

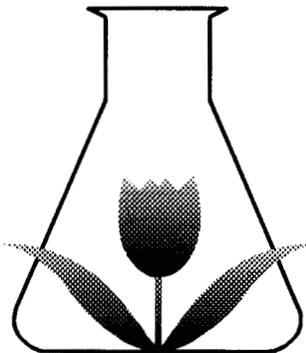


Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN

***Artemisia absinthium* L. (ASTERACEAE)**



T E S I S

que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental
P r e s e n t a
José Angel Lechuga Corchado

26 - 01 - 02 / 1992

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Hongos del Departamento de Biotecnología de la UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA bajo la dirección del Dr. FRANCISCO CRUZ SOSA y con la asesoría del Dr. LEOVIGILDO QUIJANO (Instituto de Química, UNAM) y de la M. en C. MARIA DOLORES GARCIA SUAREZ (Depto. de Biología, UAM Iztapalapa), a quienes expreso mi agradecimiento por su apoyo y valiosa ayuda.

AGRADECIMIENTOS
A los señores...

La Maestría en Biología Experimental contó con el apoyo de CONACyT según el convenio PFPN/66/92 por considerarse con el nivel de excelencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al jurado formado por los doctores Francisco Cruz Sosa y Leovigildo Quijano y la M. en C. María Dolores García Suárez por su sabia dirección y apoyo recibidos en la presente investigación.

A los Drs. L. Quijano y T. Rios su intervención en la realización del presente trabajo y a R. Gaviño por el espectro de 200 MHz de ¹HRMN, todos ellos del Instituto de Química de la UNAM

A mi amigo el Ing. Juan Carlos Peña Avila por su asesoría en el manejo de los programas de cómputo y a la Srita. María del Socorro Vega Vivas de la Coordinación de Servicios de Cómputo de la UAM Iztapalapa por su asesoría en la digitalización de las imágenes fotográficas.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UAM Iztapalapa, Eduardo de Valdemar Osnaya, Salvador Meráz Vázquez, María Felicitas Contreras Hernández, Juan Orozco Villafuerte, José Francisco Miranda Zerecero, Ignacio García Martínez, Arturo Muñoz Flores, y Olga Nava Vega con quienes he compartido muchas horas en fructíferas discusiones.

A mi esposa y mi hija

CONTENIDO

CONTENIDO

Resumen	1
Antecedentes	4
Objetivos	20
Hipótesis	22
Materiales y Métodos	24
Resultados y Discusión	30
Conclusiones	42
Bibliografía	46
Apéndice A	54
Apéndice B	84

**CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN
Artemisia absinthium L. (ASTERACEAE).**

RESUMEN

RESUMEN

Las plantas son una fuente muy importante de compuestos químicos útiles al hombre. En la actualidad un nuevo enfoque para el estudio del metabolismo de la célula vegetal y eventualmente para la producción a gran escala de metabolitos secundarios es el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Artemisia absinthium* L. es un miembro de la familia de las asteráceas, utilizada comunmente para el tratamiento de malestares digestivos y como antifebril, también se le emplea en la fabricación del vermut. Se sabe que esta planta sintetiza dos lactonas sesquiterpénicas de tipo guayanólida conocidas como absintina y anabsintina; se conoce también que en el género *Artemisia* se encuentran especies que sintetizan poliacetilenos en su raíz, los cuales poseen actividad biológica contra otros organismos. El estudio de la síntesis de lactonas sesquiterpénicas por cultivos *in vitro* de algunas especies del género ha sido abordado en años recientes, en el caso de los poliacetilenos se ha realizado para especies del género *Tagetes* por lo que se plantea en este trabajo el establecimiento de cultivos de callo, células en suspensión y raíces transformadas de *A. absinthium* con el fin de contar con un sistema controlado y reproducible que permita en investigaciones posteriores la experimentación en torno a los mecanismos que controlan la síntesis de tales compuestos. La mayor formación y crecimiento de callos a partir de explantes consistentes de cortes de hoja se llevó a cabo en medio MS suplementado con cinetina (4.65 μM) y ANA (1.81 μM) y sacarosa (4.0 %).

ANTECEDENTES

Las plantas son una fuente muy importante de compuestos químicos dentro de los que se incluyen fragancias, saborizantes, pigmentos, edulcorantes, agentes antimicrobianos y fármacos (Tabla 1). A todos estos productos se les ha llamado colectivamente metabolitos secundarios, aunque en muchos casos se desconoce el papel biológico que juegan en el ciclo de vida de las plantas que los producen. Se ha propuesto que muchos metabolitos secundarios son producidos contra depredadores potenciales, para la atracción de los polinizadores o para el combate a las enfermedades infecciosas (Fowler, 1983).

Actualmente la investigación fitoquímica ha dado como resultado el descubrimiento de aproximadamente 1500 nuevas estructuras de metabolitos secundarios al año, muchas de las cuales tienen un alto potencial de aplicación, además, solamente se ha estudiado sistemáticamente la fitoquímica de un 5-15 % del total de especies. Sin embargo todo este potencial para la producción de metabolitos secundarios de las plantas se ve afectado por el impacto de factores medioambientales en la síntesis de tales compuestos, la presencia de enfermedades y plagas capaces de destruir las plantaciones o las poblaciones naturales, las bajas cantidades de producto en la planta, la estacionalidad y por factores relacionados con la colecta, transporte y almacenamiento del material vegetal antes de su procesamiento. Por otro lado, muchas plantas productoras de metabolitos secundarios son silvestres, habiéndose observado en la mayoría de los casos una marcada disminución en la productividad al ser cultivadas por el hombre (Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990). Aunado a lo anterior, muchos de los metabolitos secundarios de las plantas son producidos por especies que habitan en las regiones tropicales, a las cuales se les ha dedicado poca atención para su cultivo o selección (Collin, 1987).

Los logros obtenidos en la biotecnología vegetal (Tabla 2), han permitido proponer la idea de producir metabolitos secundarios con independencia de los factores que afectan su producción en plantaciones establecidas o poblaciones naturales. Actualmente existe una lista sumamente extensa de metabolitos secundarios producidos a través de cultivo de células, tejidos u órganos de una amplia variedad de especies vegetales (Fowler, 1983; Mantell *et al.*, 1985; Nickell, 1980) (Tabla 3).

Tabla 1. Fuentes de productos vegetales de interés económico.

Producto	Géneros
Antihelmínticos	<i>Artemisia</i>
Antimicrobianos	
Antibacterianos	<i>Lithospermum</i>
Antifúngicos	<i>Ruta</i>
Antiprotozoarios	<i>Catharanthus, Cinchona</i>
Antivirales	<i>Argostemma, Phytolaca</i>
Agentes antineoplásicos	<i>Camptotheca, Catharanthus, Maytenus, Podophyllum, Tripterigum</i>
Agentes antiespasmódicos	<i>Valeriana, Matricaria</i>
Enzimas	
Biotransformación	<i>Cannabis, Digitalis, Lupinus, Mentha, Papaver</i>
Proteolíticas	<i>Carica, Scopolia</i>
Saborizantes alimenticios	<i>Asparagus, Cinchona, Capsicum</i>
Hidrocarburos	<i>Asclepias, Euphorbia</i>
Insecticidas	<i>Derris, Lonchocarpus, Pyrethrum</i>
Edulcorantes	<i>Glycorrhiza, Hydrangea, Stevia, Thaumatooccus</i>
Tónicos	<i>Blupeurum, Cinchona, Coptis, Phellodendron, Panax</i>
Vitaminas (biotina, B ₆)	Varios

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

No obstante lo anterior, existen pocos ejemplos con éxito comercial, uno de ellos es la shikonina (Figura 1), una naftaquinona utilizada actualmente como pigmento en cosméticos, producida por cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon*, logrado por la empresa Mitsui Petrochemical Industries de Tokyo (Fujita y Tabata, 1987).

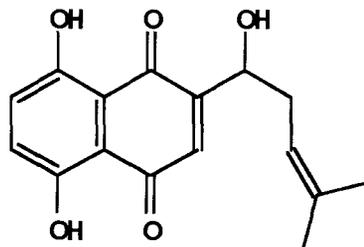


Figura 1. Estructura de la shikonina (Flores et al., 1987).

A pesar del escaso éxito comercial en la producción de metabolitos secundarios, las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han sido una herramienta muy valiosa para la mejor comprensión de la bioquímica, la fisiología y en general de la biología de la célula vegetal (Becker, 1987; Cocking, 1987). En todo el mundo muchos grupos realizan investigaciones desde distintos puntos de vista con el fin de lograr procesos biotecnológicos para la producción de metabolitos secundarios de las plantas. Entre los enfoques empleados para tales investigaciones se encuentran los estudios sobre la composición de los medios nutritivos, sobre las condiciones medioambientales a que se someten los cultivos, los métodos de selección de líneas celulares sobreproductoras, la mutagénesis, la alimentación de las células con precursores metabólicos del producto deseado, la inmovilización celular, la criopreservación, la biotransformación, la fusión de protoplastos, la micropropagación, la inducción o elicitación con extractos fúngicos, el cultivo de brotes, de raíces transformadas, la ingeniería genética y el diseño de biorreactores adecuados para los sistemas vegetales (Constabel, 1990; Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990).

De manera particular las plantas medicinales han sido objeto de muchos estudios en los cuales se han empleado las técnicas de cultivo de tejidos vegetales ya que a partir de éstos se pretende lograr el desarrollo de biotecnologías para la producción de fármacos a nivel industrial, entre las especies que se han estudiado desde este punto de vista se encuentran *Digitalis lanata*, *Catharanthus roseus*, *Coptis japonica*, *Papaver somniferum*, *Solanum dulcamara*, *Ruta graveolens* y *Atropa belladonna* (Carew y Staba, 1965; Constabel, 1990).

Artemisia absinthium L. es una planta usada en la medicina tradicional mexicana principalmente como tónico estomacal, vermífugo y antifebril, también se emplea para la preparación del vermut, comúnmente se le conoce como ajenjo; un reporte preliminar muestra un efecto antimalárico del extracto etanólico de hojas de *A. absinthium* al ser administrado a ratones experimentales (Zafar, *et al.*, 1990). Pertenece a la tribu Anthemideae de la familia de las asteráceas. Es una planta de tallo leñoso y ramas herbáceas, flexibles, intensamente asurcadas o lo largo y muy hojosas. Las hojas tienen un color gris blanquecino en el envés y verde claras en el haz. Las hojas de la parte

inferior del tallo son muy pecioladas y tripinnatisectas, mientras que las de la parte superior son casi sésiles y divididas en lóbulos bastante anchos y obtusos. Las flores están reunidas en capítulos o cabezuelas, que en el momento de la floración miran hacia el suelo. Son tubulosas, amarillentas, femeninas las de la periferia y hermafroditas las del centro, todas ellas entremezcladas de pelos y rodeadas de un involucreo cuyas brácteas son de un color verde blanquecino (Madueño, 1973).

Se han logrado aislar dos lactonas sesquiterpénicas de *A. absinthium* las cuales corresponden al tipo guayanólida (Figura 2), ambos compuestos son estructuras diméricas cuya fórmula condensada es $C_{30}H_{40}O_6$, dichas sustancias se conocen como absintina y anabsintina, (Novotny *et al.*, 1958; 1960).

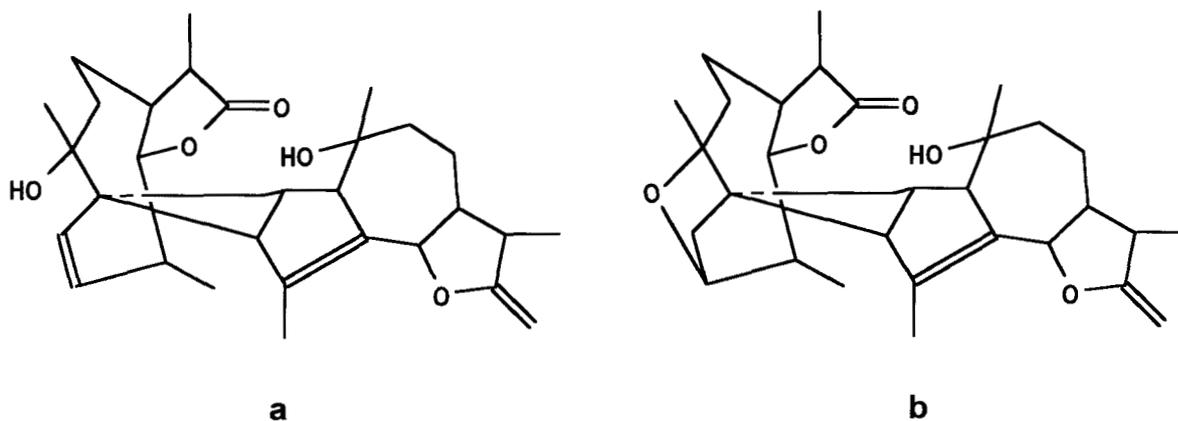


Figura 2. Estructuras de: a) absintina y b) anabsintina (Novotny *et al.*, 1958; 1960).

Dentro de la familia Asteraceae, la cual es una de las familias más grandes de las angiospermas, se ha encontrado una gran diversidad química (Tabla 4.). La mayoría de sus miembros acumulan terpenos, mono-, sesqui-, di- y triterpenos. Entre los sesquiterpenos, las lactonas sesquiterpénicas son también muy comunes en este grupo de plantas, dentro de la tribu Cichorieae se han encontrado especialmente politerpenos. Los poliacetilenos tienen una distribución amplia en la familia excepto en la tribu

Senecioneae donde más bien son raros, mientras que los alcaloides son raros en la familia, en la tribu Senecioneae son muy comunes los alcaloides de la pirrolicidina (Seigler, 1981).

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos de 15 átomos de carbono muchas de las cuales poseen algún efecto biológico, entre ellos se ha puesto en evidencia el efecto alelopático en la germinación de *Lactuca sativa* de 12 de tales compuestos dentro de los que se incluyen moléculas de los tipos eudesmanólida, germacranólida, melampólida y guayanólida (Macías, *et al.*, 1992), el efecto inhibitorio sobre la germinación fue también encontrado para *Daucus carota*, *Setaria faberi*, *Echinochloa crus-galli* y *Digitaria sanguinalis* y, mientras que en *Phaseolus vulgaris* y *P. aureus* provocan la formación de raíces adventicias (Chen y Leather, 1990).

Algunas lactonas sesquiterpénicas muestran actividad antimicrobiana (Akhtar, *et al.*, 1992; Gören, *et al.*, 1990); se ha reportado actividad citoprotectora contra úlcera gástrica para algunas de tales sustancias entre las que se encuentran dihidroleucodina y ludartina (Giordano, *et al.*, 1990). Otros efectos reportados para las lactonas sesquiterpénicas son como analgésico, antipirético y antiinflamatorio (Morán, *et al.*, 1989), por otro lado, existen evidencias acerca de un efecto espermatotóxico en ratones (Qureshi, *et al.*, 1990). Se ha demostrado un efecto antimalárico para artemisinina, aislada de *A. annua* (Klayman, 1985). En cultivos de callo de *Ambrosia tenuifolia* su síntesis es regulada por la presencia de auxinas y citocininas en el medio de cultivo (Goleniowski, *et al.*, 1992).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales se han aplicado a algunas de las especies del género *Artemisia*, principalmente para micropropagación y para el estudio de la síntesis de metabolitos secundarios. Dentro de las técnicas más empleadas se encuentran el cultivo de callos y de células en suspensión, los cuales se ven afectados en su formación y desarrollo posterior básicamente por los reguladores del crecimiento vegetal y los nutrientes presentes en el medio de cultivo, además de las condiciones de incubación (Seabrook, 1980). A continuación se presentan brevemente algunos de estos trabajos.

Tabla 2. Historia de la biotecnología vegetal.

Año	Aportación
1892	Se establece la habilidad de las plantas para sintetizar sustancias formadoras de órganos, que tienen una distribución polar.
1902	Primer intento para cultivar tejidos vegetales.
1904	Primer intento para cultivar embriones de crucíferas.
1909	Fusión de protoplastos vegetales (infructuoso).
1922	Germinación asimbiótica <i>in vitro</i> de orquídeas. Cultivo <i>in vitro</i> de ápices radiculares.
1925	Cultivo de embriones aplicado a cruces interespecíficas de <i>Linum</i> .
1929	Cultivo de embriones de <i>Linum</i> para evitar incompatibilidad en el cruzamiento.
1934	Intentos fallidos para cultivar <i>in vitro</i> tejido cambial de algunos árboles y arbustos (fallaron debido a la carencia de auxina, la cual aún no había sido descubierta). Cultivo exitoso de raíces de <i>Lycopersicon sculentum</i> .
1936	Cultivo exitoso de varias gimnospermas.
1939	Cultivos de callo de crecimiento continuo.
1940	Cultivo <i>in vitro</i> de tejido cambial de <i>Ulmus</i> para el estudio de la formación de brotes adventicios.
1941	Uso de agua de coco para cultivar embriones de <i>Datura</i> . Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos de la agalla de la corona.
1944	Cultivo <i>in vitro</i> de tabaco usado para el estudio de la formación de brotes adventicios.
1945	Cultivo <i>in vitro</i> de ápices del tallo de <i>Asparagus</i> .
1946	Primeras plantas de <i>Lupinus</i> y <i>Trapaepolum</i> obtenidas por cultivo del brote apical.
1948	Formación de brotes y raíces adventicias de <i>Nicotiana tabacum</i> determinada por la relación auxina/adenina.
1950	Regeneración de órganos a partir de callos de <i>Sequoia sempervirens</i> .
1952	Dalias libres de virus obtenidas por cultivo de meristemos. Primera aplicación de los microinjertos.
1953	Callos haploides de <i>Ginko biloba</i> producidos a partir de polen.
1954	Monitoreo de cambios en cariología y comportamiento cromosómico de cultivos de endospermo de <i>Zea mays</i> . Primera planta cultivada a partir de una sola célula.
1955	Descubrimiento de la cinetina.
1956	Crecimiento exitoso de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios.
1957	Regulación de la formación de órganos (raíces y brotes) por el cambio en la relación citocinina/auxina.
1958	Regeneración <i>in vitro</i> de embriones somáticos a partir de la nucela de óvulos de <i>Citrus</i> .
1960	Exito en la fertilización <i>in vitro</i> de <i>Papaver rhoeas</i> . Degradación enzimática de paredes celulares para obtener grandes cantidades de protoplastos. Propagación vegetativa de orquídeas por cultivo de meristemos.

