflora*) árboles maderables considerados en alguna categoría de riesgo de extinción (McMurry *et al.*, 1972; Milller *et al.*, 1989; Deesamer *et al.*, 2009; (Martinez-Sotres *et al.*, 2012). Por lo anterior, se buscan alternativas para elevar la producción de medicarpina y los cultivos *in vitro* de células en suspensión-son una opción viable que ofrece la biotecnología vegetal (Ramírez-Estrada *et al.*, 2006).

En diversos cultivos *in vitro*, se ha demostrado un aumento de fitoalexinas, en específico las del grupo de los flavonoides y sus derivados. La producción *in vitro* de la medicarpina, se ha estudiado en diversas plantas y se ha elucidado que ésta se sintetiza por la vía del ácido shikímico (Guo y Paiva, 1995). Ni *et al.* (1996) observaron una relación entre la actividad de la PAL y la acumulación de la medicarpina en células

en suspensión de alfalfa, aunque no hay estudios reportados para la producción *in vitro* de medicarpina en especies de *Dalbergia*.

En este capítulo se evaluó la actividad enzimática de la PAL en cultivos de células en suspensión de *D. congestiflora*. El efecto del factor abiótico (20 g/L de sacarosa) y el factor biótico (1.0 mg/mL de filtrado estéril de hongo *Fusarium solani*) fue determinado sobre el aumento de medicarpina.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Material Biológico

Se utilizaron células en suspensión de *D. congestiflora* de un tercer subcultivo (de 15 días cada uno) y con un 80% de viabilidad, provenientes de callos obtenidos de segmentos de hojas de plántulas *in vitro* y mantenidas en medio nutritivo MS con 1.5 mg/L de benciladenina (BA) y 0.1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) denominado MST9, suplementado con 30 g/L de sacarosa, con un ajuste de pH a 5.7. Las células fueron cultivadas en condiciones de agitación orbital continua (120 rpm) a 25°C en condiciones de luz (2000 luxes de intensidad).

4.3.1.1. Factor biótico

Filtrado estéril de Fusarium solani. El hongo fuente del filtrado estéril, pertenece al cepario del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Fue cultivado por 16 días en medio sólido de agar-dextrosa-papa (PDA, Bioxon®). El filtrado de hongo estéril se obtuvo, con el método reportado por Dixon y Fuller (1977), que consiste en pesar un gramo de micelio con esporas del hongo con agar y disolver en 100 mL de agua. Se separó una solución 1 g/100 mL y se esterilizó por 30 minutos que es el tiempo de inocuidad reportado por Huerta-Olalde (2015). En condiciones asépticas de campana de flujo laminar se obtuvo el filtrado del hongo que se utilizó

como inductor biótico para la producción de medicarpina, en una concentración de 1 mg/mL (n=3).

4.3.1.2. Factor abiótico

Factor fuente de carbono. Para este inductor fisicoquímico se preparó el medio MST9 y se modificó la concentración de sacarosa a 20 g/L con un pH 5.7, que es la única concentración empleada en esta investigación (n=3).

4.3.2. Extracción y determinación de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL)

Los extractos para la determinación de la actividad de PAL, se realizó con 0.5 g en peso fresco de células de *D. congestiflora* provenientes de los diferentes tratamientos ensayados en esta investigación. Las células se pulverizaron con nitrógeno líquido, al polvo fino resultante, se le colocó 5 mL de acetona fría por 15 min y se procesó en una centrífuga Beckman Coulter a 20,000 rpm/15 min a 4 °C. Al *pellet* obtenido se le adicionaron 2 mL de borato de sodio 100 mM (pH 8.8), 1 mL EDTA 2 mM, 1 mL de β -mercaptoetanol 5 mM y 1 mL de ácido polivinilpirrolidona al 10%, obteniendo un volumen de 5 mL, que se llevó a centrifugación en las mismas condiciones antes mencionadas. Todos los reactivos utilizados son de la marca Sigma-Aldrich®.

Para el análisis de actividad PAL, del sobrenadante obtenido se tomó 1 mL y se preparó la mezcla de reacción con 1 mL de L-fenilalanina 15 μ M, 1 mL de borato de sodio 30 mM (pH 8.8), se obtuvo un volumen total de 3 mL. La actividad de la PAL resultó por la producción de cinamato, producto final de la reacción de la enzima a partir de fenilalanina. El producto se dejó reposar por 1 h a 30 °C y se midió por el cambio de absorbancia a 290 nm (Zucker, 1965). Los datos se expresaron por la actividad enzimática en pkat/g de peso fresco (1 mol de producto por 1 mol de sustrato por segundo). La unidad de pkat es una unidad de medición de la actividad de una enzima y se obtiene de la siguiente expresión:

Donde: $1 \text{ pkat} = \frac{\text{la actividad de una enzima}}{1 \text{ mol del sustrato (fenilalanina)}} = 1 \text{ mol de ácido cinámico}$

Para la cuantificación de la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL), se preparó una curva de calibración de ácido cinámico en concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mM y se obtuvieron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 290 nm en un espectrofotómetro UV/VIS modelo VE-5100UV Científica Vela Quin, México (Zucker, 1965).

