



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL  
(MODALIDAD TRADICIONAL)

**TESIS**

**“GENERACIÓN, CULTIVO Y ANÁLISIS PRELIMINAR DE PRINCIPIOS  
ACTIVOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE SIETE PLANTAS  
MEDICINALES DEL ESTADO DE ZACATECAS”**

Presenta

**BECKY EUNICE TORRES GARCÍA**

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
en el Área de Biotecnología Vegetal

TUTOR

**DR. EUGENIO MARTÍN PÉREZ MOLPHE-BALCH**

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

**DR. SAÚL FRAIRE VELÁZQUEZ**  
**DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES DOMÍNGUEZ**

Aguascalientes, Ags., a 05 de abril de 2018.



**M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado de la estudiante **BECKY EUNICE TORRES GARCÍA** con ID 115764 quien realizó la tesis titulada: **GENERACIÓN, CULTIVO Y ANÁLISIS PRELIMINAR DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE SIETE PLANTAS MEDICINALES DEL ESTADO DE ZACATECAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 15 de Noviembre de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Pérez Molphe Balch'.

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch  
Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS


PRESENTE

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado de la estudiante **BECKY EUNICE TORRES GARCÍA** con ID 115764 quien realizó la tesis titulada: **GENERACIÓN, CULTIVO Y ANÁLISIS PRELIMINAR DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE SIETE PLANTAS MEDICINALES DEL ESTADO DE ZACATECAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 15 de Noviembre de 2017.



Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico  
c.c.p.- Secretario Técnico



**M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado de la estudiante **BECKY EUNICE TORRES GARCÍA** con ID 115764 quien realizó la tesis titulada: **GENERACIÓN, CULTIVO Y ANÁLISIS PRELIMINAR DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE SIETE PLANTAS MEDICINALES DEL ESTADO DE ZACATECAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"  
Aguascalientes, Ags., a 15 de noviembre de 2017.



Dr. Saúl Fraire Velázquez  
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química  
c.c.p.- Consejero Académico c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

BECKY EUNICE TORRES GARCÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“GENERACIÓN, CULTIVO Y ANÁLISIS PRELIMINAR DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE SIETE PLANTAS MEDICINALES DEL ESTADO DE ZACATECAS”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 28 de marzo de 2018

*“Se lumen proferre”*

**EL DECANO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruíz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



5. Marzo. 2018

**E. PÉREZ-MOLPHE-BALCH**Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas  
Universidad Autónoma de Aguascalientes  
Av. Universidad 940. 20131. Aguascalientes, Ags., México.

PRESENTE

Por medio de este conducto me permito comunicar a usted que su artículo: "GENERACIÓN DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE LA PLANTA MEDICINAL *Bidens odorata* Cav (COMPOSITAE) Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR", teniendo como co-autores a: B.E. TORRES-GARCÍA, J.F. MORALES-DOMÍNGUEZ, y S. FRAIRE-VELÁZQUEZ, ha sido revisado por parte de nuestros árbitros y estos opinan que el trabajo está bien estructurado y es una aportación importante, por lo tanto el artículo arriba mencionado se acepta para su publicación en el Núm. 46 de POLIBOTÁNICA que saldrá en el segundo trimestre de 2018.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarte un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Rafael Fernández Nava,  
Editor en Jefe de POLIBOTÁNICA**POLIBOTÁNICA**

---

Departamento de Botánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas  
Instituto Politécnico Nacional, Apartado Postal 17-564, CP 11410, México, DF.

## ☞ AGRADECIMIENTOS ☜

A **CONACyT**, por la beca otorgada para la realización de los estudios de doctorado (registro CVU: 264790).

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes**, por el apoyo financiero para la compra de reactivos, materiales, etc. mediante el proyecto PIBT15-2 a cargo de la M. en C. Ma. de Lourdes de la Rosa Carrillo; así como de las instalaciones.

Al **Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch**, por todo el conocimiento brindado, por su dedicación y por todo el apoyo para la realización del presente proyecto.

Al **Dr. José Francisco Morales Domínguez**, por todos sus consejos, y por la disponibilidad que siempre mostró para ayudarme en la parte práctica y en las revisiones de los escritos derivados del proyecto.