Tabla 2.	Cont.
	Filtración de suspensiones celulares y aislamiento de células individuales por plaqueo.
1962	Desarrollo del medio de Murashige y Skoog.
1964	Plantas haploides de <i>Datura</i> producidas por granos de polen.
1965	Regeneración de raíces y brotes sobre callos de <i>Populus tremuloides</i> .
1965	Inducción de la floración en cultivos <i>in vitro</i> de <i>Nicotiana tabacum</i> .
1967	Diferenciación de plantas a partir de células aisladas en microcultivo.
1967	Inducción floral en <i>Lunaria annua</i> por vernalización <i>in vitro</i> .
1969	Análisis citológico de plantas regeneradas a partir de cultivos de callo de <i>N. tabacum</i> .
1970	Aislamiento de protoplastos a partir de cultivos en suspensión de <i>Haplopappus gracilis</i> .
1970	Selección de mutantes bioquímicos <i>in vitro</i> .
1970	Cultivo de embriones utilizado en la producción de monoplóides en centeno.
1971	Fusión de protoplastos.
1971	Regeneración de plantas a partir de protoplastos.
1972	Hibridación interespecífica a través de fusión de protoplastos entre dos especies de <i>Nicotiana</i> .
1973	Rompimiento de la latencia por citocininas en explantes de capítulo de <i>Gerbera</i> .
1974	Inducción de ramificación axilar por citocininas en brotes apicales aislados de <i>Gerbera</i> .
1974	Plantas haploides de <i>Petunia hybrida</i> regeneradas a partir de protoplastos.
1974	Híbridos obtenidos por fusión de protoplastos haploides.
1974	Establecimiento del plásmido Ti como el agente inductor de tumores por <i>Agrobacterium</i> .
1975	Selección positiva de cultivos de callo de <i>Zea mays</i> resistentes a <i>Helminthosporium maydis</i> .
1976	Iniciación de brotes a partir de ápices criopreservados de <i>Dianthus caryophyllus</i> .
1976	Hibridación vegetal interespecífica por fusión de protoplastos entre <i>Petunia hybrida</i> y <i>P. parodii</i> .
1976	Se establece que la síntesis y degradación de opinas es controlada por el plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
1977	Integración del ADN del plásmido Ti de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
1978	Hibridación somática entre <i>Lycopersicon sculentum</i> y <i>Solanum tuberosum</i> .
1979	Cocultivo para transformación genética de protoplastos vegetales con <i>Agrobacterium</i> .
1980	Inmovilización de células usadas para la biotransformación de digitoxina en digoxina.
1981	Se introduce el término "variación somaclonal".
1981	Aislamiento de células auxótrofas por tamizado a gran escala de colonias celulares derivadas de protoplastos haploides de <i>Nicotiana plumbaginifolia</i> tratados con mutágenos.
1982	Incorporación de ADN en protoplastos, lo que conduce a transformación genética con ADN aislado.

COPIA DE DOCUMENTOS - BIBLIOTECA

Tabla 2.	Cont.
1983	Hibridación citoplásmica intergenérica entra <i>Raphanus sativus</i> y <i>Brassica napus</i> .
1984	Transformación de células vegetales con ADN plasmídico.
1985	Discos de hoja infectados y transformados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y la regeneración subsecuente de plantas transformadas.

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

Tabla 3. Productos naturales en cultivos celulares y plantas completas.

PRODUCTO NATURAL	ESPECIE	PRODUCTIVIDAD	
		CULTIVO CELULAR	PLANTA COMPLETA
Antraquinonas	<i>Morinda citrifolia</i>	900 nmol/g ps	Raíz 110 nmol /g ps
	<i>Cassia tora</i>	0.334 % ps	Semilla 0.209 % ps
Ajmalicina y Serpentina	<i>Catharanthus roseus</i>	1.3 % ps	0.26 % ps
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	26 mg/g ps	Tubérculo 20 mg/g ps
Saponinas	<i>Panax ginseng</i>	0.38 % pf	0.3 - 3.3 % pf
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	3.4 % ps	2.0 - 5.0 % ps

ps: Peso seco; pf: Peso fresco Modificado de Fowler, 1983.

Park *et al.* (1989), utilizan brotes de *A. annua* para desarrollar un proceso de escalamiento en los sistemas de micropropagación de especies herbáceas, ya que el método a nivel de laboratorio es sumamente laborioso y costoso. Este trabajo básicamente fué realizado para conocer el comportamiento del biorreactor donde se mantuvieron los brotes.

Clemente *et al.* (1991), lograron el desarrollo de una técnica de micropropagación para *A. granatensis*, especie endémica de la Provincia de Granada, España, la cual ha sido clasificada como especie amenazada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), la técnica consiste en colocar el brote apical en medio de cultivo MS suplementado con N-(fenilmetil)-1H-purina-6-amina (BA), a una concentración de 0.22

μM para provocar la proliferación de brotes axilares, los cuales posteriormente son individualizados y cultivados en ausencia de BA para inducir la formación de raíces adventicias.

Banthorpe y Brown (1989), han reportado la presencia de dos cumarinas, la escopoletina y la isofraxidina, junto con pequeñas cantidades de estigmasterol y sitosterol en cultivos de callo de *Tanacetum parthenium*, *T. vulgare* y *A. vulgaris*. Ninguno de los cultivos acumuló cantidades detectables de terpenoides y espirocetal-enol-éteres, los cuales son característicos de las plantas parentales, mientras que las dos cumarinas encontradas no se presentan o son componentes menores en las parentales. Este comportamiento persistió bajo diferentes condiciones de cultivo. El fenómeno observado en esta investigación es sumamente interesante y debe ser estudiado con mayor profundidad ya que muestra la posibilidad de encontrar metabolitos distintos a los presentados por la planta *in vivo*.

Tawfiq *et al.* (1989), estudiaron el efecto del medio basal, reguladores del crecimiento y luz sobre el crecimiento y actividad antiplasmodial de cultivos de callo de *A. annua*. La actividad antiplasmodial de esta planta se debe a la presencia de artemisinina. Los callos fueron cultivados en los medios MS, LS, B5 y SH, de los callos cultivados en medio LS obtuvieron dos extractos, hexánico y clorofórmico, los cuales provocaron la inhibición del crecimiento de *Plasmodium falciparum* al ser incluidos en el medio de cultivo del protozoario. Los experimentos sobre el efecto de la luz se hicieron solo con callos en medio MS sin encontrarse ningún efecto significativo en relación al crecimiento de *P. falciparum*, mientras que la presencia de ácido indolacético en el medio MS incrementó la actividad antiplasmodial hasta el mismo nivel alcanzado en medio LS. La actividad contra *P. falciparum* fué medida mediante la inhibición de la entrada de hipoxantina tritiada al protozoario. Al examinar por cromatografía en capa fina los extractos orgánicos no detectaron la presencia de artemisinina, en cambio detectaron la presencia de estigmasterol y escopoletina, a pesar de lo cual los extractos mostraron una actividad muy alta ($DL_{50}=5.0 \mu\text{g/mL}$).

Pestchanker *et al.* (1989; 1990), lograron aislar dihidroleucodina (DHL) de cultivos de callo de *A. douglasiana*. DHL es una lactona sesquiterpénica la cual muestra una

actividad citoprotectora contra la úlcera péptica inducida químicamente en ratas. En su primer trabajo encontraron el mayor contenido de DHL (0.55 ± 0.044 mg/g de peso seco), en callos originados sobre cotiledón en presencia de 2,4,5-T (4.0 mg/l). En su segundo reporte analizaron la presencia de DHL en diferentes partes de la planta encontrando la mayor productividad en hojas frescas (25.0 mg/g de peso seco). En cultivos de callo originados a partir de las diferentes porciones de la plántula y de la planta adulta encontraron la mayor producción de DHL en los callos originados en hojas de ambas procedencias, aunque fueron menores a lo encontrado directamente en las hojas (>80-90 %), en este aspecto, es necesario realizar investigaciones tendientes a mejorar la producción de DHL en los cultivos de callo, principalmente en relación a la composición del medio de cultivo y a la diferenciación celular.

Ya se ha mencionado que en la familia de las asteráceas son muy frecuentes los compuestos de tipo poliacetilénico, la mayoría de estos compuestos se encuentra en la raíz. Se han encontrado poliacetilenos lineales, aromáticos y heterocíclicos, incluyendo tiofenos derivados de precursores poliacetilénicos lineales. Tales compuestos son extremadamente raros en otras familias. Algunos de estos compuestos son tóxicos contra otros organismos como bacterias, hongos, nemátodos e incluso insectos, en particular los tiofenos poseen un potente efecto nematicida y fungicida. Otra clase de poliacetilenos azufrados son las tiarubrininas que poseen actividad antifúngica, nematicida y antiviral (Sings y Flores, 1990). Los compuestos poliacetilénicos de las asteráceas han sido propuestos como pesticidas de origen natural. Por otro lado, el poliacetileno seselidiol aislado de raíces de *Seseli mairei* (Umbelliferae), ha mostrado actividad moderada contra las líneas tumorales KB, P-388 y L-1210 (Hu *et al.*, 1990).

La producción de metabolitos secundarios por cultivos de raíces normales se ha podido realizar, pero se requiere de la presencia de reguladores del crecimiento en el cultivo (Anderson *et al.*, 1982). Los cultivos de raíces transformadas se han considerado como alternativa para el estudio del metabolismo de la raíz y para el establecimiento de sistemas altamente productivos de metabolitos secundarios ya que pueden manifestar el mismo espectro metabólico que las raíces no transformadas (Sings y Flores, 1990).

Tabla 4. Productos naturales reportados en especies del género *Artemisia*.

COMPUESTOS	ESPECIE	REFERENCIA
Lactonas sesquiterpénicas	<i>A. absinthium</i>	Novotny <i>et al.</i> , 1958; 1960
	<i>A. herba-alba</i>	Marco, 1989; Sanz, <i>et al.</i> , 1990a; Sanz, <i>et al.</i> , 1990b
	<i>A. judaica</i>	Khafagy, <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. afra</i>	Jakupovic, <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. arborescens</i>	Grandolini, <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. assoana</i>	Marco, <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. diffusa</i>	Rustaiyan, <i>et al.</i> , 1989
	<i>A. montana</i>	Nagaki y Matsueda, 1989
	<i>A. hispanica</i>	Sanz, <i>et al.</i> , 1989
	<i>A. annua</i>	El-Sohly, <i>et al.</i> , 1990; El-Ferally, <i>et al.</i> , 1990; Charles, <i>et al.</i> , 1990; Akhila, <i>et al.</i> , 1990
	<i>A. oliveriana</i>	Sanz, <i>et al.</i> , 1990c
	<i>A. caerulea</i>	Sanz y Marco, 1990
	<i>A. douglasiana</i>	Rodríguez, <i>et al.</i> , 1990
	<i>A. xerophytica</i>	Tan, <i>et al.</i> , 1991
	<i>A. rutifolia</i>	Tan y Jia, 1992
Cetonas sesquiterpénicas	<i>A. pallens</i>	Catalán, <i>et al.</i> , 1990
Furanoterpenoides	<i>A. pallens</i>	Misra, <i>et al.</i> , 1991
Cumarinas	<i>A. abrotanum</i>	Merikli <i>et al.</i> , 1988; Abdel-Mogib <i>et al.</i> , 1990
Diterpenos	<i>A. sacrorum</i>	Li, <i>et al.</i> , 1990
Fenilpropanoides	<i>A. assoana</i>	Sanz y Marco, 1990
Flavonas y Flavonoides	<i>A. lanata</i>	Horie, <i>et al.</i> , 1989
	<i>A. hispanica</i>	Marco, <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. campestris</i>	Rauter, <i>et al.</i> , 1989
Acetilenos y Poliacetilenos	<i>A. monosperma</i>	Abdel-Mogib, <i>et al.</i> , 1990
	<i>A. borealis</i>	Wang, <i>et al.</i> , 1990
Aceites esenciales	<i>A. vulgaris</i>	Wallnöfer, <i>et al.</i> , 1989
	<i>A. absinthium</i>	Kennedy <i>et al.</i> , 1993
	<i>A. herba-alba</i>	Feuerstein <i>et al.</i> , 1988

Agrobacterium tumefaciens y *Agrobacterium rhizogenes* son bacterias del suelo que tienen efectos morfogénicos sobre una amplia variedad de dicotiledóneas no así de monocotiledóneas, lo que se ha tratado de explicar en términos de la respuesta a las heridas que manifiestan las plantas es decir, la capacidad para formar rápidamente una cicatriz en el sitio de la herida, de tal manera que plantas con una buena respuesta a las

heridas son generalmente susceptibles de ser infectadas por la *Agrobacterium* (Potrykus, 1991). La infección de una planta a través de una herida por *A. tumefaciens* resulta en la producción de un tumor, mientras que la infección por *A. rhizogenes* induce la formación de raíces adventicias en el sitio donde ocurre la infección (Tepfer, 1984). Se ha demostrado que el plásmido Ri (root-inducing) presente en *A. rhizogenes* transforma las células vegetales por la integración estable de su T-DNA (Transfer-DNA) dentro del genoma de la célula vegetal, los genes codificados por el T-DNA regulan el balance endógeno de reguladores del crecimiento, así las células vegetales transformadas se multiplican dando origen a las llamadas raíces peludas (hairy roots) o raíces transformadas, las cuales pueden ser cultivadas y propagadas por tiempo indefinido en un medio de cultivo libre de auxinas y citocininas (Chilton *et al.*, 1982; White *et al.*, 1982). Además de su independencia de los reguladores del crecimiento vegetal y de su capacidad para sintetizar compuestos secundarios (Tabla 5), las raíces transformadas presentan otras características sobresalientes entre las que destacan su rápido crecimiento y su completo estado de diferenciación, lo cual contribuye a garantizar la síntesis de los productos propios de la raíz (Constabel, 1990). El estado transformado de tales órganos puede ser detectado mediante el análisis de opinas, ya que en el T-DNA se encuentra también la información para el metabolismo de tales compuestos y por medio de pruebas de hibridación molecular entre el genoma del plásmido y el genoma de las células presumiblemente transformadas (Hunter y Neill, 1990).

Hasta la fecha se han podido establecer cultivos de raíces transformadas en un amplio número de especies pertenecientes a los géneros *Nicotiana*, *Datura*, y *Solanum* entre otros (Hamill *et al.*, 1987; Mugnier, 1988). Tales cultivos también han probado ser muy útiles para el estudio de los parásitos obligados de la raíz o simbioses que no pueden crecer en aislamiento y para investigaciones sobre las interacciones raíz-microorganismo (Tepfer y Casse-Delbart, 1987).

En la familia Asteraceae se han obtenido cultivos de raíces transformadas productoras de poliacetilenos en especies de los géneros *Ambrosia*, *Bidens*, *Carthamus*, *Rudbeckia* y *Tagetes* (Flores *et al.*, 1988), de los cuales los más estudiados han sido los del género *Tagetes*.

A partir de cultivos de raíces transformadas de *Tagetes patula* se han obtenido el benzofurano isoeuparina(5-acetil-4-hidroxi)-2-isopropenilbenzofurano y los tiofenos 5-(4-acetoxi-1-butenil)-2,2'-bitiofeno (BBTOAc), 5-(buten-1-enil)-2,2'bitiofeno (BBT) (Parodi *et al.*, 1988) y α -tertienilo (α -T) (Kyo *et al.*, 1990). En raíces transformadas de *Tagetes erecta* se han encontrado BBTOAc, BBT, α -T y 5-(4-hidroxi-butenil)-2,2'-bitiofeno (BBTOH) (Mukundan y Hjortso, 1990a). El efecto de elicitores fúngicos se ha estudiado en cultivos de raíces transformadas de *T. patula* encontrándose un aumento significativo en la producción de tiofenos (Mukundan y Hjortso, 1990b). Además se empieza a estudiar el proceso de escalamiento en biorreactores (Buitelaar *et al.*, 1991).

Como en las dos especies anteriores, en el género *Artemisia* también se han encontrado poliacetilenos los cuales han mostrado actividad antifúngica y toxicidad contra larvas de *Artemia salina* y *Aedes aegypti* (Wallnöfer *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1990).

Con el presente trabajo se pretende definir las condiciones para el establecimiento de sistemas de cultivo *in vitro* de *A. absinthium* como modelo experimental para el estudio de sus metabolitos secundarios y para la propagación de la planta.

Tabla 5. Propiedades de las raíces transformadas y cultivos de células en suspensión.