La actividad de la fenilalanina amonio liasa se cuantificó en células en suspensión cultivadas en el medio MST9, en el que se logró la mayor producción de medicarpina (tema abordado en el Capítulo III), con 20 g/L de sacarosa y 1 mg/mL de filtrado estéril de *Fusarium solani* la determinación se realizó cada 4 días por 20 días (n=3).

4.3.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA de una vía y una prueba de Tukey. Los valores analizados fueron la actividad de la fenilalanina amonio liasa por gramo de peso fresco en las suspensiones celulares de *D. congestiflora* con una n=3, utilizando el paquete estadístico JP8.

4.4. Resultados

4.4.1. Determinación de actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL)

Para la cuantificación de la actividad de PAL, se utilizó la curva de calibración realizada con ácido cinámico (Figura 20). La lectura máxima fue de 1.9 nm en la concentración de 2.5 mM y en una mínima de 0.9 nm en la concentración de 0.1. Se obtuvo una curva de linealidad con una R^2 de 0.9935. La ecuación de esta recta fue utilizada para la determinación de la actividad de la PAL, en las células en suspensión de *D. congestiflora*.

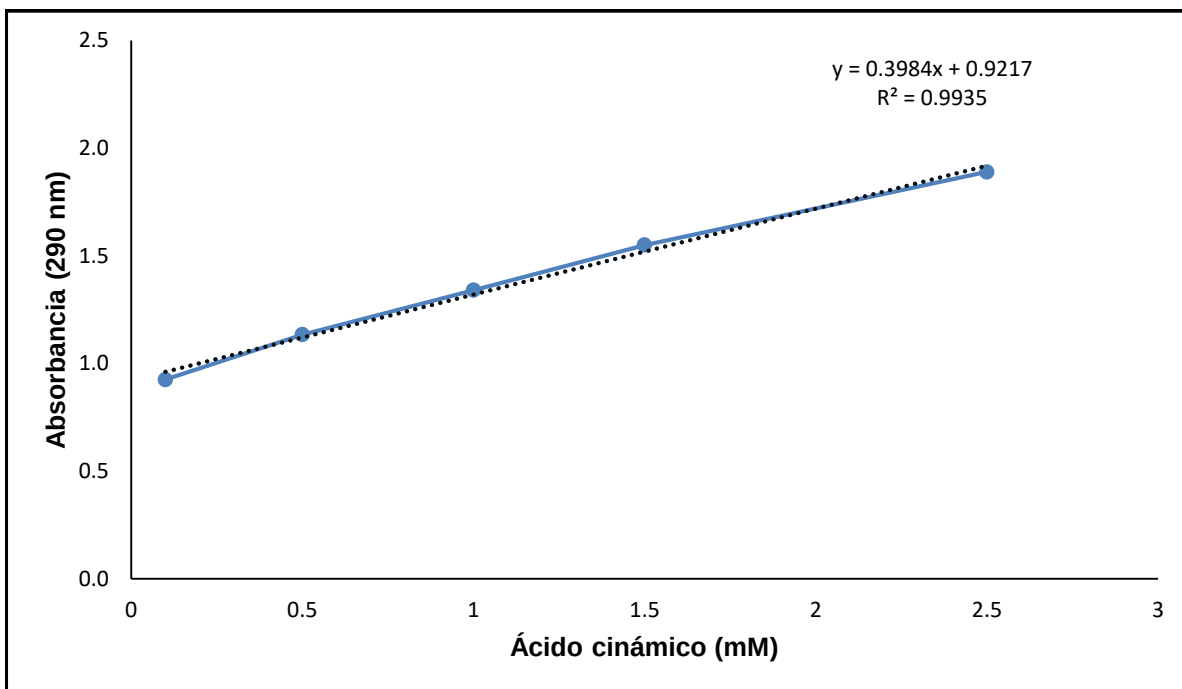


Figura 20. Curva de calibración de ácido cinámico (mM) ($\lambda=290$ nm).

Al inicio de la cinética de crecimiento de las células en suspensión de *D. congestiflora* (tiempo 0), se observó una actividad enzimática basal de 331.04 pkat/g de p.f. en cada uno de los tratamientos, ya que todos provienen del mismo cultivo (Figura 21). A los 4 días del cultivo, las células mostraron un incremento en la actividad en todos los tratamientos, aunque la actividad más alta con 434 pkat/g p.f. se presentó en células cultivadas en MST9 con 1 mg/mL de filtrado estéril de *F. solani*, una actividad de 1.31 veces más que la presentada por las células cultivadas con 20 g/sacarosa, las que alcanzaron 380 pkat/g (Figura 21).

La actividad de PAL en las células cultivadas en MST9 con 20 g/L de sacarosa fue baja hasta los 16 días del cultivo y disminuyó hasta 265.78 pkat/g a los 12 días de la cinética, sin diferencia significativa con la actividad enzimática de células control. A los 16 días del cultivo, la actividad de PAL mostró nuevamente un incremento, con pico máximo de 408.34 pkat/g p.f. en las células tratadas con el filtrado estéril de *F. solani*, más de 1.11 veces que la obtenida en células control (366.06 pkat/g p.f.). Las

células cultivadas con 20 g/L de sacarosa mantuvieron la actividad más baja (327 pkat/g p.f.). La actividad de PAL disminuyó drásticamente a los 20 días en los tres tratamientos: control, 20 g/L de sacarosa y 1 mg/mL de *F. solani* con 252.84, 285.62 y 268.44 pkat/g p.f., respectivamente.