Al **Dr. Saúl Fraire Velázquez**, por la donación de dos de las tres bacterias empleadas en el proyecto, así como por todos sus consejos, su conocimiento compartido y su gran apoyo.

A la **Ing. Martha Elvia**, porque gracias a toda la ayuda brindada en el laboratorio, fue posible la realización del proyecto. Gracias por compartirme sus conocimientos, por su dedicación, paciencia y su amistad

A **Isaac**, por apoyarme en el cuidado de las plantas aclimatadas en el invernadero, y por su amistad.

A la **Dra. Angélica Hernández Quintero**, por los conocimientos compartidos para la realización de la parte estadística del proyecto.

A **Alejandra, Shantal y Adilene**, por brindarme su sincera amistad, su alegría, su apoyo, haciendo que tanto el cambio de residencia como el trabajo en la Universidad fueran más ligeros y agradables. Siempre estarán en mi corazón. Gracias por todo, chicas.

A los **compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal**, por compartirme su tiempo, sus consejos y su alegría.

A **toda mi familia**, Noé, Ari, Fani, mis papás, mis suegros, Maru y Javier, por toda su inigualable ayuda, su apoyo incondicional, por su paciencia, sus consejos y su gran amor, y por creer y confiar siempre en mí.

**☞ DEDICATORIAS ☜****A mi Cielo**

No hay suficientes palabras para agradecerte por cada uno de los momentos que hemos pasado juntos. Eres el oxígeno que me hace respirar día con día. Gracias por tu amor incondicional, por estar ahí siempre que lo necesito. Gracias por ser mi amigo y compañero en esta vida, por ser el gran pilar de nuestra hermosa familia. Gracias por creer en mí siempre y por amarme siempre. TE AMO... por toda una eternidad...

**A Ari y Fani**

Mis pequeñas, lindas y hermosas princesas, por su comprensión y gran amor que me demuestran día con día. Por todas sus enseñanzas, su alegría y sus apapachos. Gracias por ser mi fortaleza.

**A mi papi Milo y a mi mami Bety**

Por el apoyo que en todo momento me brindan. Gracias por ser el mejor ejemplo de superación, por todo su amor y sus consejos, y por creer en mí siempre.

**A mis suegros Chuy y Francisco**

Por el apoyo que siempre me han brindado, su confianza y bendiciones.

**A Dios**

Gracias, mil gracias por todo.



## INDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>12</b>
2.1. Medicina Tradicional .....	12
2.2. Medicina Tradicional en México .....	14
2.3. Importancia del estudio de las plantas medicinales .....	15
2.4. Biotecnología aplicada al estudio de plantas medicinales .....	16
2.5. Generación de raíces transformadas mediante <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	18
2.5.1. Clasificación de la especie <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	18
2.5.2. Proceso de transformación genética mediante <i>A. rhizogenes</i> .....	20
2.5.3. Características de las raíces transformadas .....	25
2.5.4. Obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces transformadas .....	26
2.5.5. Cepas de interés .....	27
2.6. Fitoquímicos de interés .....	31
2.7. Plantas medicinales de interés de la región de Zacatecas .....	40
2.7.1. <i>Bidens odorata</i> Cav. ....	41
2.7.2. <i>Chenopodium album</i> L. ....	43
2.7.3. <i>Chenopodium graveolens</i> Lag. ....	45
2.7.4. <i>Cucurbita foetidissima</i> H. B. Kunth. ....	47
2.7.5. <i>Eysenhardtia polystachya</i> (Ortega) Sarg. ....	50
2.7.6. <i>Jatropha dioica</i> Sessé ex. Cerv. ....	53
2.7.7. <i>Lepidium virginicum</i> L. ....	56
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>61</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>61</b>
5.1. Objetivo general .....	61
5.2. Objetivos específicos .....	61
5.3. Metas .....	62
<b>6. METODOLOGÍA .....</b>	<b>63</b>