Propiedades	Raíces transformadas	Células en suspensión
Bioquímicas		
Tiempo de duplicación	2-7 días	0.7-14 días
Requerimientos nutritivos	Simple: no requieren vitaminas ni reguladores del crecimiento vegetal	Complejos: requieren vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal específicos
Estabilidad genética	Estables: euploides, homogéneos	Inestables: poli y aneuploides, rearrreglos intracromosómicos, heterogéneos
Producción de metabolitos	Nivel y espectro característicos de la planta parental	Impredecible, a menudo baja
Liberación de productos	Liberación de algunos	Liberación de algunos
Bioingeniería		
Máxima densidad de biomasa	~30 g ps L ⁻¹	~20 g ps L ⁻¹
Estabilidad a altas densidades	Fácilmente mantenida	La necesidad de oxígeno dificulta lograr la estabilidad
Tamaño de inóculo	Independiente, fase lag mínima	Dependiente de la talla
Manejo de biomasa	Dificultades para bombear, partículas grandes	Bombeable, partículas pequeñas
Sensibilidad a la fuerza de corte	Cultivos sensibles	Sensibles, se pueden seleccionar líneas resistentes
Reología	Fase líquida newtoniana	No newtoniano
Operación continua	Fácil, las células se autoinmovilizan	Se requiere un soporte, problemas de mezclado

Modificado de Atkinson y Mavituna, 1991

.....

OBJETIVOS

GENERAL

- Diseñar una metodología para el cultivo *in vitro* de *A. absinthium* que permita contar con un sistema modelo para el estudio de la fisiología y bioquímica vegetal.

222477

PARTICULARES

- Determinar la influencia del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), cinetina, bencilaminopurina (BAP) e isopenteniladenina (2iP), en la inducción y crecimiento de callos a partir de fragmentos de hoja de *A. absinthium*.
- Determinar la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento de callos de *A. absinthium*.
- Establecer cultivos de células en suspensión a partir de cultivos de callo de *A. absinthium*.
- Establecer cultivos de raíces transformadas de *A. absinthium* por medio de la infección con *Agrobacterium rhizogenes*.
- Estimar la capacidad de los cultivos de callo, células en suspensión y de raíces transformadas de *A. absinthium* para la síntesis de metabolitos secundarios.
- Determinar el efecto organogénico del ácido naftalenacético y bencilaminopurina en yemas axilares de *A. absinthium*.

HIPOTESIS

- Las auxinas y citocininas aplicados de manera exógena controlan el proceso de dediferenciación celular en *A. absinthium*.
- Existe una concentración óptima de 2,4-D y cinetina para la inducción de callos en fragmentos de hoja de *A. absinthium*.
- El tipo y concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo determinan las características de crecimiento de cultivos de callo de *A. absinthium*.
- La formación de callos de consistencia friable, aptos para el establecimiento de cultivos de células en suspensión, es influida por la presencia y concentración de 2,4-D, cinetina y sacarosa en el medio de cultivo.
- *A. absinthium* es una planta hospedero de *Agrobacterium rhizogenes*, por lo tanto, la infección de fragmentos de hoja de *A. absinthium* por la bacteria conducirá a la formación de raíces transformadas debido a la inserción del T-DNA del plásmido Ri en el genoma de la célula vegetal.
- Los cultivos de callo, células en suspensión y raíces transformadas de *A. absinthium* manifestarán la capacidad para sintetizar metabolitos secundarios.
- La emergencia de yemas axilares aisladas de *A. absinthium* se debe al rompimiento de la dominancia apical por la aplicación exógena de BAP.

MATERIALES Y METODOS

En todos los experimentos se empleó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), el cual consta de las sales MS, vitaminas MS, sacarosa (3.0 %) y agar (0.8 %); para los experimentos sobre inducción de callo se modificó en su composición de reguladores del crecimiento vegetal de acuerdo a la tabla 6 (Botta *et al.*, 1989). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.8 antes de ser esterilizado en autoclave (AESA Mod. CV 300, México) a 121 °C durante 15 minutos. Todos los reactivos utilizados fueron grado reactivo analítico (Sigma Chemical Company, St. Louis Missouri, USA).

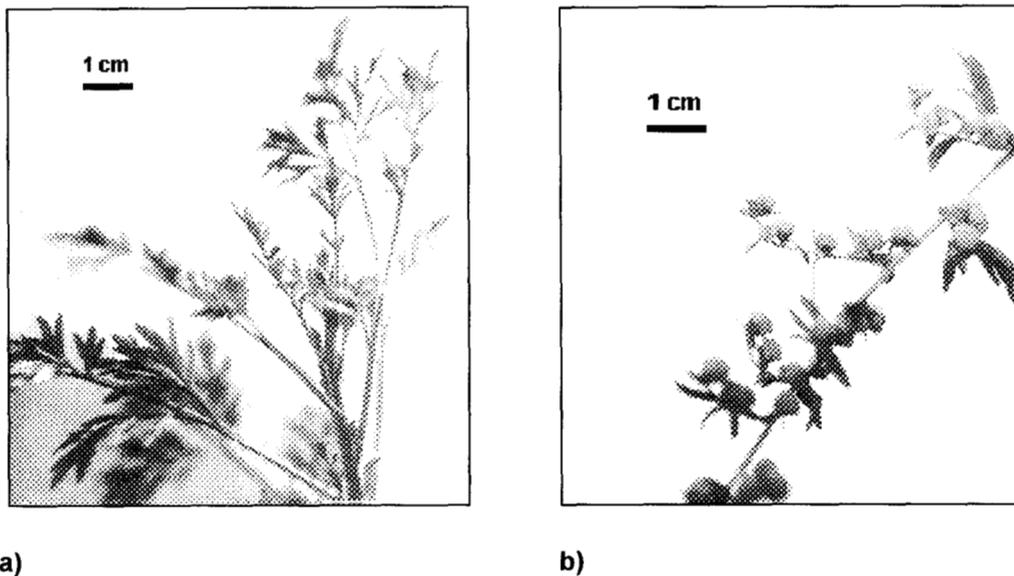


Figura 3. a) Apice vegetativo de *A. absinthium*. b) Cabezuelas de *A. absinthium*.

Los explantes fueron fragmentos de hoja (ca. 1.0 cm²), con un peso fresco promedio de 0.4384 g y peso seco promedio de 0.01058 g, los cuales fueron tomados de plantas de *A. absinthium* cultivadas en invernadero (Figura 3a y 3b), desinfectados superficialmente sumergiéndolos en etanol al 70 % y posteriormente en una solución de cloro comercial (10.0 %), conteniendo 0.6 % de hipoclorito de sodio y dos gotas de Tween-20 durante 10 minutos, lavándose posteriormente en cuatro ocasiones con agua destilada esterilizada para eliminar el desinfectante (Seabrook, 1980). El manejo del material vegetal se realizó bajo condiciones asépticas bajo campana de flujo laminar horizontal (VECO, GHFL-A09,

CIVAC, Morelos, México). Se incubaron a 25 °C y bajo oscuridad constante en una incubadora FELISA.

Los cultivos se evaluaron a los 40 días en su porcentaje de respuesta (formación de callo) a cada tratamiento. El crecimiento de los cultivos de callo se evaluó midiendo los pesos fresco y seco al final del periodo de cultivo (40 días), así como por el incremento total en el crecimiento celular, esto es, como la relación entre el peso fresco o seco de las células del explante al final del periodo de incubación (p_n) y el peso fresco o seco del explante al inicio del experimento (p_0) (Botta *et al.*, 1989). Los pesos se tomaron en una balanza analítica (OHAUS Analytical Plus).

Se estudió el efecto de otras fuentes de carbono (glucosa y fructosa), así como el efecto de ANA, BAP y 2iP, realizándose las evaluaciones antes mencionadas

Tabla 6. Combinaciones de 2,4-D y cinetina.

2,4-D (μM)	CINETINA (μM)		
	0.0	0.46	4.65
1.81	MS-1	MS-2	MS-3
18.1	MS-4	MS-5	MS-6
36.2	MS-7	MS-8	MS-9

Se incluye un tratamiento adicional denominado MS-0:
Medio MS carente de reguladores del crecimiento.

Tabla 7. Combinaciones de ANA y BAP.

ANA (μM)	BAP (μM)		
	5.0	10.0	15.0
0.0	A	B	C
1.0	D	E	F
10.0	G	H	I

Se incluye un tratamiento adicional denominado Z:
(Medio MS carente de reguladores del crecimiento).

Se inocularon callos obtenidos en medio MS-3 y fragmentos de hoja de *A. absinthium* con *Agrobacterium rhizogenes* 15834 la cual fue donada por el Dr. Héctor Flores (Biotechnology Institute, Pennsylvania State University), los cultivos de *A. rhizogenes* utilizados fueron mantenidos en medio YEB (Ishimaru *et al.*, 1990), tanto en suspensión como en medio sólido, antes de proceder a realizar la infección de los explantes los cultivos bacterianos fueron transferidos a medio fresco y cultivados en oscuridad durante 12 horas a una temperatura de 25 °C. La cepa utilizada ha sido efectiva para infectar algunas asteráceas (Flores *et al.*, 1988). Como testigo se inocularon discos de zanahoria (*Daucus carota*) con la misma cepa de la bacteria. Los segmentos de hoja y discos de zanahoria infectados con *A. rhizogenes* fueron desinfectados superficialmente mediante el procedimiento descrito anteriormente, todos los cultivos infectados por la bacteria fueron incubados en oscuridad y a una temperatura de 25 °C, el medio de cultivo utilizado fue el MS carente de reguladores del crecimiento. Como testigo negativo se cultivaron discos de zanahoria no infectados por *A. rhizogenes*. Después de dos semanas fueron examinados visualmente para detectar la presencia de raíces transformadas.

Se corrió en $^1\text{HRMN}$ una muestra de cristales blancos y con forma de aguja aislados previamente de callos cultivados en medio MS-3 (Muñoz, 1993). El espectro de los cristales fue corrido en solución de cloroformo deuterado (CDCl_3) usando tetrametilsilano (TMS) como señal interna en un espectrómetro Varian Gemini-200 (Varian, Palo Alto, Ca., EUA).

Yemas axilares de plantas cultivadas en invernadero fueron desinfectadas por el procedimiento descrito para los fragmentos de hoja. Se colocaron en medio MS modificado en su composición de reguladores del crecimiento vegetal de acuerdo a la tabla 7. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones constantes de luz proveniente de lámparas de luz fluorescente (40 W) con una intensidad luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Los resultados obtenidos de los experimentos sobre formación de callo y su crecimiento posterior fueron sometidos a un análisis de varianza para un diseño completamente

aleatorizado y para la comparación de medias de cada tratamiento se realizó la prueba de Duncan con $\alpha = 0.05$ (Vera Estrella, 1987).

Equipo de Cómputo

Hardware: La información fue procesada en una microcomputadora Hewlett Packard Vectra VL2 4/50. Se usó una impresora Hewlett Packard LaserJet 4L. Las imágenes fueron digitalizadas en un Scanner Hewlett Packard ScanJet IICx.

Software: Se usaron los siguientes programas de ambiente Windows.

Windows 2.0

Word 6.0

Harvard Graphics 2.0

Excell 4.0

Corel Photo-Paint! 4.0

ChemWin 1.36

RESULTADOS Y DISCUSION



EFFECTO DE 2,4-D Y CINETINA.

Los porcentajes de formación de callos en explantes de hoja se muestran en la Figura 4a. Se observan claros efectos del 2,4-D y la cinetina, en los tratamientos MS-2 y MS-3 donde se obtiene un 100.0 % de inducción; para el medio MS-0 también se encontró un 100.0 % de respuesta; los restantes tratamientos provocaron porcentajes de inducción variables en un intervalo de 0.0 a 90.0 %. Los resultados muestran que la formación de callos en explantes de hoja es la expresión de los efectos regulatorios de la auxina y la citocinina sobre la división en las células de la hoja, aunque también es probable la existencia de diferencias en la susceptibilidad de cada uno de los explantes al mismo estímulo exógeno.

222477

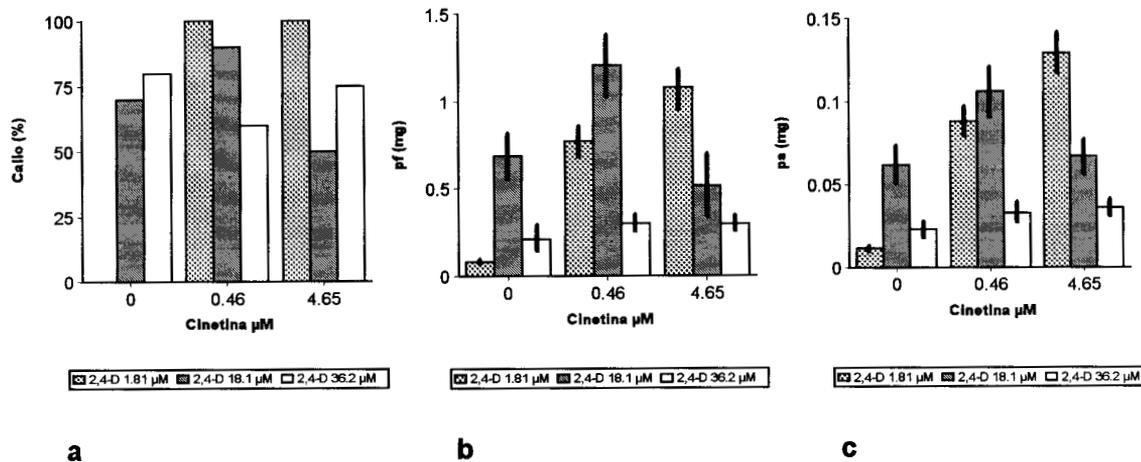


Figura 4. Efectos de 2,4-D y cinetina en cultivos *in vitro* de *A. absinthium* medidos a los 40 días de incubación (GL = 9; $\alpha = 0.05$; n = 30): a) Formación de callo; b) Peso fresco; c) Peso seco.

Las concentraciones de 2,4-D y cinetina participan en la regulación de la división celular, lo cual se pone de manifiesto al observar la tabla 8, donde se exponen los resultados concernientes al crecimiento de los cultivos de callo, se observan diferencias notables en la relación pf/pf_0 y ps/ps_0 en relación a las diferencias en la concentración de los reguladores. Para el peso fresco el mayor crecimiento se encontró en los cultivos que crecieron en medio MS-5, donde el 90.0 % de los explantes pudo formar un callo, sin embargo una evaluación más precisa sobre el crecimiento lo es el peso seco, ya que se ha eliminado la totalidad del agua que contribuye al peso fresco del tejido, en este

sentido, al medir el peso seco se encontró que el medio MS-3 favoreció un mayor crecimiento de los cultivos, además en este medio se obtuvo un 100.0 % de formación de callo. Aunque el análisis de varianza no demostró diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los tratamientos MS-3 y MS-5 (Figuras 4b y 4c), para experimentos posteriores se eligió el medio MS-3 por su efecto sobre la formación del callo (figuras 7a y 7b). Los pesos fresco y seco de los cultivos MS-0 fueron 0.3647 ± 0.033 y 0.031 ± 0.003 respectivamente (ambos resultados se reportan en gramos), lo que muestra que la concentración endógena de reguladores del crecimiento vegetal es suficiente para promover la división celular *in vitro*, pero es necesario un aporte exógeno de tales sustancias para lograr un crecimiento acelerado de los tejidos formados.

EFFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO.

El medio MS-3 se eligió para posteriores experimentos relacionados con la fuente de carbono. En las figuras 5a, 5b y 5c y la tabla 9 se muestran los resultados encontrados. Es importante destacar que en cuanto a la inducción de callos el medio de cultivo en el que se sustituyó la sacarosa por glucosa favorece en un 100.0 % la formación de callos, efecto que se vé notablemente disminuído en el medio donde se sustituyó la sacarosa por fructosa. No obstante que los medios de cultivo suplementados con glucosa permitieron un 100.0 % de formación de callos, el crecimiento de estos se encontró en todos los casos por abajo de lo encontrado para el medio MS-3. El crecimiento de los callos cultivados en presencia de fructosa fue siempre inferior a lo encontrado para el medio MS-3. Con respecto a la sacarosa, al encontrarse en concentración de 4.0 % promueve un mayor crecimiento que el observado a 3.0 %, es decir, el resultado encontrado para este tratamiento particular supera a lo encontrado al cultivar los callos en medio MS-3.

EFFECTO DEL TIPO DE AUXINA Y CITOCININA

La formación de callo promovida por 2,4-D, ANA, cinetina, BAP y 2iP se vió igualmente favorecida no importando el tipo de regulador de crecimiento utilizado en cada cultivo

(Figura 6a). Las figuras 6b y 6c muestran los resultados sobre el crecimiento tanto en peso fresco como peso seco de los callos. La citocinina que tuvo un menor efecto sobre el crecimiento fué isopenteniladenina en combinación con ácido naftalenacético. Las relaciones pf/pf_0 y ps/ps_0 se muestran en la tabla 10.