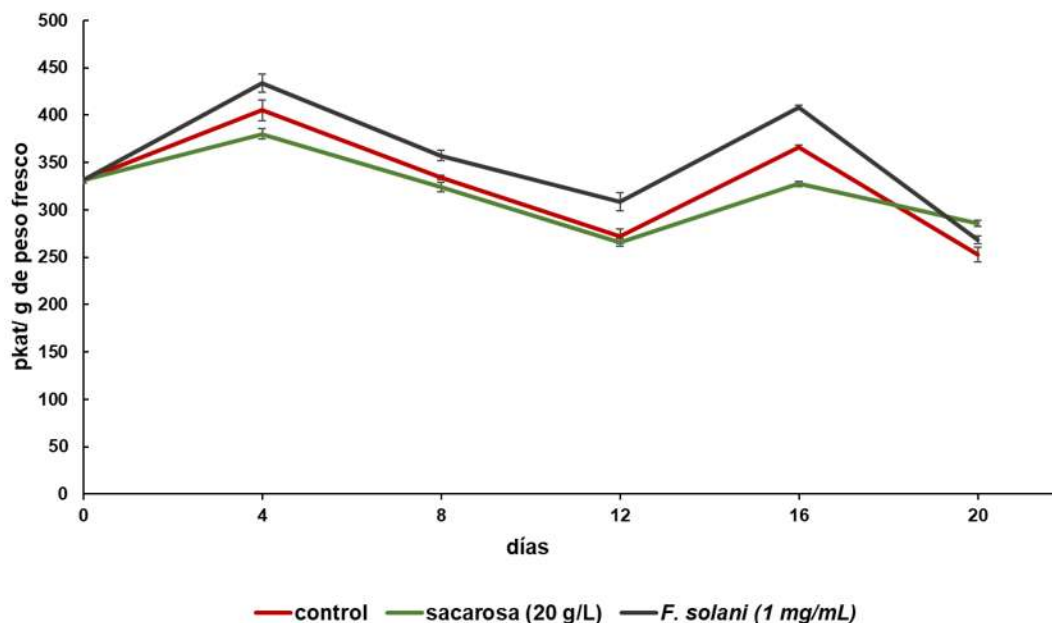


Figura 21. Cinética de la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) en células en suspensión de *D. congestiflora* cultivadas por 20 días en medio control MST9, medio MST9 con 20 g/L de sacarosa y medio MST9 con 1 mg/mL de filtrado estéril de *Fusarium solani*.

4.5. Discusión

La fenilalanina amonio liasa (PAL) es la enzima inicial para la conversión del aminoácido fenilalanina, proveniente de la ruta del ácido shikímico, hacia el ácido cinámico, precursor de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignina y taninos. En este estudio se analizó la PAL por ser la enzima inicial para llegar a la formación de la medicarpina (Naoumkina *et al.*, 2007), solamente en las células en suspensión de *D. congestiflora* tratadas con la mejor condición para un óptimo crecimiento y

producción de (+)-medicarpina (MST9 con 20 g/L de sacarosa, 100% de nitratos y 1 mg/mL de filtrado estéril de *F. solani*). La síntesis de la medicarpina es dependiente de la actividad de la PAL, por lo que al encontrar una alta actividad de ésta, estará relacionada con la producción de este compuesto (Oommen 1994; Naomkina *et al.*, 2007).

Desde el tiempo 0 del cultivo de las células en suspensión de *D. congestiflora* se observó actividad de la PAL (331.04 pkat/g p.f.), lo que demuestra que la ruta metabólica es dependiente de esta enzima y está activa bajo las condiciones básicas del cultivo *in vitro* (medio de cultivo, pH, luz, agitación, entre otros factores).

A lo largo de la evaluación de la cinética de la actividad de la PAL, se observó un incremento de la actividad a los 4 días, y fue mayor en las células tratadas con 1 mg/mL de *F. solani* (434 pkat/g de p.f.), manteniéndose una diferencia significativa con respecto a los tratamientos control (MST9) y con sacarosa (20 g/L) (Figura 21). Aunque a los 12 días hubo una baja actividad de la enzima, a los 16 días se mostró de nuevo un aumento en las células tratadas, con un valor alto significativo con el tratamiento del filtrado estéril del hongo, alcanzando 408.34 pkat/g p.f., 1.11 veces más que las del tratamiento control y 1.24 veces más con la tratadas con 20 g/L de sacarosa (Figura 22).

Este comportamiento se debe, a que las células en suspensión de *D. congestiflora* reconocen a los fragmentos de la pared del hongo estéril (*F. solani*), activando su mecanismo de defensa aumentando la actividad de la PAL, que se relaciona directamente con la mayor producción de medicarpina (7.16 mg/mL) (Capítulo III).

Los valores de actividad de PAL en células en suspensión de *D. congestiflora* (08.34 pkat/g p.f.), son mayores a lo reportado por Ni *et al.* (1996) en las células de alfalfa donde la producción de medicarpina es menor, lo que sugiere la relación directa entre una alta actividad de PAL y la mayor producción de la (+)-medicarpina.