6.1.	Material vegetal .....	64
6.2.	Obtención de plantas axénicas .....	64
6.2.1.	Pruebas de desinfección y germinación de semillas .....	64
6.2.2.	Cultivo de semillas en condiciones axénicas .....	65
6.3.	Micropropagación de plantas axénicas.....	65
6.4.	Cepas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	67
6.4.1.	Cultivo de cepas bacterianas en medio líquido.....	67
6.4.2.	Inserción del vector pCAMBIA en cepa ARqua1.....	68
6.4.3.	Detección de genes de interés en cepas bacterianas .....	69
6.5.	Transformación genética mediada por cepas de <i>A. rhizogenes</i> .....	70
6.6.	Detección de genes de interés en raíces presuntamente transformadas.....	72
6.7.	Establecimiento de cultivos de raíces transformadas y cuantificación de biomasa .....	73
6.8.	Análisis preliminar de principios activos de raíces transformadas...	75
6.8.1.	Preparación del extracto del material vegetal .....	75
6.8.2.	Análisis preliminar mediante TLC .....	75
6.9.	Análisis estadístico de resultados.....	78
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>79</b>
7.1.	Obtención de plantas axénicas .....	79
7.1.1.	Selección de plantas y obtención de semillas.....	79
7.1.2.	Pruebas de desinfección y germinación de semillas .....	80
7.1.3.	Obtención de plantas axénicas .....	82
7.2.	Micropropagación de plantas axénicas mediante yemas axilares....	82
7.3.	Detección de genes de interés en cepas bacterianas .....	91
7.4.	Transformación genética mediada por cepas de <i>A. rhizogenes</i> .....	92
7.5.	Establecimiento de cultivos de raíces transformadas y cuantificación de biomasa .....	108
7.6.	Análisis fitoquímico preliminar de raíces transformadas.....	111
7.6.1.	Aceites esenciales.....	116
7.6.2.	Alcaloides .....	117
7.6.3.	Derivados del antraceno .....	120