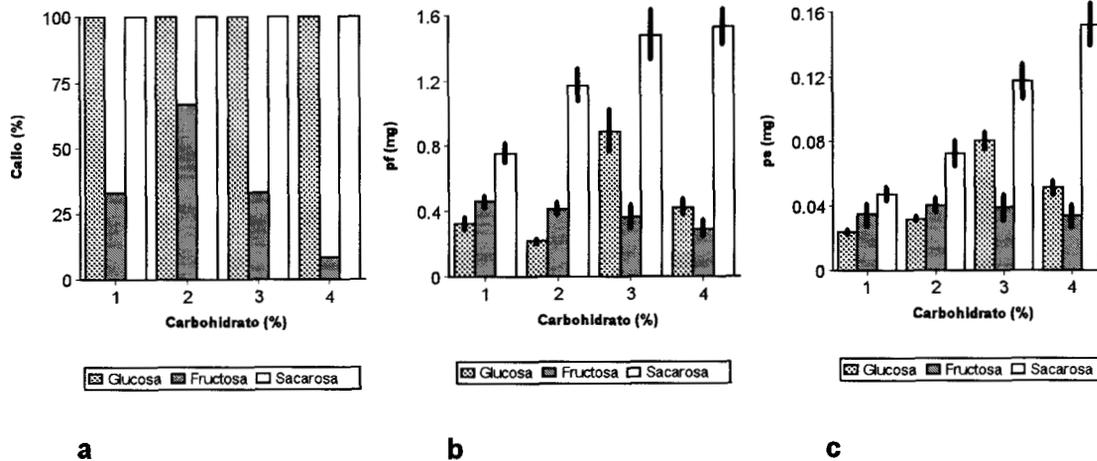


Figura 5. Efectos de glucosa, fructosa y sacarosa en cultivos *in vitro* de *A. absinthium* medidos a los 40 días de incubación (GL = 11; $\alpha = 0.05$; n = 30): a) Formación de callo; b) Peso fresco; c) Peso seco.,

Probablemente el crecimiento de los cultivos de callo se encuentre relacionado con la estructura del regulador del crecimiento vegetal incluido en el medio de cultivo, lo mismo podría decirse de fructosa en relación a la formación de callo, en el sentido de que las respuestas observadas estarían relacionadas con la presencia de receptores en la célula que reconocerían estructuras o porciones específicas de las moléculas lo que les permitiría desencadenar la serie de eventos intracelulares involucrados en la división celular provocada por factores exógenos.

RAICES TRANSFORMADAS.

Los experimentos realizados para la obtención de raíces transformadas resultaron negativos, es decir, tanto los callos como los fragmentos de hoja no fueron susceptibles a la infección por *A. rhizogenes* 15834, mientras que la infección de discos de raíz de zanahoria realizada como testigo resultó positivo, es decir, sí ocurrió la formación de

raíces transformadas después de 2 semanas de incubación (figuras 7c y 7d), esto nos muestra que la cepa de *A. rhizogenes* utilizada es capaz de realizar la transformación genética de discos de zanahoria. Cultivos de discos de zanahoria mantenidos en medio MS carente de reguladores del crecimiento vegetal no desarrollaron raíces transformadas en ausencia de la bacteria. Los resultados sugieren que *A. absinthium* no es susceptible de ser infectada por *A. rhizogenes* 15834.

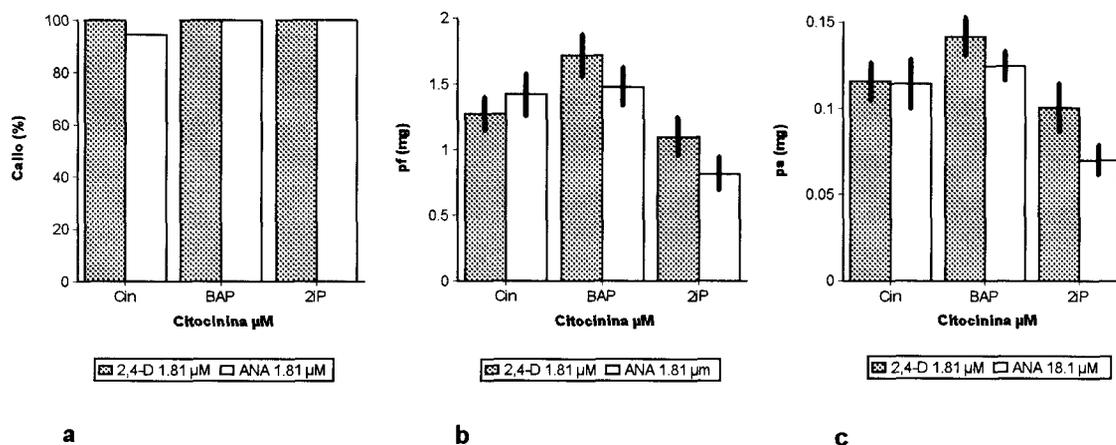


Figura 6. Efectos de 2,4-D, ANA, cinetina, BAP y 2iP en cultivos *in vitro* de *A. absinthium* medidos a los 40 días de incubación (GL = 5; $\alpha = 0.05$; n = 30): a) Formación de callo. b) Peso fresco y c) Peso seco.

Tabla 8. Crecimiento de callos por efecto de 2,4-D y cinetina.

Tratamiento	pf/pf ₀	ps/ps ₀
MS-0	8.32	2.93
MS-1	1.85	1.09
MS-2	17.65	8.32
MS-3	24.56	12.19
MS-4	15.67	5.86
MS-5	27.49	10.02
MS-6	11.77	6.33
MS-7	4.86	2.17
MS-8	6.82	3.12
MS-9	6.73	3.40

No obstante, Kennedy *et al.* (1993), han reportado el aislamiento de aceites esenciales de raíces normales y transformadas de *A. absinthium*, resulta entonces que *A. absinthium* es una planta hospedero de *A. rhizogenes*. Los resultados obtenidos nos conducen a plantear la pregunta ¿porqué en el presente trabajo el resultado fué negativo? La investigación citada anteriormente reporta el uso de la cepa LBA 9402 de *A. rhizogenes*, probablemente exista una fuerte especificidad entre las diferentes cepas de la bacteria por su hospedero lo cual estaría relacionado con señales moleculares específicas entre los componentes de las superficies celulares de ambos organismos. Se ha encontrado que *A. tumefaciens* es atraída hacia las células vegetales cuando éstas secretan compuestos fenólicos como consecuencia de haber sufrido daños mecánicos en sus tejidos (Gelvin, 1992), probablemente *A. rhizogenes* 15834 carece de los receptores que le permiten reconocer los compuestos formados por las células de *A. absinthium* de tal forma que en las superficies celulares de ambos organismos no ocurren interacciones que permitan a la bacteria infectar el tejido vegetal. Por otro lado, se ha observado que en un mismo tejido sólo algunas células son responsivas a la infección por *Agrobacterium* (Fitch *et al.*, 1993).

CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.

Se ha logrado establecer recientemente algunos cultivos en suspensión derivados de cultivos de callo mantenidos en medio MS-3 al colocarlos en el mismo medio carente de agar y sometido a agitación. Estos cultivos serán evaluados en un trabajo posterior ya que se han obtenido en una frecuencia sumamente baja y por lo tanto en una muy baja cantidad, actualmente se encuentran en una fase de propagación. Al realizar observaciones microscópicas se ha observado que las células se encuentran formando pequeños agregados celulares, observándose escasas células aisladas.

POTENCIAL BIOSINTETICO DE LOS CULTIVOS DE CALLO.

Los datos de resonancia magnética nuclear de los cristales obtenidos por Muñoz (1993), de cultivos de callo cultivados en medio MS-3 (Figura 8), mostraron un espectro característico de esteroides, particularmente se trata de una mezcla de sitosterol y estigmasterol, los cuales se han reportado previamente en cultivos *in vitro* de *Tanacetum parthenium*, *T. vulgare*, *Artemisia vulgaris* (Banthorpe y Brown, 1989) y *A. annua* (Tawfiq *et al.*, 1989). Estas sustancias se consideran conspicuas en las células vegetales (Quijano, *com. per.*, 1993).

Tabla 9. Crecimiento de callos por efecto de glucosa, fructosa y sacarosa, en medio MS-3.

Carbohidrato	pf/pf ₀	ps/ps ₀
Glucosa		
1.0 %	7.45	2.24
2.0 %	4.94	3.03
3.0 %	20.31	7.63
4.0 %	4.82	9.63
Fructosa		
1.0 %	10.61	3.30
2.0 %	9.54	3.82
3.0 %	8.38	3.69
4.0 %	6.68	3.18
Sacarosa		
1.0 %	17.19	4.45
2.0 %	26.69	6.83
3.0 %	33.68	11.09
4.0 %	34.84	14.36

EFEECTO MORFOGENICO DE ANA Y BAP.

Se midió el número de yemas axilares para cada tratamiento (Figuras 7e y 7f), encontrándose los porcentajes de respuesta que se muestran en la tabla 11.

Los resultados muestran que BAP en ausencia de ANA promueve los mayores porcentajes de respuesta, al ser combinados ambos compuestos se muestran disminuciones mayores al 10.0 %. Debe existir entonces un control sobre la emergencia de las yemas axilares basado en el balance de concentraciones de auxina/citocinina. Skoog y Miller (1957) han postulado que el mecanismo regulador básico de los eventos organogénicos en cultivo de tejidos vegetales es precisamente el balance auxina/citocinina, de tal manera que la formación de raíces ocurre con un decremento en la concentración de citocinina, mientras que su aumento en relación a la concentración de auxina induce la formación de brotes.

Tabla 10. Crecimiento de callos por efecto de diferentes auxinas y citocininas en medio MS-3.

Auxina 1.81 μ M	Citocinina 4.65 μ M	pf/pf ₀	ps/ps ₀
2,4-D	Cinetina	29.03	10.95
ANA	Cinetina	32.35	10.79
2,4-D	BAP	39.14	13.37
ANA	BAP	33.63	12.70
2,4-D	2iP	24.98	9.48
ANA	2iP	18.54	6.60

Tabla 11. Efecto de ANA y BAP sobre la emergencia de yemas axilares de *A. absinthium*. Los resultados representan porcentajes.

ANA (μM)	BAP (μM)		
	5.0	10.0	15.0
0.0	77.80	92.00	91.42
1.0	73.07	80.00	70.00
10.0	71.42	76.00	45.50

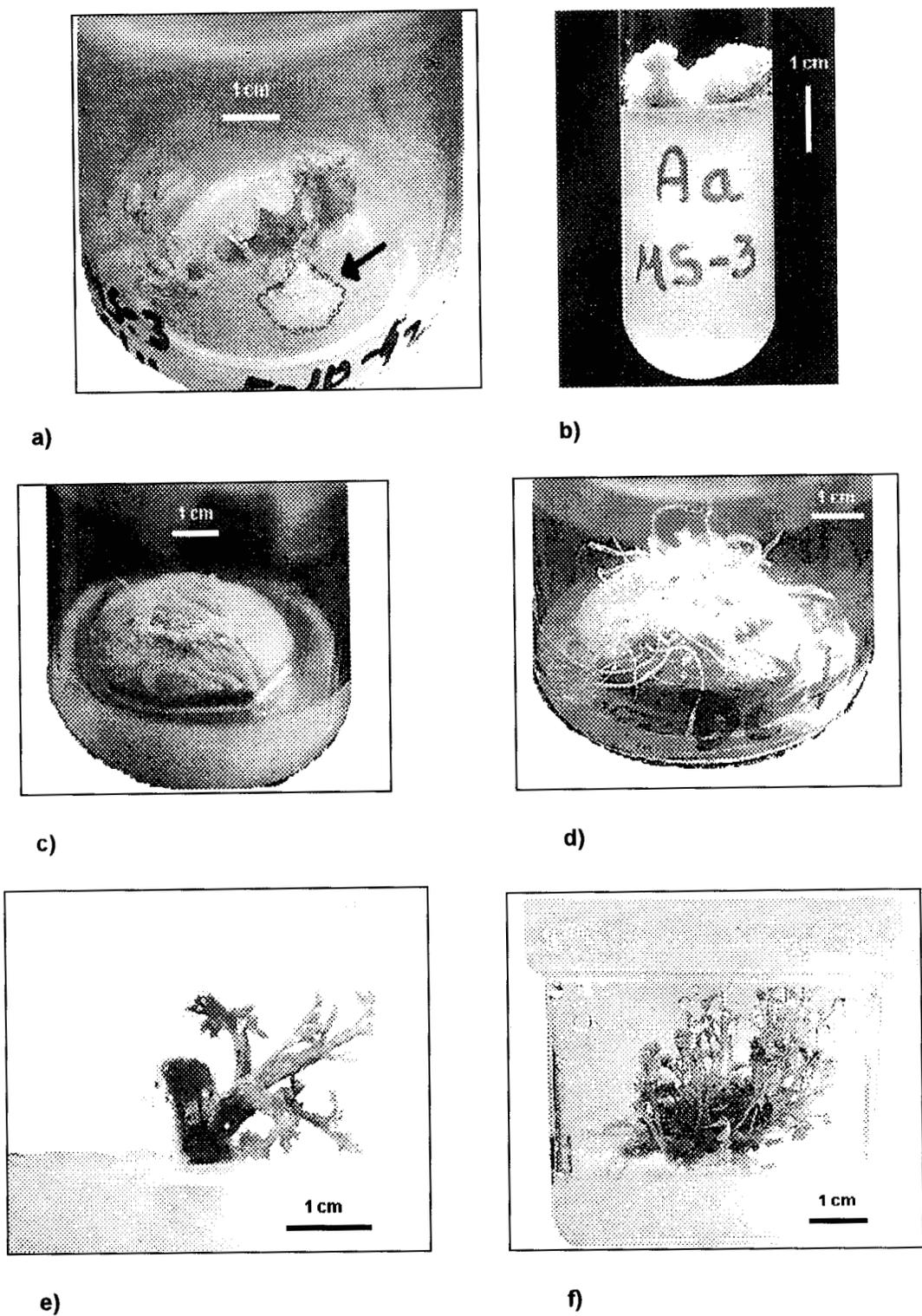


Figura 7. a) Formación de callos en explantes de hoja de *A. absinthium* en medio MS-3. La flecha indica la posición del callo. b) callos de *A. absinthium* cultivados en medio MS-3. c) Disco de zanahoria infectado con *A. rhizogenes* 15834. d) Raíces pilosas formadas sobre discos de zanahoria infectados con *A. rhizogenes* 15834. e) Entrenudo de *A. absinthium* que muestra la emergencia de una yema. f) Formación de brotes múltiples a partir de un entrenudo de *A. absinthium*.

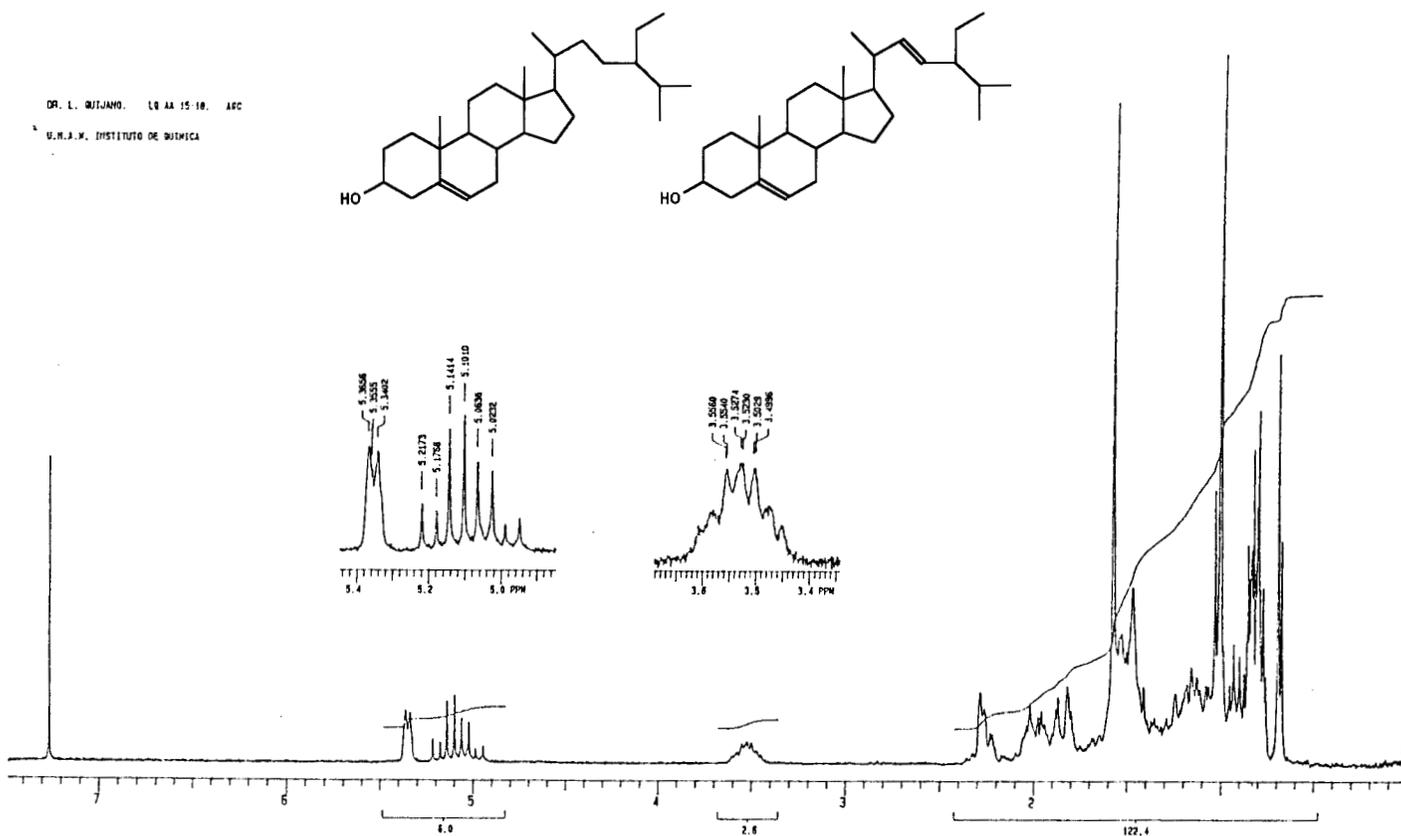


Figura 8. Espectro de ^1H -RMN de la mezcla de sitosterol y estigmasterol obtenidos de callos de *A. absinthium* cultivados en medio MS-3.