4.6. Conclusiones

La actividad enzimática de la PAL en las células de suspensión de *D. congestiflora*, se relaciona con la producción de la medicarpina en los tratamientos analizados control, 20 g/L sacarosa y 1 mg/mL de *F. solani*. Con este último, se activó el mecanismo de defensa aumentando la actividad de la PAL, que se relaciona directamente con la mayor producción de (+)-medicarpina (7.16 mg/mL, resultados del Capítulo III).

4.7. Literatura citada

Baenas N., Garcia-Viguera C. y Moreno D.A. 2014. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*. 19:13541-13563.

Buchanan B., Gruissem W. y Jones R., 2000. *Biochemistry y Molecular Biology of Plants*. Edit. American Society of Plant Physiologists. 1281-1292.

Chakraborty M., Karum A., y Mitra A., 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology*. 166:63-71.

Deesamer S. W., Chavasiri, N., Chaichit, N., Muangsin, U. y Kokpol, 2009. "9-Methoxy-6a, 11a-dimethyl-6a, 11a-dihydro-6H-1-benzofuro [3, 2-c] chromen-3-ol from *Dalbergia oliveri*." *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*. 65(10):02387-02387.

Dixon R.A. y Fuller K.W. 1977. Characterization of components from culture filtrates of *Botrytis cinerea* which stimulate phaseollin biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Physiological Plant Pathology*. 11(3):287-296.

Ebel J. 1986. Phytoalexin Synthesis: The Biochemical Analysis of the induction Process. *Annals Review Phytopathology*. 24:235-264.

Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecorieux D., Poinssot B., Wendehenne D. y Pugin A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant Microbe Interact*. 19:711-724.

García-Mateos R. y Pérez-Leal R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismo de Defensa de las Plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 9:5-10.

Guo L y Paiva N.L. 1995. Molecular cloning and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) vestitone reductase, the penultimate enzyme in medicarpin biosynthesis. *Biochemistry and biophysics*. 320(2):353-360.

Hargreaves J. A., Mansfield J.W., y Coxon D.T., 1976. Identificación of medicarpin as a phytoalexin in the broad vean plant (*Vicia faba* L.). *Nature*. 262:318-19.

Kraft B., Schwenen L., Stöckl D. y Barz W. 1987. Degradation of the pterocarpan phytoalexin medicarpin by *Ascochyta rabiei*. Microbiology.147:201-207.

Martínez-Sotres C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quiñones J.G., Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J., y Herrera-Bucio R., 2012. Medicarpin an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. International Biodeterioration and Biodegradation. 69:38-40.

Miller D.K., Sadowski S., Gui Q.H., y Joshua H., 1989. Identification and isolation of medicarpin and a substituted benzofuran as potent leukotriene inhibitors in an anti-inflammatory Chinese herb. PLEFA. 38(2):137-143.

Mohammad B.A., Nisha S., Abdullah M.S. Eun.J.H. y Kee-Yoeup P. 2006. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspensión cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. Plant Science.171:147-154.

Morales-Palacios F. 2016. Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis maestría. Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera. UMSNH. 195.

McMurry T.B.H., Martin E., Donnelly D.M.X. y Thompson J.C., 1972. 3-Hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxypterocarpan Phytochemistry.11:3283-3286.

Naoumkina M., Farag M., Lloyd W. S., Tang Y., Liu C., y Dixon R., 2007. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. PNAS. 104(46):17911-17915.

Ni W., Sewalt V., Kenneth L., Korth J., Blount C., Ballance M. y Dixon R., 1996. Stress Responses in Alfalfa. Plant Physiol. 11:(2) 717-726.

Oommen A., Dixon R.A. y Paiva N.L., 1994. The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. Plant Cell. 6:(12)1789-1803.

Ramírez-Estrada K., Vidal-Limón H., Hidalgo D., Moyano E., Golenioswki M., Cusidó R.M., y Palazon J. 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. Molecules. 21:182.

Syklowska-Baranek K. Pietrosiuk A., Naliwajski M.R., Kawiak A., Jeziorek M., Wyderska S., Lojkowska E. y Chinou I. 2012. Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. In Vitro Cell. 48:555-564.

Vaziri A., Keen N.T. y Erwin D.C. 1981. Correlation of medicarpin production with resistance to *Phytophthora megasperma* f.sp. medicaginis in alfalfa seedlings. Phytopathology. 71:1235-1238.

Zhao J., Davis L.C. y Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol. Adv. 23:283-333.

Zucker M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in *potato tuber* tissue. Plant Physiol. 40:779-784.

7. CONCLUSIONES

Se logró establecer los cultivos de callos *in vitro* apartir de las hojas de plántulas *in vitro* de *D. congestiflora*, en un medio denominado MST9 (30 g/L de sacarosa, con 1.5 de BA y 0.1 ANA mg/mL), en el que además de su alta friabilidad, se obtuvo un máximo de biomasa. En este mismo medio, se establecieron los cultivos en suspensión, en los que las células presentaron un 80% de viabilidad y una alta homogenidad durante la división celular. A partir del tercer cultivo (16 días cada uno), se consiguió un incremento de 4 veces en la biomasa, en comparación con la del inóculo inicial.

Tanto en callos como en las células en suspensión, se aisló e identificó la (+)-medicarpina, utilizando diclorometano como disolvente y utilizando resonancia magnética nuclear (¹HMNR). Es el primer reporte de la producción de esta fitoalexina en cultivos *in vitro* de *D. congestiflora*. La cuantificación de (+)-medicarpina producida se realizó espectrofotometría.