222477

CONCLUSIONES

- Los resultados muestran que es posible obtener callos de *A. absinthium* en ausencia de reguladores del crecimiento vegetal, aunque su crecimiento es significativamente menor al encontrado en los medios MS-3 y MS-5. En los dos medios mencionados se obtienen los mayores incrementos en biomasa, sin embargo se eligió el medio MS-3 para experimentos posteriores debido a que favorece un 100.0 % de respuesta en la formación de callo sobre los explantes de hoja, mientras que el medio MS-5 lo ejerce en un porcentaje inferior. Los reguladores del crecimiento vegetal aplicados exogenamente influyen de manera importante en la división celular, la obtención de callos en medio MS-0 se debió probablemente a la concentración endógena de auxina y citocinina mostrando un escaso crecimiento posterior a la inducción de la división celular.
- Los resultados encontrados al emplear distintos carbohidratos en diferentes concentraciones muestran que la glucosa y la sacarosa influyen de la misma manera en la formación del callo, por otro lado, el crecimiento observado en los cultivos mantenidos en medios conteniendo glucosa o fructosa fué significativamente menor al obtenido en los cultivos con sacarosa, dentro de estos últimos la mayor respuesta de crecimiento se encontró a una concentración de 4.0 %.
- Cinetina, BAP y 2iP combinadas con 2,4-D y ANA son igualmente efectivas en la promoción de cultivos de callo. En relación a su crecimiento 2iP combinado con las dos auxinas provoca un menor crecimiento al observado en los restantes tratamientos.
- De todos los tratamientos probados el que promueve la mejor respuesta tanto en formación como en crecimiento de los callos es MS-3 modificado con 4.0 % de sacarosa. Resulta necesario para futuras investigaciones seguir el curso temporal del crecimiento con el fin de obtener un conocimiento más preciso acerca de la dinámica de los cultivos.
- No fueron obtenidos cultivos de raíces transformadas, una posible vía de solución es el empleo de distintas cepas de la bacteria.

- Cultivos de células en suspensión recientemente se han obtenido por lo que se carece del conocimiento acerca de su comportamiento, tales cultivos se obtuvieron en medio MS-3 carente de gelificante.
- Los callos de *A. absinthium* cultivados en medio MS-3 sintetizan sitosterol y estigmasterol.
- BAP promueve una alta emergencia de yemas adventicias en *A. absinthium* al ser incorporada al medio de cultivo en ausencia de ANA. Este es un resultado preliminar que debe ser estudiado con mayor detalle a fin de lograr condiciones experimentales adecuadas para estudios sobre morfogénesis y la propagación de la especie.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Mogib, M., Dawidar, A.M., Matwally, M.A. and Abou-Elzahab, M. 1990. p-Coumaric acid derivatives from *Artemisia monosperma*. *Phytochemistry* **29**:2728-2729.
- Akhila, A., Rani, K. and Thakur, R.S. 1990. Biosynthesis of artemisinin acid in *Artemisia annua*. *Phytochemistry* **29**:2129-2132.
- Akhtar, N., Malik, A., Noor Ali, S. and Urooj Kazmi, S. 1992. Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Caloptris procera*. *Phytochemistry* **31**:2821-2824.
- Anderson, L.A., Keene, A.T. and Phillipson, J.D. 1982. Alkaloid production by leaf organ, root organ and cell suspension cultures of *Chinchona ledgeriana*. *Planta Medica* **46**:25-27.
- Atkinson, B. and Mavituna, F. 1983. **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook**, Chapter 7. 2nd Edition, 1991, M Stockton Press, Pined in México.
- Banthorpe, D.V. and Brown, G.D. 1989. Two unexpected coumarin derivatives from tissue cultures of Compositae species. *Phytochemistry* **28**:3003-3007.
- Becker, H. 1987. Regulation of secondary metabolism in plant cell cultures. *In*, **Plant Biology Volume 3, Plant Tissue and Cell Culture** (Green, C.E., Somers, W.P., Hackett, W.P. and Bisboer, D.D., eds.), Alan R. Liss, Inc. New York, USA, pp. 199-212.
- Botta, B., Dall'Olio, G., Ferrari, F., Monacelli, B., Pasqua, G., Scurria, R. and Delle Monache, G. 1989. Cell suspension cultures of *Cassia didymobotrya*: Optimization of growth and secondary metabolite production by application of the orthogonal design method. *J. Plant Physiol.* **135**:290-294.
- Buitelaar, R.M., Langenhoff, A.A.M., Heidstra, R. and Tramper, J. 1991. Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme Microbiol. Technol.* **13**:487-494.
- Carew, D.P. and Staba, E.J. 1965. Plant tissue culture: Its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies. *Lloydia* **28**:1-26.
- Catalán, C.A.N., Cuenca, M.R., Verghese, J., Joy, M.T., Gutierrez A.B. and Herz, W. 1990. Sesquiterpene ketones related to davanone from *Artemisia pallens*. *Phytochemistry* **29**:2702-2703.
- Charles, D.J., Simon, J.E., Wood, K.V. and Heinstein, P. 1990. Germplasm variation in artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of artemisinin analysis from crude plant extracts. *J. Nat. Prod.* **53**:157-160.
- Chen, P.K. and Leather, G.R. 1990. Plant growth regulatory activities of artemisinin and its related compounds. *J. Chem. Ecol.* **16**:1867-1876.

- Chilton, M.D., Tepfer, D., Petit, A. David, C., Casse-Delbart, F. and Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* **295**:432-434.
- Clemente, M., Contreras, P., Susín, J. and Pliego-Alfaro, F. 1991. Micropropagation of *Artemisia granatensis*. *HortScience* **26**:420.
- Cocking, E.C. 1987. Plant cell Biology in the 21st century: The needs of plant cell and tissue culture. *In, Plant Biology Volume 3, Plant Tissue and Cell Culture* (Green, C.E., Somers, W.P., Hackett, W.P. and Bisboer, D.D., eds.), Alan R. Liss, Inc. New York, USA, pp. 3-15.
- Collin, H.A. 1987. Determinants of yield of secondary products in plant tissue cultures. *Adv. Bot. Res.* **13**:145-187.
- Constabel, F. 1990. Medicinal plant biotechnology. *Planta Medica* **56**:421-425.
- El-Feraly, F.S., Ayalp, A., Al-Yahya, M.A., McPhail D.R. and McPhail, A.T. 1990. Conversion of artemisinin to artemisitene. *J. Nat. Prod.* **53**:66-71.
- El-Sohly, H., Croom, E.M., El-Feraly, F.S. and El-Sherei, M.M. 1990. A large scale extraction technique of artemisinin from *Artemisia annua*. *J. Nat. Prod.* **53**:1560-1564.
- Feuerstein, I., Danin, A. and Segal, R. 1988. Constitution of the essential oil from an *Artemisia herba-alba* population of Spain. *Phytochemistry* **27**:433-434.
- Fitch, M.M.M., Manshardt, R.M., Gonsalves, D. and Slightom, J.L. 1993. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Rep.* **12**:245-249
- Flores, H.E., Hoy, M.W. and Pickard, J.J. 1987. Secondary metabolites from root cultures. *TIBTECH* **5**:64-69.
- Flores, H.E., Pickard, J.J. and Hoy, M.W. 1988. Production of polyacetylenes and thiophenes in heterotrophic and photosynthetic root cultures of Asteraceae. *In, Chemistry and Biology of Naturally-Ocurring Acetylenes and Related Compounds* (Lam, J., Breteler, H., Arnason, T. and Hansen, L., eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 233-254.
- Fowler, M.W. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. *In, Plant Biotechnology* (Mantell, S.H. and Smith, H., eds.), Society for Experimental Biology, Seminar Series 18, Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, pp. 3-37.
- Fujita, Y. and Tabata, M. 1987. Secondary metabolites from plant cells - Pharmaceutical applications and progress in commercial production. *In, Plant Biology Volume 3, Plant Tissue and Cell Culture* (Green, C.E., Somers, W.P., Hackett, W.P. and Bisboer, D.D., eds.), Alan R. Liss, Inc. New York, USA, pp. 169-185.

- Gelvin, S.B. 1992. Chemical signaling between *Agrobacterium* and its plant host. In, **Molecular Signals in Plant-Microbe Communications** (Verma, D.P.S., ed.), CRC Press, USA, pp. 137-167.
- Giordano, O.S., Guerreiro, E., Pestchanker, M.J., Guzmán, J., Pastor, D. and Guardia, T. 1990. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Nat. Prod.* **53**:803-809.
- Gilissen, L.J.W., Hänisch ten Cate, C.H. and Keen, B. 1983. A rapid method of determining growth characteristics of plant cell populations in batch suspension culture. *Plant Cell Rep.* **2**:232-235.
- Goleniowski, M.E., Silva, G.L. and Trippi, V.S. 1992. Effect of phytohormones on sesquiterpene lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. *Phytochemistry* **31**:2359-2361.
- Gören, N., Jakupovic, J. and Topal, S. 1990. Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* var. *Argyrophyllum*. *Phytochemistry* **29**:1467-1469.
- Grandolini, G., Casinovi, C.G., Betto, P., Fardella, G., Menichini, F., Gabriele, R., Barbetti, P., Kajtar-Peredy, M., Radics, L. 1988. A sesquiterpene lactone from *Artemisia arborescens*. *Phytochemistry* **27**:3670-3672.
- Hamill, J.D., Parr, A.J., Rhodes, M.J.C., Robins, R.J. and Walton, N.J. 1987. New routes to plant secondary products. *BIO/TECHNOLOGY* **5**:800-804.
- Horie, T., Kawamura, Y. and Yamada, T. 1989. Revised structure of a natural flavone from *Artemisia lanata*. *Phytochemistry* **28**:2869-2871.
- Hu, C.Q., Chang, J.J. and Lee, K.H. 1990. Antitumor agents. 115. Seselidiol, a new cytotoxic polyacetylene from *Seseli mairei*. *J. Nat. Prod.* **53**:932-935.
- Hunter, Ch.S. and Neill, S.J. 1990. Induction of Hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* and growth of hairy roots *in vitro*. In, **Methods in Molecular Biology, Volume 6, Plant Cell and Tissue Culture** (Pollard, J.W. and Walker, J.M., eds.), The Humana Press, USA, pp. 279-228.
- Ishimaru, K., Sudo, H., Satake, M., Matsunaga, Y., Hasegawa, Y., Takemoto, S. and Shimomura, K. 1990. Amarogentin, amaroswerin and four xanthenes from hairy root cultures of *Swertia japonica*. *Phytochemistry* **29**:1563-1565.
- Jakupovic, J., Klemeyer, H., Bohlmann, F., and Graven, E.H. 1988. Glaucolides and guaianolides from *Artemisia afra*. *Phytochemistry* **27**:1129-1133.
- Kennedy, A.I., Deans, S.G., Svoboda, K.P., Gray, A.I. and Waterman, P.G. 1993. Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*. *Phytochemistry* **32**:1449-1451.

- Khafagy, S.M., Seif El Din, A.A., Jakupovic, J., Zdero, C. and Bohlmann, F. 1988. Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Artemisia judaica*. *Phytochemistry* 27:1125-1128.
- Klayman, D.L. 1985. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* 228:1049-1055.
- Kyo, M., Miyauchi, Y., Fujimoto, T. and Mayama, S. 1990. Production of nematocidal compounds by hairy root cultures of *Tagetes patula* L. *Plant Cell Rep.* 9:393-397.
- Li, X., Zhang, D., Onda, M., Konda, Y., Iguchi, M. and Harigaya, Y. 1990. Ent-kauranoid diterpenes from *Artemisia sacrorum*. *J. Nat. Prod.* 53:657-661.
- Loyola-Vargas, V.M. and Miranda-Ham, M.L. 1990. Aspects about the obtention of secondary metabolites from plant tissue culture. In, **Production of Secondary Metabolites From Plant Tissue Cultures and its Biotechnological Perspectives** (Loyola-Vargas, V.M., ed.), CICY, México, pp 31-79.
- Macías, F.A., Galindo, J.C.G. and Massanet, G.M: 1992. Potential allelopathic activity of several sesquiterpene lactone models. *Phytochemistry* 31:1969-1977.
- Madueño, M. 1973. **Cultivo de plantas medicinales**. Ministerio de Agricultura, Madrid, España. pp. 55-58.
- Mantell, S.H., Matthews, J.A. and McKee, R.A., **Principles of Plant Biotechnology: Introduction to Genetic Engineering in Plants**, First Edition, 1985, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain, pp. 186-220.
- Marco, J.A. 1989. Sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba* subsp. *herba-alba*. *Phytochemistry* 28:3121-3126.
- Marco, J.A., Barberá, O., Martínez, V., Strack, D. and Meurer, B. 1988. Sesquiterpene lactones from *Artemisia assoana*. *Planta Medica* 54:460-461.
- Marco, J.A., Barberá, O., Rodríguez, S., Domingo, C. and Adell, J. 1988. Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry* 27:3155-3159.
- Merici, A.H., Cubukcu, B., Jakupovic, J. and Özhatay, N. 1988. α -Bisabololoxide derivatives from *Artemisia abrotanum*. *Planta Medica* 54:463-464.
- Misra, L.N., Chandra, A. and Thakur, R.S. 1991. Fragrant components of oil from *Artemisia pallens*. *Phytochemistry* 30:549-552.
- Morán, A., Martín, M.L., Montero, M.J., Ortiz de Urbina, A.V., Sevilla, M.A. and San Román, L. 1989. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Artemisia caerulescens* subsp. *gallica*. *J. Ethnopharmacology* 27:301-317.

COLECCIÓN DE DOCUMENTALES BILIBIOTECA

- Mugnier, J. 1988. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 7:9-12.
- Mukundan, U. and Hjortso, M.A. 1990a. Thiophene content in normal and transformed root cultures of *Tagetes erecta*: A comparison with thiophene content in roots of intact plants. *J. Exp. Bot.* 41:1497-1501.
- Mukundan, U. and Hjortso, M.A. 1990b. Effect of fungal elicitor on thiophene production in hairy root cultures of *Tagetes patula*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:145-147.
- Muñoz, A. 1993. **Obtención de productos naturales en cultivo de callos de *Artemisia absinthium***. Especialización en Biotecnología, Tercer Informe, UAMI, México.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nagaki, M and Matsueda, S. 1989. Guaianolides from *Artemisia montana*. *Phytochemistry* 28:2731-2733.
- 222477
- Nickell, L.G. 1980. Products. *In*, **Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals** (Staba, E.J., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 235-269.
- Novotny, L., Herout, V. and Sorm, F. 1958. A contribution to the structure of absinthin and anabsinthin. *Chem. & Ind.*, pp. 465-466.
- Novotny, L., Herout, V. and Sorm, F. 1960. A contribution to the structure of absinthin and anabsinthin. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* 25:1492-1498.
- Park, J.M., Hu, W.S. and Staba, E.J. 1989. Cultivation of *Artemisia annua* L. plantlets in a bioreactor containing a single carbon and a single nitrogen source. *Biotechnology and Bioengineering* 34:1209-1213.
- Parodi, F.J., Fischer, N.H. and Flores, H.E. 1988. Benzofuran and bithiophenes from root cultures of *Tagetes patula*. *J. Nat. Prod.* 51:594-595.
- Pestchanker, L.J., Giulietti, A.M., Pestchanker, M.J., Guerreiro, E. and Giordano, O.S. 1990. The sesquiterpene lactone dihydroleucodin in tissue culture from *Artemisia douglasiana*. *Phytochemistry* 29:1853-1854.
- Pestchanker, L.J., Kurina, M., Giulietti, A.M. and Giordano, O.S. 1989. Production of dihydroleucodin from callus lines of *Artemisia douglasiana* Besser. *Biotechnol. Lett.* 11:803-806.
- Potrykus, I. 1991. Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:205-225.
- Qureshi, S., Ageel, A.M., Al-Yahya, M.A., Tariq, M. Mossa, J.S. and Shah, A.H. 1990. Preliminary toxicity studies on ethanol extracts of the aerial parts of *Artemisia abyssinica* and *A. inculta* in mice. *J. Ethnopharmacology* 28:157-162.

- Rauter, A.P., Branco, I., Tostão, Z., Pais, M.S., González, A.G. and Bermejo, J.B. 1989. Flavonoids from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. *Phytochemistry* **28**:2173-2175.
- Rodríguez, G., Pestchanker, L.J., Pestchanker, M. J. and Giordano, O.S. 1990. Guaianolides and other constituents from *Artemisia douglasiana*. *Phytochemistry* **29**:3028-3029.
- Rustaiyan, A, Sigari, H, Jakupovic, J. and Grenz, M. 1989. A sesquiterpene lactone from *Artemisia diffusa*. *Phytochemistry* **28**:2723-2725.
- Sanz, J.F. and Marco, J.A. 1990. Sesquiterpene lactones from *Artemisia caerulescens* subsp. *gargantae*. *Phytochemistry* **29**:2913-2917.
- Sanz, J.F. and Marco, J.A. 1990. Synthesis of sinapyl alcohol diisovalerate, a new phenylpropanoid from *Artemisia assoana*. *J. Nat. Prod.* **53**:1034-1035.
- Sanz, J.F., Barbera, O. and Marco, J.A. 1989. Sesquiterpene lactones from *Artemisia hispanica*. *Phytochemistry* **28**:2163-2167.
- Sanz, J.F., Castellano, G. and Marco, J.A. 1990a. Sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry* **29**:541-545.
- Sanz, J.F., Falcó, E. and Marco J.A. 1990b. Further new sesquiterpene lactones from *Artemisia herba-alba* subsp. *valentina*. *J. Nat. Prod.* **53**:940-945.
- Sanz, J.F., Rustaiyan, A., and Marco, J.A. 1990c. A melampolide from *Artemisia aliveriana*. *Phytochemistry* **29**:2919-2921.
- Seabrook, J.E.A. 1980. Laboratory culture. *In*, **Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals** (Staba, E.J., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 1-20.
- Seigler, D.S. 1981. Secondary metabolites and plant systematics. *In*, **The Biochemistry of Plants, Vol. 7** (Conn, E.E., ed.), Academic Press, Inc., New York, USA, pp. 139-176.
- Sings, M.W. and Flores, H.E. 1990. The biosynthetic potential of plant roots. *BioEssays* **12**:7-13.
- Skoog, F. and Miller, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**:357-361.
- Tan, R.X. and Jia, Z.J. 1992. Sesquiterpenes from *Artemisia rutifolia*. *Phytochemistry* **31**:2534-2536.
- Tan, R.X., Jakupovic, J., Bohlmann, F., Jia, Z.J. and Hunek, S. 1991. Sesquiterpene lactones and other constituent from *Artemisia xerophytica*. *Phytochemistry* **30**:583-587.

- Tawfiq, N.K., Anderson, L.A., Roberts, M.F., Phillipson, J.D., Bray, D.H. and Warhurst, D.C. 1989. Antiplasmodial activity of *Artemisia annua* plant cell cultures. *Plant Cell Rep.* **8**:425-428.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* **37**:959-967.
- Tepfer, D. and Casse-Delbart, F. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiol. Sci.* **4**:24-28.
- Vera Estrella, R. 1987. Bioestadística aplicada al cultivo de tejidos vegetales. En, **Cultivo de Tejidos Vegetales** (Hurtado, M.D.V. y Merino, M.M.E., eds.) Trillas, México. pp 162-198.
- Wallnöfer, B., Hofer, O. and Greger, H. 1989. Polyacetylenes from the *Artemisia "vulgares"* group. *Phytochemistry* **28**:2687-2691.
- Wang, Y., Toyota, M., Krause, F., Hamburger, M. and Hostettmann, K. 1990. Polyacetylenes from *Artemisia borealis* and their biological activities. *Phytochemistry* **29**:3101-3105.
- White, F.F., Ghidossi, G., Gordon, M.P. and Nester, E.W. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* **79**:3193-3197.
- Zafar, M.M., Hamdard, M.E. and Hameed, A. 1990. Screening of *Artemisia absinthium* for antimalarial effects on *Plasmodium berghei* in mice: A preliminary report. *J. Ethnopharmacology* **30**:223-226.

APENDICE A

Se presentan a continuación los trabajos presentados en eventos especializados y publicaciones que fueron generados a partir del presente trabajo.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

II SIMPOSIO
DE
CIENCIAS DE LA SALUD

SALA CUICACALLI
OCTUBRE 23, 24 Y 25/1991

UNIDAD IZTAPALAPA CBS

CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Artemisia
absinthius* L.

José Angel Lechuga^{1,2}, Ma. Dolores García² y
Francisco Cruz³.

- (¹) Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de
Biotecnología.
- (²) Laboratorio de Ecología, Departamento de
Biología.
- (³) Estudiante de la Maestría en Biología
Experimental.

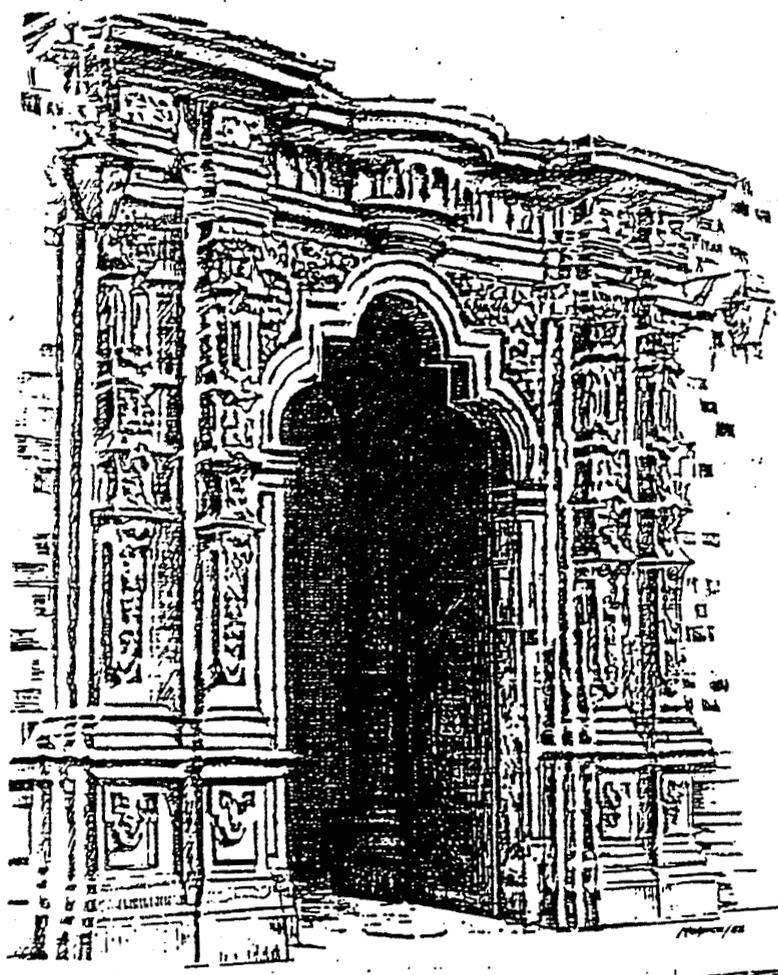
Artemisia absinthius es una planta introducida en México desde tiempos de la conquista española, comúnmente conocida como ajenojo, la cual se ha incorporado a nuestra medicina tradicional para el tratamiento principalmente de malestares digestivos y fiebres. Se ha demostrado que los dos principales principios activos de esta planta son la absintina y anabsintina, guayanolidos diméricos de fórmula condensada $C_{30}H_{40}O_4$. La anabsintina se forma a partir de la absintina por la adición de un grupo hidroxilo en el doble enlace produciéndose un anillo oxidado.

En el presente trabajo se reporta un método para la obtención de cultivos de células en suspensión de *A. absinthius*, el cual se basa en el cultivo de segmentos de hoja en medio MS suplementado con sacarosa (3.0 %) y diferentes concentraciones de 2,4-D, siendo más eficiente a 2×10^{-8} M, mantenido en agitación constante (120 rpm), lo que difiere del método más empleado en la mayoría de los laboratorios que requiere de una previa formación de callo.

Los cultivos podrán ser utilizados como modelo experimental para el estudio del metabolismo secundario en esta especie, así como para diversos estudios relacionados con la fisiología celular y la morfogénesis.

V CONGRESO
INTERNACIONAL DE MEDICINA
TRADICIONAL Y FOLKLORICA

RESUMENES DE TRABAJOS CIENTIFICOS ORIGINALES



ANTIGUO COLEGIO DE SAN ILDEFONSO

Ciudad de México

121.- EVOLUCION DE LA UTILIZACION DE LAS PLANTAS MEDICINALES
POR LOS CHIMPANCES Y HOMO SAPIENS.
ELOY RODRIGUEZ.

U.S.A.

122

UTILIZACION DE LA BIOTECNOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

José Angel Lechuga C. (1), Ma. Dolores García S. (2) y Francisco Cruz S. (1)
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
A.P. 55-535
México, D.F.

(1) Departamento de Biotecnología

(2) Departamento de Biología

RESUMEN

En nuestros días la Biotecnología es una disciplina que se emplea para mejorar la formación, acumulación o transformación de los productos naturales de las plantas. En particular para las plantas medicinales es de gran relevancia ya que aproximadamente el 25 % de las formulaciones farmacéuticas contienen un producto vegetal o sus derivados. Las metodologías biotecnológicas que se emplean corrientemente a las plantas medicinales son la micropropagación, el cultivo de células y raíces transformadas genéticamente, y más recientemente la transferencia de genes entre las especies. Artemisia absinthium L. (Asteraceae), comúnmente conocida como ajenjo, es una importante planta medicinal cuyos usos tradicionales son principalmente como tónico estomacal, vermífugo y antifebril. También se emplea para la preparación del vermut. Se sabe que el principio activo del ajenjo es la absintina, compuesto cuya fórmula condensada es $C_{30}H_{40}O_8$. En este trabajo se reporta la aplicación de la Biotecnología para el estudio de la biosíntesis de absintina, específicamente en cultivos de callo y células en suspensión.

ETNOBOTANICA '92



20 - 26 DE SEPTIEMBRE 1992

LIBRO DE RESUMENES

CORDOBA • ESPAÑA

**"In vitro" culture techniques: Cell suspension
and callus culture of *Artemisia absinthium* L.**

Lechuga*, J.A., S. Meraz V*., M.D. García-Suárez** y F. Cruz S.*

* Depto. de Biotecnología,

** Depto. de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México

Artemisia absinthium is an introduced plant species to Mexico since the Spanish conquest, it is commonly known as ajeno and has been included in our traditional medicine as a cure of digestive symptoms and fevers. At present it has been demonstrated that there are true active principles involved in this plant: the absintin and the anabsintin, sesquiterpenic lactones, its condensed formula is $C_{30}H_{46}O_6$. This work is directed to the future obtainance of the secondary products which have made *A. absinthium* of such importance. At this moment we have been able to obtain cell suspension cultures from leaf cuts with different concentrations of 2,4-D on MS liquid medium, obtaining the best results at 2×10^{-5} M, these were maintained at a constant agitation (120 rpm) differing from any other method employed before. An analogous work was done related with callus production from leaf cuts in MS solid medium, in this case the best treatment for callus induction was 10^{-5} M of 2,4-D.

The cultures are being maintained in order to improve their proliferation rate, so that we might be able to supply its synthesis of absintin and anabsintin. For the phytochemical analysis the following techniques will be used: thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance and mase spectrometry.

222477



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

MEMORIAS

I SIMPOSIO

PRODUCTOS NATURALES:
UN ENFOQUE BIOTECNOLOGICO

5 y 6 de Noviembre de 1992

SINTESIS DE PRODUCTOS NATURALES EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

J.A. LECHUGA CORCHADO, M.D. GARCIA-SUAREZ¹, F. CRUZ SOSA.

Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa.

¹Departamento de Biología, UAM-Iztapalapa.

A.P. 55-535, México, D.F., 09340, MEXICO.

RESUMEN

Una de las aplicaciones potenciales del cultivo de células y tejidos vegetales es la producción a escala industrial de productos del metabolismo vegetal útiles en diferentes aspectos de las actividades humanas. El logro de procesos altamente eficientes depende de la selección de líneas sobreproductoras, la síntesis de compuestos de interés acelerada a través de la elicitación y por último del cultivo de estructuras organizadas como son las raíces transformadas. En el presente estudio se ponen de manifiesto algunos de los logros de estas metodologías.



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

VII

JORNADAS DE BIOTECNOLOGIA

RESUMENES *IN EXTENSO*

1993

CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS VEGETALES COMO FUENTE DE PRODUCTOS NATURALES

J. A. LECHUGA, A. MUÑOZ FLORES, S. MERAZ VAZQUEZ,
E. DE VALDEMAR OSNAYA, M. D. GARCIA SUAREZ (1) y F. CRUZ SOSA

GRUPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS, AREA DE PRODUCTOS NATURALES,
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA, UAM-IZTAPALAPA.

(1) GRUPO DE ECOLOGIA DE ZONAS ARIDAS, AREA DE BOTANICA,
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, UAM-IZTAPALAPA.

RESUMEN: Se describen las actividades de investigación y de difusión realizados por el grupo de metabolitos secundarios del Area de Productos Naturales durante 1992. El grupo trabaja sobre dos líneas de investigación: Metabolitos secundarios de plantas cultivadas *in vitro* y de organismos marinos. Se continuó con la inducción de callo de *Artemisia absinthium* y la propagación de callo inducido en cultivos en suspensión. Se inició la inducción de callo de *Amaranthus hypochondriacus* y su cultivo en suspensión. Los callos subcultivados a partir de fragmentos de hoja de *Artemisia absinthium* en condiciones de luz y de oscuridad, se secaron a temperatura ambiente, se extrajeron con metanol y se concentraron para obtener un residuo que se analizó por tlc. Se concluyó el estudio químico de la esponja marina *Desmapsama anchorata* de la cual se identificaron por medio de técnicas espectroscópicas sus constituyentes químicos.

PALABRAS CLAVE: Biotecnología vegetal, cultivo de tejidos vegetales, metabolitos secundarios, *Artemisia absinthium*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Desmapsama anchorata*.

PLANT CELL AND TISSUE AS A SOURCE OF NATURAL PRODUCTS

ABSTRACT: Investigation and diffusion activities achieving in 1992 by secondary metabolites group of Natural Products Area are described. The group are working in two lines of investigation: secondary metabolites from plant cell and tissue cultures and marine organisms. Callus and suspension cultures of *Artemisia absinthium* were continued. Callus induction and cell suspension culture of *Amaranthus hypochondriacus* were started. Callus induction of leaf cuts of *Artemisia absinthium* of suitable size were subcultured by transferring to fresh medium in light or dark conditions and then were air dried, extracted with methanol and the filtrate concentrated to obtain a residue, that was objected to tlc analysis. Chemical study of marine sponge *Desmapsama anchorata* was finished; identification of some metabolites by spectroscopic methods were made.

KEYWORDS: Plant biotechnology, cell plant culture, secondary metabolites, *Artemisia absinthium*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Desmapsama anchorata*.

INTRODUCCION

Dentro de la línea de investigación de metabolitos secundarios de cultivo de tejidos vegetales se continuó con la inducción de callo y de células en suspensión de *Artemisia absinthium*, de los callos se obtuvieron extractos metanólicos después de secarse. Los callos se incubaron en condiciones de luz y oscuridad y estos extractos se guardaron por separado para ir agregándose las posteriores generaciones. Se aplicó el extracto en placas de cromatografía en placa fina con el fin de observar los diferentes constituyentes químicos que contiene. Se iniciaron varios experimentos para seleccionar los medios de cultivo para inducir callo en *Amaranthus hypochondriacus*.

En la línea de investigación de metabolitos secundarios de organismos marinos se concluyó el estudio químico de la esponja marina *Desmapsama anchorata* de la cual se aislaron después de purificarse por cromatografía en columna y en placa fina varios de sus componentes químicos, entre los que se identificó a esteroides, ácidos grasos y sus ésteres metílicos, alcoholes alifáticos y monoalquiliéteres del glicerol. Estos productos naturales se determinaron estructuralmente por sus datos de resonancia magnética nuclear y de espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases.

MATERIALES Y METODOS

En todos los experimentos se utilizó el medio de cultivo de MS (SIGMA CHEM Co., Producto No. M5519), adicionado con sacarosa (3.0%), cinetina (4.65 μM), 2,4-D (1.81 μM), como agente glicificante se empleó agar bacteriológico (0.8%). La esterilización del medio se realizó en autoclave a 121°C por 15 min.

En todos los casos se emplearon plantas de *A. absinthium* mantenidas en el invernadero. La obtención de explantes asépticos se llevó a cabo siguiendo el siguiente procedimiento:

- Obtención de cortes de hoja de aproximadamente 10 cm².
- Lavado con agua corriente y detergente.
- Inmersión en solución de etanol al 70% por 15 segundos.
- Inmersión en cloro comercial diluido al 10% por 10 minutos.
- 3 a 4 lavados con agua destilada esterilizada.

Todo lo anterior así como la transferencia de los explantes al medio de cultivo se realiza bajo condiciones asépticas. Una vez inoculado el explante el frasco de cultivo fué cerrado con tapas de polipropileno y sellado con parafilm. La incubación de los cultivos se realizó a temperatura ambiente en condiciones de luz u oscuridad. Los callos formados fueron resebrados periódicamente cada cuatro semanas para su posterior cultivo en medio líquido y extracción. Los cultivos de callo fueron secados al aire a t.a., siendo molidos para su extracción con metanol, el cual se filtró y se concentró en rotavapor. El residuo se analizó por cromatografía en placa fina

(Atkinson and Mavituna, 1991). Se realizaron otros experimentos para determinar el efecto de la fuente de carbono.

La inducción de callo en explantes de *A. hypochondriacus* se hizo a partir de plantas cultivadas en el invernadero. Los tallos se cortaron en tramos de 1 cm, fueron lavados de la misma manera que los explantes de *A. absinthium*. Se sembraron en medio de cultivo B-5 (SIGMA CHEM Co., Producto No. G5893) suplementado con sacarosa (3.0%), agar (0.8%), cinetina (0.46 μM) y 2,4-D (0.45 μM). Con este tratamiento se indujo callo después de una semana de incubación.