Con la determinación del efecto tanto de inductores bióticos como abióticos sobre la producción de (+)-medicarpina en células en suspensión de *D. congestiflora*, se estableció un alto contenido (7.16 mg/mL) con la adición de 1 mg/mL del filtrado estéril de *F. solani*, mayor que lo reportado para otras especies productoras de medicarpina.

Con la medición de la actividad de la enzima fenilalanil amonioliasa (PAL), se determinó que ésta es directamente proporcional a la producción de (+)-medicarpina, en las células en suspensión de *D. congestiflora* tratadas con el inductor biótico. Este resultado confirma que se requiere de la inducción de PAL para obtener un mayor contenido de (+)-medicarpina, aunque ésta es producida de forma basal tanto en callos como en células en suspensión no tratados.

8. LITERATURA GENERAL CITADA

Abdelnour A. y Escalante V. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Centro Agronómico de Investigaciones y Enseñanza. IICA. 38 pp.

Arias Z.M., Angarita V.M.J., Aguirre C.A.M., Restrepo F.J.M. y Montoya V.C. 2009. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. 62(1): 4881-4895.

Akalezi C., Liu S., Li Q., Yu J. y Zhong J. 1999. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. Process Biochemistry. 34(6):639-642.

Baenas N., Garcia-Viguera C., Moreno D.A. 2014. Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. Molecules. 19:13541–13563.

Báez-Magaña M. 2014. Efecto de los ácidos grasos de semilla de aguacate y sus derivados sobre la respuesta inmune innata durante la internalización de *Staphylococcus aureus* en células epiteliales mamarias bovinas. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 78 p.

Bhargavan B., Gautam K.A., Mishra S.J., Kumar A., Goel A., Dixit M. Pandey R., Manickavasagam L, Dwivedi S.D., Ramachandran R., Maurya R., Trivedi A., Chattopadhyay N., Sanya S. 2012. Medicarpin a legume phytoalexin stimulates osteoblast differentiation and promotes peak bone mass achievement in rats: evidence for estrogen receptor β -mediated osteogenic action of medicarpin. The Journal of Nutrition al Biochemistry. 23(1):27–38.

Borejsza-Wysocki W., Borejsza-Wysocka E. y Hrazdina G. 1997. Pisatin metabolism in pea (*Pisum sativum* L.) cell suspension cultures. Plant Cell Rep. 16(5):304-309.

Bougard F., Gravot A., Milesi S. y Gontier E. 2001. Production of secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science. 161(5): 839-851.

Brukhin V.B., Moleva I.R., Filonova L.H., Grakhov V.P., Blume A.B. y Bozhkov P.V. 1996. Proliferative activity of callus cultures of *Taxus baccata* L. in relation to anticancer diterpenoid taxol biosynthesis. Biotechnology letters. 18(11):1309-1314.

Buchanan B., Gruissem W., R. Jones R., 2000. Biochemistry y molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. 1281-1292.

Capote A., Pérez-Alonso N., Pérez A., Wilken D., Gerth A., Lutz Müller-Kuhrt L. y Jiménez E. 2009. Efecto del cultivo *in vitro* en el perfil metabólico de *Psidium guajava* L. Biotecnología Vegetal. 9(1):41-45.

Calva C.G. y Pérez V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. Revista Digital Universitaria UNAM.
<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>

CITES. 2017. The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). Appendices I and II. https://cites.org/sites/default/files/notif/F-Notif-2016-043_0.pdf. (Valid from 4 October 2017).

Chakraborty M., Karum A., y Mitra A. 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. Journal of Plant Physiology.166:63-71.

Chawla H.M., Chibber S.S. y Seshadri T.R. 1976. Volubilin, a new isoflavone-C-glycoside from *Dalbergia volubilis* flowers. Phytochemistry. 15:235-237.

Choi C.W., Choi Y.H., Cha M.R., Kim Y.S., Yon G.H., Kim Y.K., Choi S.U., Kim Y.H. y Ryu S.Y. 2009. Antitumor components isolated from the heartwood extract of *Dalbergia odorifera*. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 52:375-379.

Chiou S., Su W. y Su Y. 2001. Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. Journal of Biotechnology, 85(3): 247-57.

Cusidó R.M., Palazón J., Bonfill M., Navia-Orsorio A., Morales C. y Piñol M.T. 2002. Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. Biotechnol. Prog.18:418-423.

Cui-tao y Xing-Guo. 2003. Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. Biotechnology Letters 25:1437–1439.

Das P., S. Samantaray A.V., Roberts y Rout. G.R. 1997. *In vitro* somatic embryogenesis of *Dalbergia sisso* Roxb. a multipurpose timber yielding tree. Plant Cell Reports 16: 578-582.

Daayf F., Bellaj M., Hassni M., J'Aiti F., y Hadrami I. 2003. Elicitation of soluble phenolics in date palm (*Phoenix dactylifera*) callus by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* culture médium. Environmental and Experimental Botany. 9(1):41-47.

Deesamer S. W., Chavasiri N., Chaichit N., Muangsin U. y Kokpol. 2009. 9-Methoxy-6a, 11a-dimethyl-6a, 11a-dihydro-6H-1-benzofuro [3, 2-c] chromen-3-ol from *Dalbergia oliveri*. Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online. 65(10):02387-02387. DOI.10.1107/S1600536809034485

Dixon R.A. y Fuller K.W. 1977. Characterization of components from culture filtrates of *Botrytis cinerea* which stimulate phaseollin biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. Physiological Plant Pathology. 11(3):287-296.

Dixon R.A. y Lamb C.J. 1979. Stimulation of de novo synthesis of L-phenylalanine ammonia-lyase in relation to phytoalexin accumulation in *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-treated cell suspension cultures of french bean (*Phaseolus vulgaris*). Biochimica et Biophysica Acta. 586(3):453-463.

Dixon A.R., Prakash M. Dey A.M., Lawton A. y Lamb J.C. 1983. Phytoalexin Induction in French Bean: Intercellular Transmission of Elicitation in Cell Suspension Cultures and Hypocotyl Sections of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 71:252-256.

Dodds J. H. y Roberts L.W. 1995. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. N. Y.

Donnelly D.M.X., Thompson J.C., Whalley W.B. y Ahmad S. 1973. *Dalbergia* species. Part IX. Phytochemical examination of *Dalbergia stevensonii* Standl. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions. 1:1737-1745.

Dwari M. y Chand P.K. 1996. Evaluation of explants, growth regulators and culture passage for enhanced callus induction proliferation and plant regeneration in the tree legume *Dalbergia lanceolaria* L. Phyto-morphology 46:123-131.

Ebel J., 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. Annals Review Phytopathology. 24:235-264.

Eilert U.W.G., Kurz W. y Constabel F., 1985. Stimulation of sanguinarine accumulation in papaver somniferum cell cultures by fungal elicitors. Journal of Plant Physiology. 119(1):65-76.

Enríquez-Guevara E.A., Aispuro-Hernández E., Vargas-Arispuro I. y Martínez-Téllez M.A. 2010. Oligosacarinas derivadas de pared celular: actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. 28(2):148-155.

Feeney M., Bhagwat B., Mitchell J. y Lane W. 2007. Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (*Prunus avium* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 90:201-214.

Fett W.F. y Zacharius R.M. 1982. Bacterially-induced glyceollin production in soybean cell suspension cultures. Plant Science Letters. 24(3):303-309.

Foley W. y Moore. B. 2005. Plant secondary metabolites and vertebrate herbivores-from physiological regulation to ecosystem function. Current Opinion in Plant Biology 8(4): 430-435.

García-Águila L., De Fera M. y Acosta K., 2007. Aspectos básicos de conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal. 7(29):67-79.

Garcia-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecorieux D., Poinssot B., Wendehenne D. y Pugin A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol. Plant Microbe Interact. 19:711–724.

García-Mateos R., y Pérez-Leal R., 2003. Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 9:5-10.

Gómez-Torres L.M., Moreno-Gómez B., Velásquez-Lozano M.E., Aguirre-Mancilla C., Aguado-Santacruz G.A. 2014. Cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión. establecimiento y perspectivas de aplicación. Fitotecnica Mexicana 37(2):165-179.

Guo L. y Paiva N.L. 1995. Molecular cloning and expression of alfalfa (*Medicago sativa* L.) vestitone reductase, the penultimate enzyme in medicarpin biosynthesis. Biochemistry and biophysics. 320(2):353-360.

Gustine L.D. y Sherwood T.R. 1978. Regulation of phytoalexin synthesis in jackbean callus cultures. *Plant Physiol.* 61: 226-230.

Hansen R.C., Cochran K.D., Keener H.M. y Croom Jr. E.M. 1994. *Taxus* populations and clippings yields at comercial nurseries. *Hort. Technology.* 4(4):372-377.

Hargreaves J. A., Mansfield J.W., y Coxon D.T., 1976. Identificación of medicarpin as a phytoalexin in the broad vean plant (*Vicia faba* L.). *Nature.* 262:318-19.

Heinstein P. y El-Shagi H. 1981. Formation of gossypol by *Gossypium hirsutum* L. cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 44(1):1-6.

Hernández G. A. 2014. Propagación *in vitro* de *Dalbergia congestiflora* (campincerán) a partir de estacas cultivadas en invernadero. Tesis maestría. Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera. UMSNH. 72 p.

Irani N.G., Hernández J.M. y Grotewold E. 2003. Regulation of anthocyanin pigmentatium. *Rev. Adv. Phytochem.* 38:59-78.

Jiménez L.S., Castaño I.H., Quintana J.C. Gelmy L.C., Quinchia L. y Estrada S. 2008. Establecimiento de suspensiones celulares de *Bixa Orellana* L. productoras de compuestos fenolicos antiofídicos. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Medellin Colombia,* 15: 70-75.

Ketchum R., Gibson D., Croteau R. y Shuler M.L. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotech. Bioeng.* 62: 97-105.

Kosky R. G., 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez Ponce, JN (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara. 57-77 pp.

Kraft B., Schwenen L., Stöckl D. y Barz W. 1987. Degradation of the pterocarpan phytoalexin medicarpin by *Ascochyta rabiei*. *Microbiology.* 147:201-207.

Kreis W. 2007. *In vitro* culturing techniques of medicinal plants. En: Kayser O., Quax W. (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. 157-185 pp.