D. anchorata se colectó por medio de buceo en los arrecifes del Puerto de Veracruz. Se separó el agua de la esponja la que se molió con metanol, se filtró, se concentró y se extrajo con diclorometano y acetato de etilo. Los extractos se concentraron y el residuo se cromatografió en una columna de silica gel, eluyéndose con disolventes de varias polaridades. Fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 9:1 dieron una mezcla de esteroides y las fracciones eluidas con hexano-acetato de etilo 8:2 dan una mezcla de monoalquiléteres del glicerol.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la formación de callos en explantes de hoja se observan claros efectos del 2,4-D y la cinetina en las concentraciones de 1.81 μM y 4.65 μM , respectivamente, con el cual se obtiene un 100% de inducción. Otros tratamientos provocaron porcentajes de inducción en un rango de 0 a 90%. En cuanto a la fuente de carbono la sacarosa y la glucosa favorecen en un 100% la formación de callo efecto que se vé notablemente disminuído en el medio en donde se utilizó la fructosa. Las placas cromatográficas reveladas muestran la presencia de diversas sustancias de polaridad variada.

Esponjas como *D. anchorata* han proporcionado una variedad de ácidos grasos y sus derivados que también se han encontrado en organismos terrestres, aunque éstos no se encuentran en muchas esponjas. Estudios sobre la actividad antimicrobiana de los monoalquiléteres del glicerol han mostrado que estos inhiben el crecimiento bacteriano y que estos compuestos juegan un papel defensivo en la vida de las esponjas.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el medio MS suplementado con 1.81 μM de 2,4-D y 4.65 μM de cinetina es el más adecuado para la formación y crecimiento de callos de *A. absinthium*. La fuente de carbono más adecuada para la formación y crecimiento de callo es la sacarosa.

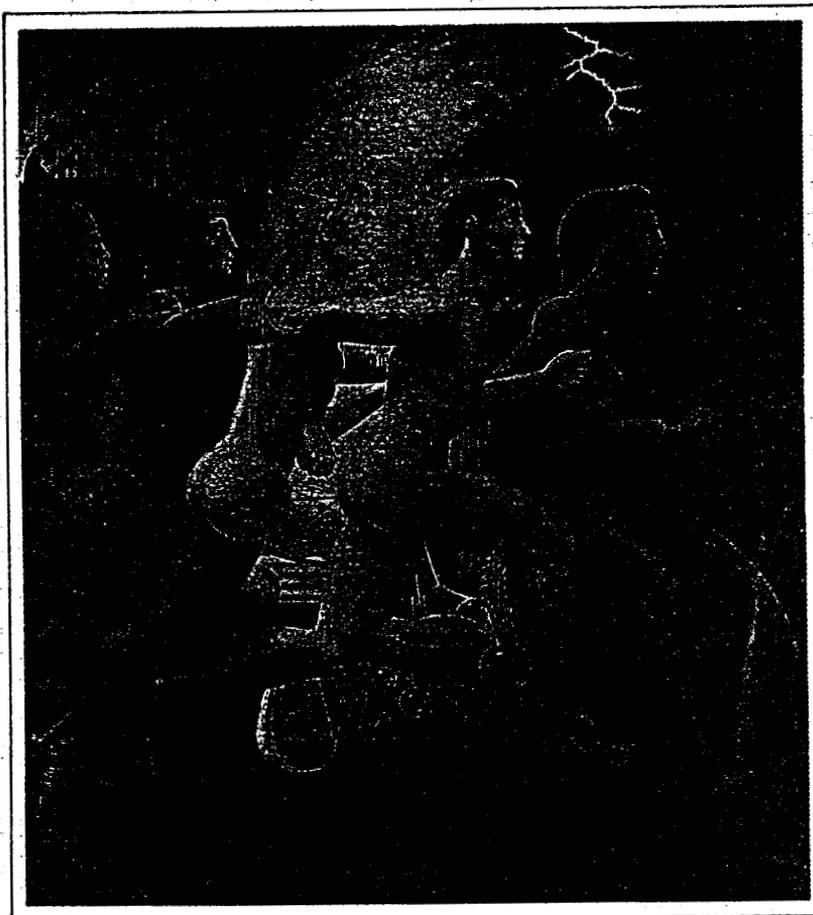
Para la inducción de callo a partir de hipocótilo de *A. hypochondriacus*, el medio B-5 suplementado con 0.45 μM de 2,4-D y 0.46 μM de cinetina es adecuado para la formación de callos. Este medio se está usando para el cultivo de células en suspensión.

Los estudios realizados en *Desmapsama anchorata* muestran la presencia en este organismo de sustancias con probable actividad antimicrobiana.

LITERATURA CITADA

Atkinson, B. and F. Mavituna (1991). Plant Cell Culture. *In: Biochemical and Biotechnology Handbook*. 2nd. Edition; Stockton Press, México.

35 ANIVERSARIO
INSTITUTO TECNOLOGICO DE CELAYA
TERCER CONGRESO LATINOAMERICANO
DE FITOQUIMICA.



CELAYA, GUANAJUATO, MEXICO.
10-15 DE OCTUBRE DE 1993.

35 ANIVERSARIO INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CELAYA

TERCER CONGRESO LATINOAMERICANO DE FITOQUÍMICA.

RESUMEN No. 24 B

APLICACION DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES AL ESTUDIO DE LAS PLANTAS MEDICINALES.

José Angel Lechuga Corchado, Arturo Muñoz Flores, Salvador Meraz Vásquez, María Dolores García Suárez* y Francisco Cruz Sosa.

Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa.

*Departamento de Biología UAM-Iztapalapa.

Las plantas son una fuente muy importante de compuestos útiles al hombre. En la actualidad un nuevo enfoque para el estudio del metabolismo de la célula vegetal y eventualmente para la producción a gran escala de metabolitos secundarios es el empleo de las técnicas de cultivos de tejidos vegetales. La *Artemisia absinthium* L., es usada comúnmente para tratamiento de malestares digestivos y como antifebril, también se emplea en la fabricación del "vermut". Se sabe que esta planta sintetiza dos lactonas sesquiterpénicas: absintina y anabsintina. El estudio de la síntesis de lactonas sesquiterpénicas por cultivos *in vitro* de algunas especies del género ha sido abordado en años recientes, por lo que se plantea en este trabajo el establecimiento de cultivos de callo de *A. absinthium* con el fin de contar con un sistema controlado y reproducible que permita posteriormente experimentar en torno a los mecanismos que controlan la síntesis de tales compuestos. La obtención de cultivos de callo está relacionada con la dediferenciación celular y es controlado por auxinas y citocininas. Se muestran resultados sobre la inducción de callos en fragmentos de hoja de *A. absinthium* sometidos a diferentes concentraciones de 2,4-D, cinetina y distintas fuentes de carbono.

Notas y Comentarios:

Sobretiro de/*Reprint of*

Productos Naturales

Juan Carlos Peña Avila
José Angel Lechuga Corchado
Francisco Cruz Sosa

Editores

Volumen 1
Perspectivas
Biotecnológicas



Una abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Primera edición, 1992
(C) UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Michoacán y la Purísima
Iztapalapa, 09340, México, D.F.

ISBN: 970-620-131-9

Impreso y hecho en México /*Printed in Mexico*

SINTESIS DE PRODUCTOS NATURALES EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

J.A. LECHUGA CORCHADO, M.D. GARCIA-SUAREZ(1), F. CRUZ SOSA.

Deptos. de Biotecnología y Biología(1), UAM-Iztapalapa.
Apdo. Postal 55-535, C.P. 09340, México, D.F.

RESUMEN

Una de las aplicaciones potenciales del cultivo de células y tejidos vegetales es la producción a escala industrial de productos del metabolismo vegetal útiles en diferentes aspectos de las actividades humanas. El logro de procesos altamente eficientes depende de la selección de líneas sobreproductoras, la síntesis de compuestos de interés acelerada a través de la elicitación y por último del cultivo de estructuras organizadas como son las raíces transformadas. En el presente estudio se ponen de manifiesto algunos de los logros de estas metodologías.

PALABRAS CLAVE: Productos naturales, líneas celulares, elicitación, cultivo de raíces transformadas, *Agrobacterium rhizogenes*, biotecnología vegetal.

INTRODUCCION

Las plantas son una fuente muy importante de compuestos químicos dentro de los que se incluyen esteroides, alcaloides, terpenos, etc., los cuales son útiles como agroquímicos y para las industrias farmacéutica, alimentaria y de cosméticos principalmente (Fowler, 1983). Estos compuestos son llamados colectivamente metabolitos secundarios, término acuñado por los estudiosos de la fisiología vegetal para referirse a los productos de aquellas partes del metabolismo vegetal que no se encuentran representadas en la generalidad de los organismos

vegetales, también se refiere a los productos metabólicos a los cuales no es posible asignar una función inmediata (Zähner, 1987). Debido al desconocimiento de la función biológica de la mayoría de los metabolitos secundarios hemos considerado adecuado adoptar el término productos naturales para designar tales compuestos. Lo anterior ha sido tema de debates entre los investigadores, ya que se ha descubierto que sobre los productos naturales existe una estricta regulación tanto en su síntesis como en su degradación dentro de la célula vegetal (Dougall, 1990). A los productos naturales se les han adjudicado funciones como intermediarios entre las plantas que los sintetizan y su medio ambiente, de tal forma que pueden intervenir en los mecanismos de defensa ante predadores potenciales, como atrayentes de los polinizadores, para el combate contra patógenos o como mecanismo de respuesta ante factores de presión ambiental como la sequía o temperaturas extremas (Bell, 1980). En el presente trabajo se señalan algunos de los avances logrados al emplear las técnicas de cultivo de tejidos en la investigación sobre los productos naturales de origen vegetal.

CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS VEGETALES

El uso potencial de las técnicas de cultivo de células y tejidos vegetales para la producción a gran escala de productos naturales ha sido considerado con mucho optimismo por los biotecnólogos (Carew y Staba, 1965; Constabel, 1990), debido en gran parte a que muchas de las plantas de interés habitan las regiones tropicales del mundo y se ha dado escasa atención a su cultivo bajo domesticación y a la selección de genotipos altamente productores (Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990). Después de más de 20 años de investigación, existen pocos casos de éxito comercial, uno de ellos es la producción de shikonina por cultivos celulares de *Lithospermum erythrorhizon* por la compañía japonesa Mitsui Petrochemical Industries, compuesto ampliamente usado en la industria de los cosméticos (Fujita y Tabata, 1987), no obstante lo anterior,

existen en la actualidad numerosas patentes derivadas de estos estudios, la figura 1 muestra las patentes japonesas de productos derivados de cultivo de células y tejidos vegetales hasta 1987. El poco éxito comercial ha sido atribuido al estado no diferenciado de las células cultivadas *in vitro* ya que muchos metabolitos secundarios son producidos por células especializadas en la planta, otra razón es la alta inestabilidad genética observada en los cultivos, lo que conduce a tasas de producción imprevisibles (Flores et al., 1987).

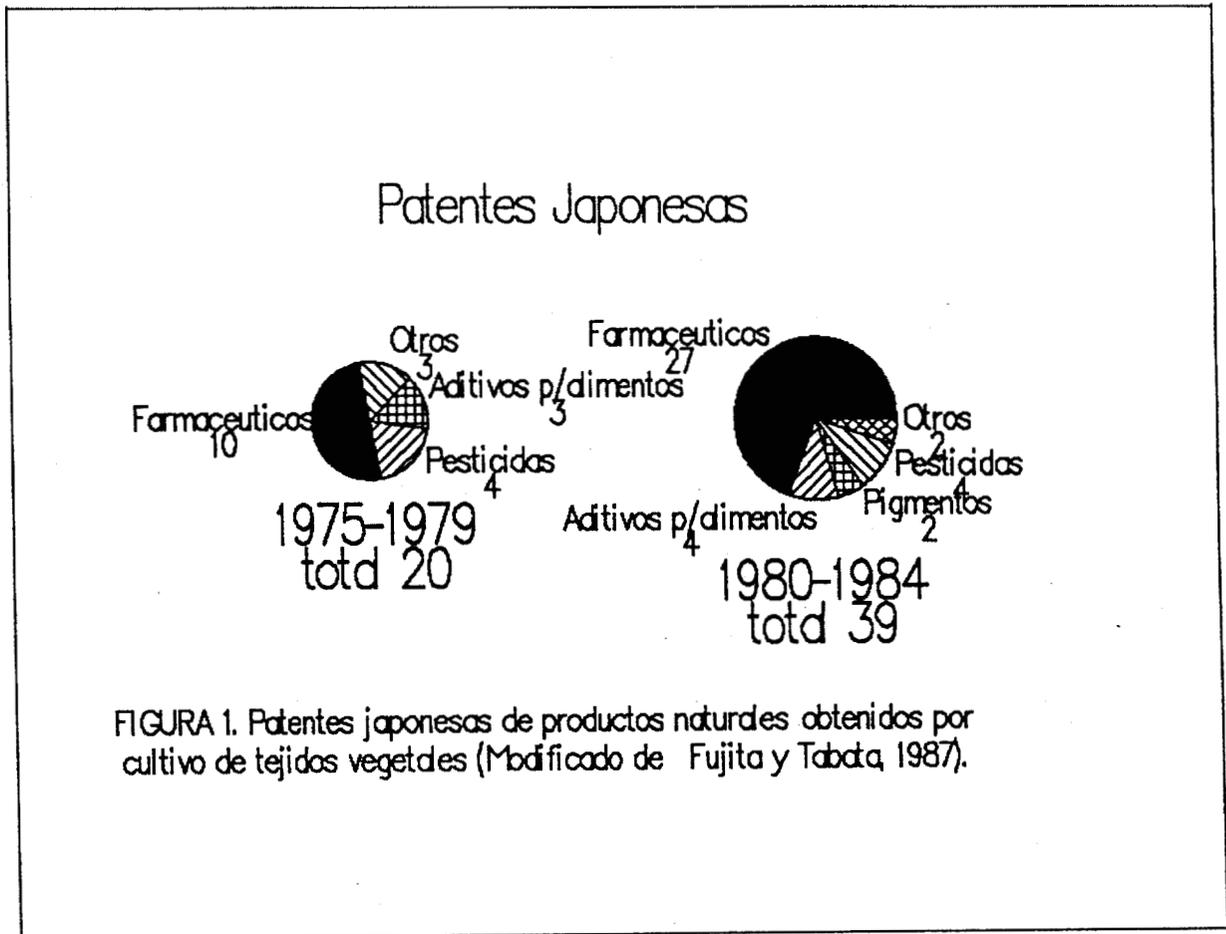
TABLA 1. PRODUCTOS NATURALES EN CULTIVOS CELULARES Y PLANTAS COMPLETAS.

PRODUCTO NATURAL	ESPECIE	PRODUCTIVIDAD	
		CULTIVO CELULAR	PLANTA COMPLETA
Antraquinonas	<i>Morinda citrifolia</i>	900 nmol/g ps	Raíz 110 nmol/g ps
Antraquinonas	<i>Cassia tora</i>	0.334% pf	Semilla 0.209% ps
Ajmalicina y Serpentina	<i>Catharanthus roseus</i>	1.3% ps	0.26% ps
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	26 mg/g ps	Tubérculo 20 mg/g ps
Saponinas	<i>Panax ginseng</i>	0.38% pf	0.3-3.3% pf
Nicotina	<i>Nicotiana tabacum</i>	3.4% ps	2.0-5.0% ps
Ubiquinona	<i>Nicotiana tabacum</i>	0.5 mg/g ps	hoja 16 mg/g ps

ps: Peso seco; pf: Peso fresco
Modificado de Fowler, 1983.

A pesar de su escaso éxito a nivel comercial, los cultivos de células vegetales han sido una herramienta muy importante para la mejor comprensión de las características bioquímicas de las células vegetales (Cocking, 1987); en todo el mundo muchos grupos realizan investigaciones con distintas metodologías con el fin de lograr procesos altamente eficientes de producción de metabolitos secundarios de plantas por medios biotecnológicos (Tabla 1). Entre los enfoques que se están utilizando para estas investigaciones se encuentran los estudios sobre los medios nutritivos, las condiciones medioambientales a que se someten los cultivos, los métodos

para seleccionar líneas celulares sobreproductoras, la mutagénesis, la alimentación de las células con precursores metabólicos del producto deseado, la inmovilización celular, la criopreservación, la biotransformación, el cultivo y fusión de protoplastos, la micropropagación, la elicitación, el cultivo de estructuras organizadas como brotes y raíces transformadas, la ingeniería genética y el diseño de biorreactores (Collin, 1987; Constabel, 1990; Deus y Zenk, 1982; Eilert *et al.*, 1987; Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990). Otro aspecto sumamente importante de la investigación es la posibilidad de encontrar metabolitos novedosos en los cultivos *in vitro* (Phillipson, 1990). A continuación se muestran algunos de los avances logrados en los métodos de selección de líneas celulares sobreproductoras, elicitación y cultivo de raíces transformadas.



SELECCION DE LINEAS CELULARES SOBREPDUCTORAS

La aplicación de métodos de selección a nivel celular cobra importancia debido a su contribución en los estudios sobre fisiología y genética vegetal, así como al mejoramiento de los cultivos, es posible seguir una técnica de selección en un cultivo celular genéticamente heterogéneo o inducir la aparición de mutaciones a través de un agente mutágeno (Nelshoppen y Widholm, 1990). La variación genética existente en los cultivos de células y tejidos vegetales ha sido observada desde los primeros trabajos realizados en esta disciplina, poniéndose de manifiesto como diferencias de color, textura, tasa de crecimiento, requerimientos de nutrientes y reguladores del crecimiento (Larkin y Scowcroft, 1981; Dougall, 1990).