La NOM-059-SEMARNAT-2010. 11 y 12 de junio de 2015 en CONABIO. <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6050274>

Lee H. B., 1996. Fundamentals of Food Biotechnology. VCH Publishers. United Kingdom, 431 p.

Lianhe Z., Li W., Xing H., y Zhengxing C. 2011. Antioxidant activities of seed extracts from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *African Journal of Biotechnology.* 10(55):120-128.

Linares J., y Sousa M.S. 2007. Nuevas especies de *Dalbergia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae) en México y Centroamérica. *Ceiba.* 48(1-2):61-82.

Ma. C.J. 2008 Cellulase elicitor induced accumulation of capsidiol in *Capsicum annum* L. suspensión cultures. Biotechnol. Lett. 30:961-965.

Martínez D. M., Hernández R.C.A. y Restrepo B.L.F. 2007. Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I. Rev. Colomb. Biotechnol. 9(2):45-55.

Martínez-Sotres C., López-Albarrán P., Cruz-de-León J., García-Moreno T., Rutiaga-Quiñones J.G, Vázquez-Marrufo G., Tamariz-Mascarúa J. y Herrera-Bucio R., 2012. Medicarpin an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. International Biodeterioration y Biodegradation. 69:38-40.

Miller D.K., Sadowski S., Gui Q.H., y Joshua H., 1989. Identification and isolation of medicarpin and a substituted benzofuran as potent leukotriene inhibitors in an anti-inflammatory Chinese herb. PLEFA. 38(2):137-143.

Morales-Palacios F. 2016. Análisis espectroscópico de compuestos del duramen de maderas durables que inhiben el crecimiento de *Trametes versicolor*. Tesis maestría. Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera. UMSNH. 195 p.

Mohammad B.A., Nisha S., Abdullah M.S. Eun J.H. y Kee-Yoeup P. 2006. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspensión cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. Plant Science.171:147-154.

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-479.

McMurry T.B.H., Martin E., Donnelly D.M.X. y Thompson J.C. 1972. 3-hydroxy-9-methoxy and 3-methoxy-9-hydroxypterocarpanes. Phytochemistry.11:3283-3286.

Naoumkina M., Farag A. M., Summer W. L., Tang Y., Liu C. y Dixon R. 2007. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. 104 (46):17909-17915.

Ni W., Sewalt V., Kenneth L., Korth J., Blount C., Ballance M. y Dixon R., 1996. Stress Responses in Alfalfa. Plant Physiol. 11:(2) 717-726.

Paz M., Vázquez F., Chuqui R., Paredes C., Sauvain M. Y Giménez A., 2006. Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Galipea longiflora*, una Rutaceae de la Amazonia Boliviana. Latin American Journal of Pharmacy. Lat. Am. J. Pharm. 26 (1):9-15.

Pérez-Alonso N., y Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. Biotecnología Vegetal. 11(4).124-132.

Pérez-Gutiérrez R.M., y García-Baez E. 2013. Citotoxic activity of isoflavan-cinnamylphenols from *Dalbergia congestiflora* on HeLa cells. Academic Journals. 7(40): 2992-2998.

Peters S., Velzen E. y Janssen H.G. 2009. Parameter selection for peak alignment in chromatographic sample profiling: objective quality indicators and use of control samples. Anal. Bioanal. Chem. 394: 1273-1281.

- Pierick R.L.M.** 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa Madrid. 324 p.
- Parc G.** Canaguier A. Landré P. Hocquemiller R., Chriqui D. y Meyer M. 2002. Production of taxoids with biological activity by plants and callus culture from selected *Taxus* genotypes. *Phytochemistry*. 59:725-730.
- Pradhan C.**, Kar S., Pattnaik S. y Chand P.K. 1998. Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb through *in vitro* shoot proliferation from cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep.* 18: 122-126.
- Prakash G.** y Srivastava A. 2005. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Jyss) suspension cultures. *Process Biochemistry*. 40(12): 3795-3800.
- Prakash G.** y Srivastava A. 2006. Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal*. 29(1-2): 62-68.
- Oncina R.**, Botía J.M., Del Río J.A. y Ortuño A. 2000. Bioproduction of diosgenin in callus cultures of *Trigonella foenum-graecum* L. *Food Chemistry* 70(4): 489-492.
- Oommen A.**, Dixon R.A. y Paiva N.L., 1994. The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. *Plant Cell*. 6:(12)1789-1803.
- Orozco S.F.**, Hoyos S.R. y Arias Z.M.E., 2002 A. Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea*. *Rev. Colombiana de Biotecnología*. 4(1): 43-48.
- Orozco S.F.**, Hoyos S.R y Arias Z.M.E. 2002 B. Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios *Rev. Fac. Nal. Agr.* 55(1):473-1495.
- Orozco-Sánchez F.** y Rodríguez-Monroy M. 2007. Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6(3): 251-258.
- Orr D.J.**, Edwards R y Dixon R., 1998. Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 101: 847-856.
- Rahimi-Ashtiani S.**, Hasanloo T. y Bihamta M.R. 2010. Enhanced production of silymarin by Ag+ elicitor in cell suspension cultures of *Silybum marianum*, *Pharmaceutical Biology*, 48(6):708-715.
- Ramirez-Estrada K.**, Vidal-Limón H., Hidalgo D., Moyano E., Golenioswki M., Cusidó R.M., y Palazon J., 2016. Elicitation an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*. 21(2):182.
- Rashmi R.** y Trivedi M. (2014) Effect of various growth hormone concentration and combination on callus induction, nature of callus and callogenic response of *Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

- Righetti L.**, Franceschetti M., Ferri M., Tassoni A. y Bagni N. 2007. Resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspensions treated with several elicitors. *Caryologia*. 60(1-2):168-171.
- Quevedo T.L.**, Morales P.F.G., Martínez S.M.C., López A.P., Tamariz M.J. y Herrera B.R. 2012. Medicarpina aislada e identificada de *Dalbergia congestiflora* Pittier. *Rev. Latinoamericana Química*. 39:357.
- Salgado-Garciglia R.** y Ochoa A.N. 1990. Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell*. 8: 617-620.
- Sajc L.**, D. Grubisic, y Vunjak-Novakovic G., 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochem. Eng. J.* 4:89-99.
- Santamaria A.R.**, Mulinacci N., Valletta A., Innocenti M. y Pasqua G., 2011. Effects of elicitors on the production of resveratrol and viniferins in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *J. Agric. Food Chem.* 59(17):9094-9101.
- Sreedevi E.**, Pullaiah T. y Kishor P. 1999. *In vitro* plantlet regeneration from seedling explants of *Dalbergia paniculata* Roxb. In *Plant tissue culture and biotechnology: emerging trends*. Proceedings of a symposium held at Hyderabad, Universities, Hyderabad, India. 112-117pp.
- Sujanya S.** Poornasri Devi B. y Isha S. 2008. *In vitro* production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Biosciences*. 33:113-120.
- Sülün Ü.**, Erbay D., Ellialtıoğlu S. y Mehmetoğlu Ü. 2014. The Effects of Biotic and Abiotic Elicitors on the Capsidiol Accumulation in Cell Suspension Cultures of *Capsicum Annuum* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* .18(1):47-53.
- Syklowska-Baranek K.**, Pietrosiuk A., Naliwajski M.R., Kawiak A., Jeziorek M., Wyderska S., Lojkowska E., Chinou I. 2012. Effect of L-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston. *In Vitro Cell.* 48:555-564.
- Takeshi Y.**, Minami E., Ueki J., y Shibuya N., 2005. Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology*. 46(4): 579–587.
- Thanh N.**, H. Murthy K. Yu, E. Hahn y K. Paek. 2005. Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors. *Applied Microbial and Biotechnology*. 67(2):197–201.
- Trejo-Espino J.L.**, Rodríguez-Monroy M., Vernon-Carter E.J y Cruz-Sosa F. 2010. Propiedades emulsificantes de la goma producida por cultivo de células en suspensión de *Prosopis laevigata* m.c. Johnston. (mezquite) en un biorreactor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 9(3):251-260.
- Valverde L.C.** y Alvarado G.L. 2004. Organogénesis *in vitro* en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). *Rev. Biol. Trop.* 52(1): 132-140.

Vanisree M. y Tsay H.S. 2007. Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants. *Elicitores en la producción de cardenólidos* 61 plants of Taiwan. *Medicinal Plant biotechnology*. 267-285.

Vaziri A., Keen N.T. y Erwin D.C. 1981. Correlation of medicarpin production with resistance to *Phytophthora megasperma* f. sp. medicaginis in alfalfa seedlings. *Phytopathology*. 71: 1253-1238.

Verpoorte R. y Memelink J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 13(2):181-7.

Wang H., Yu J. y Zhong J. 1999. Significant improvement of taxane production in suspensión culture of *Taxus Chinensis* by sucrose feeding strategy. *Process Biochemistry*. 35(5):479-483.

Wang C., Wu J. y Mei X. 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 55: 404-410.

Widholm J.M., 1972. The Use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Biotechnic y Histochemistry*. 47:189-194.

Yu K.W., Murthy H.N., Jeong C.S., Hahn E.J y Paek. 2005. Organic germanium stimulates the growth of ginseng adventitious roots and ginsenoside production. *Process Biochemistry*. 40(9):2959-2961.

Zacharius R.M. y Kalan E.K. 1990. Isoflavonoid changes in soybean cell suspensions when challenged with intact bacteria or fungal elicitors. *J. Plant Physiol*. 135(6):732-736.

Zhao J., Davis L., y Verpoorte R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23(4): 283–333.

Zhang H. y Memelink J. 2009. Regulation of secondary metabolism by jasmonate hormones. En: Osbourn, A.E.; Lanzotti, V. *Plant-derived Natural Products*. Springer Science + Business Media, LLC. 181-194.

Zhan Y., Zhong J. y Yu J. 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspensión cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *Journal of Biotechnology*. 51(1):49-56.

Zhong J. y Wang S. 1998. Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process Biochemistry*. 33(6): 671-675.

Zhong J. y Yoshida T. 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme and Microbial Technology*. 0229(95):1073-1079.

Zhong J. 2002. Plant cell culture for production of paclitaxel and other taxanes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94(6): 591-599.

Zook M. 1998. Biosynthesis of camalexin from tryptophan pathway intermediates in cell-suspension cultures of *Arabidopsis*. Plant Physiology. 118(4):1389-1393.

Zucker M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in *potato tuber* tissue. Plant Physiol. 40:779-784.