A partir de la perspectiva anterior resulta sumamente interesante el hecho de que las células en cultivo difieren en la cantidad o tipo de los productos naturales que son capaces de sintetizar (Dougall, 1990). Ante tal situación se han podido desarrollar métodos de selección que permitan el establecimiento de líneas celulares sobreproductoras, para los cuales se han considerado diferentes niveles de selección, que van desde la especie hasta la línea celular, tomando en cuenta el nivel de diferenciación, el estado fisiológico y el estatus genético, entre los procedimientos analíticos que han permitido la selección celular se encuentran el examen visual, la fluorescencia, la aplicación de reactivos específicos (CAS, Dragendorf), HPLC, la microespectroscopía y la citometría de flujo (Loyola-Vargas y Miranda-Ham, 1990).

La selección ha permitido avances sumamente importantes, por ejemplo, Deus y Zenk (1982), usando un método de selección basado en fluorescencia lograron un incremento en la síntesis de serpentina en un factor de 46 partiendo de cultivos de *Catharanthus roseus* con una producción de 0.5 % en base seca. Fujita et al., (1985), reportan un incremento de 20 veces en la producción de shikonina al examinar visualmente 459 líneas celulares de *Lithospermum erythrorhizon*. La alta inestabilidad

genética en los cultivos obliga a mantener un programa de selección continuo con el fin de evitar la pérdida de las líneas sobreproductoras, haciéndolo de esta manera es como ha tenido éxito la producción industrial de shikonina.

ELICITACION

Cuando las plantas son infectadas por organismos patógenos (por ejemplo hongos), responden produciendo fitoalexinas las cuales son tóxicas para el organismo invasor. Durante la infección, el patógeno o la planta liberan elicitores los cuales desencadenan la biosíntesis de fitoalexinas, se sabe actualmente que las enzimas involucradas en la síntesis de fitoalexinas son inducibles y que el proceso de inducción está relacionado al nivel de la transcripción, experimentalmente es posible inducir la síntesis acelerada de productos naturales al administrar elicitores en el medio de cultivo (Brodelius, 1990).

La interacción primaria del elicitador y la célula vegetal puede ocurrir a diferentes niveles, inicialmente a nivel de receptores de membrana específicos (Yoshikawa et al., 1983), cambios en la permeabilidad de la membrana o la activación de enzimas liberadoras de fragmentos de la pared celular tanto del patógeno como de la célula vegetal (Keen y Yoshikawa, 1983). La respuesta de la célula vegetal incluye la activación de genes, la transcripción, síntesis de enzimas y finalmente la producción de fitoalexinas (Koehle et al., 1985; Kurtz et al., 1988).

Resulta relativamente obvio el interés por los estudios acerca de la elicitación (Tabla 2), por un lado constituyen un magnífico modelo experimental para realizar estudios a nivel molecular de las relaciones planta-patógeno, y para el estudio de la regulación y enzimología de la síntesis de los productos naturales, por otro lado para lograr el incremento en la síntesis de un compuesto de interés (Brodelius, 1990). Las células vegetales en cultivo y en ausencia de elicitores depositan sus productos metabólicos en la vacuola, lo cual

obliga a destruir el cultivo para recuperar el producto, por el uso de elicitores se ha logrado la liberación de los compuestos en el medio de cultivo lo cual en el caso de *Catharanthus* y *Papaver* representa entre un 40 a 60 % de la síntesis total (Kurtz et al., 1988).

TABLA 2. ACUMULACION DE PRODUCTOS NATURALES EN CULTIVOS CELULARES MEDIADA POR ELICITORES.

ELICITOR	CULTIVO DE CELULAS VEGETALES	PRODUCTO
Actinomicina	<i>Papaver somniferum</i>	Codeína
<i>Botrytis</i> sp.	<i>Papaver somniferum</i>	Sanguinarina
<i>Phytium aphanidermatum</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Alcaloides indólicos
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Chinchona ledgeriana</i>	Antraquinonas
<i>Botrytis alii</i>	<i>Carthamus tinctorius</i>	Poliacetilenos
<i>Sclerotina sclerotiorum</i>	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Diosgenina
Poli-L-lisina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Faseolina

Modificado de Kurtz et al., 1988.

CULTIVO DE RAICES TRANSFORMADAS

Los cultivos de raíces transformadas se han considerado como alternativa para el estudio del metabolismo de la raíz y para el establecimiento de sistemas altamente productivos de compuestos secundarios ya que pueden manifestar el mismo espectro metabólico que las raíces no transformadas (Sings y Flores, 1990).

Agrobacterium tumefaciens y *Agrobacterium rhizogenes* son bacterias del suelo que tienen efectos morfogénicos sobre un amplio rango de dicotiledóneas no así de monocotiledóneas. Se ha tratado de explicar el rango de hospedero de *Agrobacterium* en términos de la respuesta a las heridas que manifiestan las plantas, de esta manera, plantas que manifiestan una buena respuesta a las heridas son generalmente susceptibles de ser infectadas por la bacteria (Potrykus, 1991). La infección de una planta a través de una herida por *A. tumefaciens* resulta

en la producción de un tumor, mientras que la infección por *A. rhizogenes* induce la formación de raíces adventicias en el sitio donde ocurre la infección (Tepfer, 1984). Se ha demostrado que el plásmido Ri (root-inducing) presente en *A. rhizogenes* transforma las células vegetales por la integración estable de su T-DNA (Transfer-DNA) dentro del genoma de la célula vegetal, los genes codificados por el T-DNA regulan el balance endógeno de reguladores del crecimiento, así las células vegetales transformadas se multiplican dando origen a las llamadas raíces peludas (hairy roots) o raíces transformadas, las cuales pueden ser cultivadas y propagadas por tiempo indefinido en un medio de cultivo libre de auxinas y citocininas (Chilton et al., 1982; White et al., 1982). Además de su independencia de los reguladores del crecimiento vegetal y de su capacidad para sintetizar compuestos secundarios, las raíces transformadas presentan otras características sobresalientes entre las que destacan su rápido crecimiento y su completo estado de diferenciación, lo cual contribuye a garantizar la síntesis de los productos propios de la raíz (Constabel, 1990).

TABLA 3. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAICES TRANSFORMADAS PARA LA OBTENCION DE PRODUCTOS NATURALES.

ESPECIE	COMPUESTOS	REFERENCIA
<i>Tagetes patula</i>	Tiofenos	Buitelaar, et al., 1990
<i>T. erecta</i>	Tiofenos	Mukundan y Hjortso, 1990
<i>Nicotiana glauca</i>	Alcaloides	Green et al., 1992
<i>N. rustica</i>	Alcaloides	Walton et al., 1988
<i>N. tabacum</i>	Alcaloides	Wink y Witte, 1987
<i>Spartium junceum</i>	Alcaloides	Wink y Witte, 1987
<i>Datura stramonium</i>	Alcaloides	Robins et al., 1991
<i>Lobelia inflata</i>	Alcaloides	Yonemitsu et al., 1990
<i>Panax ginseng</i>	Saponinas	Yoshikawa y Furuya, 1987
<i>Coreopsis tinctoria</i>	Fenilpropanoides	Reichling y Thron, 1990
<i>Armoracia rusticana</i>	Peroxidasas	Parkinson et al., 1990

En la actualidad se han podido establecer cultivos de raíces transformadas en un amplio número de especies pertenecientes a los géneros *Nicotiana*, *Datura*, y *Solanum* entre otros (Hamill et al., 1987; Mugnier, 1988). Tales cultivos también han probado ser muy útiles para el estudio de los parásitos obligados de la raíz o simbiotes que no pueden crecer en aislamiento y para investigaciones sobre las interacciones raíz-microorganismo (Tepfer y Casse-Delbart, 1987). La tabla 3 muestra algunos ejemplos de cultivos de raíces transformadas y los productos naturales que se han obtenidos de ellas.

CONCLUSIONES

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales ofrecen amplias perspectivas para la investigación sobre los productos naturales de las plantas y para su producción a escala industrial sin embargo, es necesario realizar investigaciones tendientes hacia el logro de mejores rendimientos reduciendo la inestabilidad genética de los cultivos primordialmente es importante seguir un proceso continuo de selección, así como recurrir al empleo de elicitores que permitan una mayor síntesis del producto deseado y al cultivo de estructuras organizadas. Es de primordial importancia realizar investigación básica sobre la regulación enzimática y genética de la síntesis de productos naturales, tanto en plantas como en cultivos celulares. También debemos tener en mente que este tipo de investigaciones requieren de una actividad multidisciplinaria donde participen especialistas en bioquímica, fisiología, genética, biología molecular y en procesos de ingeniería como son la extracción y purificación de compuestos de origen biológico, el escalamiento y el diseño de biorreactores adecuados. Finalmente es importante destacar que el reino vegetal representa una fuente de productos naturales de la cual todavía no conocemos la totalidad de su potencial, en particular el caso de México es destaca ya que en nuestro país encontramos la zona de transición de las floras neartica y neotropical, además se cuenta con un amplio

conocimiento (aunque incompleto todavía), sobre las plantas medicinales y la herbolaria que se ha mantenido desde las culturas prehispánicas a pesar de la conquista española.

LITERATURA CITADA

- Bell, E.A., (1980). The possible significance of secondary compounds in plants. *In*: E.A. Bell, and B.V. Charlwood (Eds.). **Secondary plant products**. Springer-Verlag, New York.
- Brodelius, P. E., (1990). The use of elicitation to study the regulation and enzymology of secondary metabolism. *In*: V.M. Loyola-Vargas (Ed.). **Production of secondary metabolites from plant tissue cultures and its biotechnological perspectives**. CICY, México.
- Buitelaar, R.M., A.A.M. Langenhoff, R. Heidstra, and J. Tramper, (1991). Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**:487-494.
- Carew, D.P., and E.J. Staba, (1965). Plant tissue culture: Its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies. *Lloydia*, **28**(1):1-26.
- Chilton, M.D., D. Tepfer, A. Petit, C. David, F. Casse-Delbart, and J. Tempé, (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, **295**:432-434.
- Cocking, E.C., (1987). Plant cell biology in the 21st century: The needs of plant cell and tissue culture. *In*: C.E. Green, D.A. Sommers, W.P. Hackett, and D.D. Bisboer (Eds.). **Plant tissue and cell culture**. Alan R. Liss, New York.
- Collin, H.A., (1987). Determinants of yield of secondary products in plant tissue culture. *Adv. Bot. Res.*, **13**:145-187.
- Constabel, F., (1990). Medicinal plant biotechnology. *Planta Med.*, **56**:421-425.
- Deus, B., and M.H. Zenk, (1982) Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotech. Bioeng.*, **24**:1965-1974.

- Dougall, D.K., (1990). Somaclonal variation as a tool for the isolation of elite cell lines to produce secondary metabolites. In: V.M. Loyola-Vargas (Ed.). **Production of secondary metabolites from plant tissue cultures and its biotechnological perspectives**. CICY, México.
- Eilert, U., W.G.W Kurz, and F. Constabel, (1987). Alkaloid accumulation in plant cell cultures upon treatment with elicitors. In: C.E. Green, D.A. Sommers, W.P. Hackett, and D.D. Bisboer (Eds.). **Plant tissue and cell culture**. Alan R. Liss, New York.
- Flores, H.E., M.W. Hoy, and J.J. Pickard, (1987). Secondary metabolites from root cultures. *TIBTECH*, 5:64-69.
- Fowler, M.W., (1983). Commercial applications and economic aspects of mass plant cell cultures. In: S.H. Mantell, and H. Smith (Eds.). **Plant Biotechnology**. Cambridge University Press (Society for Experimental Biology, Seminar Series 18), London.
- Fujita, Y., and M. Tabata, (1987). Secondary metabolites from plant cells - pharmaceutical applications and progress in commercial production. In: C.E. Green, D.A. Sommers, W.P. Hackett, and D.D. Bisboer (Eds.). **Plant tissue and cell culture**. Alan R. Liss, New York.
- Fujita, Y., S. Takayashi, and Y. Yamada, (1985). Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agric. Biol. Chem.*, 49:1755-1759.
- Green, K.D., N.H. Thomas, and J.A. Callow, (1992). Product enhancement and recovery from transformed root cultures of *Nicotiana glauca*. *Biotech. Bioeng.*, 39:195-202.
- Hamill, J.D., A.J. Parr, M.J.C. Rhodes, R.J. Robins, and N.J. Walton, (1987). New routes to plant secondary products. *Biotechnology*, 5:800-804.
- Keen, N.T., and M. Yoshikawa, (1983). β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol.*, 71:460-465.
- Koehle, H., W. Jeblick, F. Poten, W. Blaschek, and H. Kauss, (1985). Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a Ca^{2+} -dependent process. *Plant Physiol.*, 77:544-551.

- Kurtz, W.G.W., R.T. Tyler, and I.A. Roewer, (1988). Elicitation - A method to induce metabolite production by plant cell cultures. In: G. Durand, L. Bobichon, and J. Florent (Eds.). **8th International biotechnology symposium vol. 1.** Société Française de Microbiologie, Paris.
- Larkin, P.J., and W.R. Scowcroft, (1981). Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, **60**:197-214.
- Loyola-Vargas, V.M., and M.L. Miranda-Ham, (1990). Aspects about the obtention of secondary metabolites from plant tissue culture. In: V.M. Loyola-Vargas (Ed.). **Production of secondary metabolites from plant tissue cultures and its biotechnological perspectives.** CICY, México.
- Mugnier, J., (1988). Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, **7**:9-12.
- Mukundan, U., and M.A. Hjortso, (1990). Thiophene content in normal and transformed root cultures of *Tagetes erecta*: A comparison with thiophene content in roots of intact plants. *J. Exp. Bot.*, **41**:1497-1501.
- Nelshoppen, J.M., and J.M. Widholm, (1990). Mutagenesis techniques in plant tissue cultures. In: J.W. Pollard, and J.M. Walker (Eds.). **Methods in molecular biology, vol. 6, Plant cell and Tissue Culture.** The Humana Press, New Jersey.
- Parkinson, M., T. Cotter, and P.J. Dix, (1990). Peroxidase production by cell suspension and hairy root cultures of horseradish (*Armoracia rusticana*). *Plant Sci.*, **66**:371-277.
- Phillipson, J.D., (1990). Possibilities of finding new products from plant cell cultures. In: H.J.J. Nijkamp, L.W.H. Van Der Plas, and J. Van Aartrijk (Eds.). **Current plant science and biotechnology in agriculture, vol. 9., Progress in plant cellular and molecular biology.** Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Potrykus, I., (1991). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**:205-225.
- Reichling, J., and U. Thron, (1990). Accumulation of rare phenylpropanoids in *Agrobacterium rhizogenes* transformed root cultures of *Coreopsis tinctoria*. *Planta Med.*, **56**:488-490.

- Robins, R.J., A.J. Parr, E.G. Bent, and M.J.C. Rhodes, (1991). Studies on the biosynthesis of tropane alkaloids in *Datura stramonium* L. transformed root cultures. *Planta*, **183**:183-195.
- Sings, M.W., and H.E., Flores, (1990). The biosynthetic potential of plant roots. *BioAssays*, **12**:7-13.
- Tepfer, D., (1984). Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, **37**:959-967.
- Walton, N.J., R.J. Robins, and M.J.C. Rhodes, (1988). Perturbation of alkaloid production by cadaverine in hairy root cultures of *Nicotiana rustica*. *Plant Sci.*, **54**:125-131.
- White, F.F., G. Ghidossi, M.P. Gordon, and E.W. Nester, (1982). Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA*, **79**:3193-3197.
- Wink, M., and L. Witte, (1987). Alkaloids in stem roots of *Nicotiana tabacum* and *Spartium junceum* transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Z. Naturforsch.*, **42**:69-72.
- Yonemitsu, H., K. Shimomura, M. Satake, S. Mochida, M. Tanaka, T. Endo, and A. Kaji, (1990). Lobeline production by hairy root culture of *Lobelia inflata* L. *Plant Cell Rep.*, **9**:307-310.
- Yoshikawa, T., and T. Furuya, (1987). Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, **6**:449-453.
- Yoshikawa, M., N.T. Keen, and M.C. Wang, (1983). A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. *Plant Physiol.*, **73**:497-506.
- Zähler, H., (1987). Secondary metabolism. In: P. Präve, V. Faust, W. Sittig, and D.A. Sukatsch (Eds.). **Fundamentals of biotechnology**. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

APENDICE B

Curriculum vitae

José Angel Lechuga Corchado es biólogo egresado de la Facultad de Ciencias de la UNAM en 1988. se incorporó al personal académico de la UAM Iztapalapa en mayo de 1985 y de la Facultad de Ciencias de la UNAM en mayo del 1990.

Ha asistido a 7 cursos sobre las áreas de genética molecular, fisiología vegetal y biotecnología vegetal impartidos por profesores de alto nivel, tanto en México como en el extranjero.

Cuenta con 22 participaciones en reuniones científicas a nivel nacional e internacional y ha publicado dos artículos especializados. Formó parte del Comité Organizador del I y II **Simposio Productos Naturales: Un enfoque Biotecnológico**, ambos eventos se llevan a cabo en la Ciudad de México, asimismo colaboró en la organización de las **VII Jornadas de Biotecnología** realizadas en la misma ciudad. Es coeditor del libro colectivo **Productos Naturales Volumen I. Perspectivas Biotecnológicas**, editado por la UAM Iztapalapa en 1992.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó el presente trabajo de Tesis el día 6 de abril de 1995.

Tutor:


Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesores:


Dr. Leovigildo Quijano


M. en C. María Dolores García Suárez