7.6.4. Flavonoides .....121

7.6.5. Glicósidos de terpenos dulces (glicósidos de diterpeno y triterpeno) y esteroides .....123

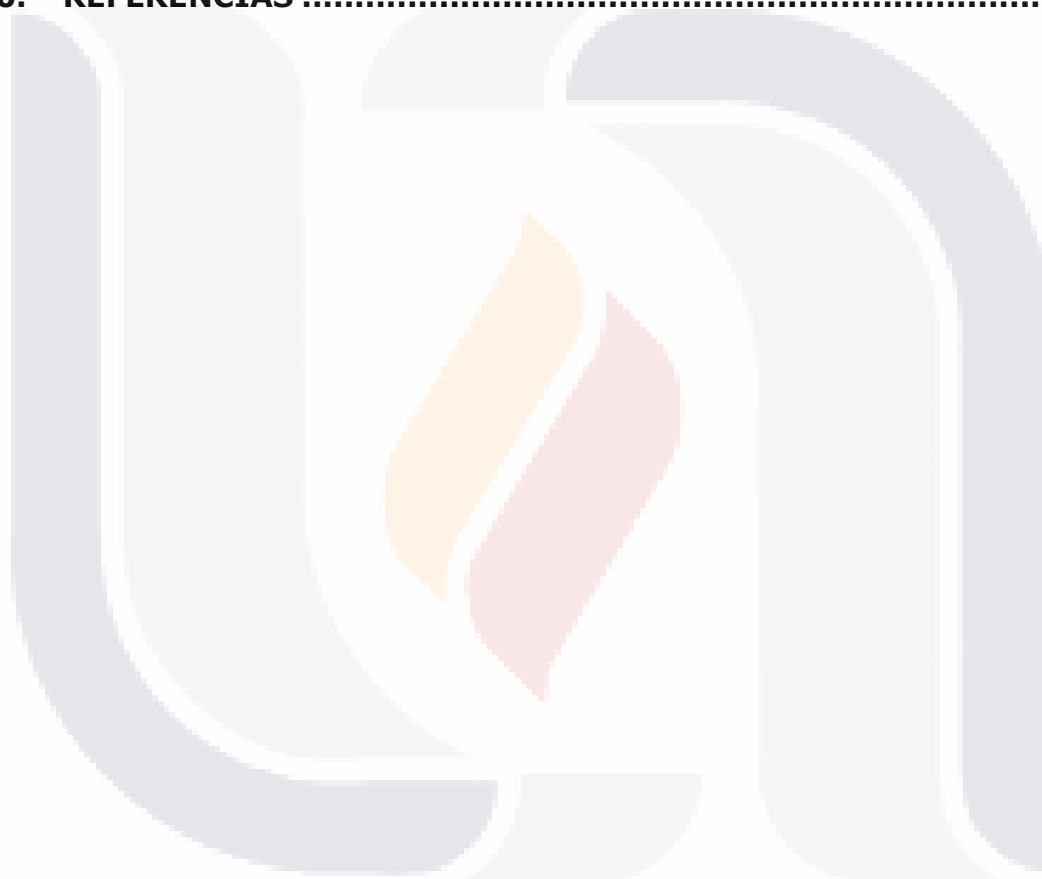
7.6.6. Saponinas .....124

7.6.7. Triterpenos .....126

**8. CONCLUSIONES ..... 130**

**9. GLOSARIO..... 132**

**10. REFERENCIAS ..... 135**



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de plantas transformadas con la cepa K599.....	29
Tabla 2. Metabolitos secundarios obtenidos a partir de raíces transformadas con la cepa A4. ....	30
Tabla 3. Especies de plantas transformadas con la cepa ARqua1. ....	31
Tabla 4. Registro de colecta de semillas de las especies medicinales.....	80
Tabla 5. Resultados de la germinación de las especies de plantas medicinales .....	82
Tabla 6. Resultados de la micropropagación de las especies de plantas medicinales. ....	83
Tabla 7. Porcentajes de transformación de las especies de plantas obtenidas mediante la inducción con las cepas bacterianas A4/pESC4, ARqua1 y K599. 93	
Tabla 8. Raíces transformadas de <i>Bidens odorata</i> obtenidas de la transformación con <i>Agrobacterium rhizogenes</i> . ....	94
Tabla 9. Ensayo histoquímico para la detección del producto de la $\beta$ -glucuronidasa en cultivos de raíces crecidas de <i>Bidens odorata</i> a partir de la infección con A4/pESC4. ....	97
Tabla 10. Raíces presuntamente transformadas de <i>Chenopodium album</i> inducidas mediante cepas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	102
Tabla 11. Raíces presuntamente transformadas de <i>Cucurbita foetidissima</i> inducidas mediante cepas de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	106

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del plásmido Ri de <i>A. rhizogenes</i> .....	20
Figura 2. Mapa del plásmido para pRi2659 y la región T-DNA .....	28
Figura 3. Algunos alcaloides de importancia.....	32
Figura 4. Esquema general de la ruta del shikimato.....	32
Figura 5. Flavonoides.....	34
Figura 6. El isopreno.....	35
Figura 7. Monoterpenos .....	36
Figura 8. Artemisina .....	36
Figura 9. GGPP y Paclitaxel.....	37
Figura 10. Esteroles.....	38
Figura 11. Ginsenosido .....	39
Figura 12. Molécula de $\beta$ -caroteno.....	40
Figura 13. <i>Bidens odorata</i> Cav. ....	42
Figura 14. <i>Chenopodium album</i> L. ....	44
Figura 15. <i>Chenopodium graveolens</i> Lag. ....	46
Figura 16. Ascaridol.....	47
Figura 17. <i>Cucurbita foetidissima</i> H. B. Kunth. ....	48
Figura 18. Foetidisimósido B. ....	49
Figura 19. <i>Eysenhardtia polystachya</i> (Ortega) Sarg. ....	51
Figura 20. Fitoquímicos de interés encontrados en <i>E. polystachya</i> .....	52
Figura 21. <i>Jatropha dioica</i> Sessé ex. Cerv. ....	54
Figura 22. Algunos fitoquímicos de <i>J. dioica</i> .....	55
Figura 23. <i>Lepidium virginicum</i> L.....	57
Figura 24. Bencil glucosinolato.....	57
Figura 25. Obtención de explantes para transformación genética y micropropagación.....	66
Figura 26. Plantas medicinales seleccionadas.....	79
Figura 27. Semillas de <i>B. odorata</i> .....	80
Figura 28. Germinación <i>in vitro</i> de semillas. ....	81
Figura 29. Micropropagación de <i>Bidens odorata</i> en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L <sup>-1</sup> . ....	84
Figura 30. Plantas de <i>Bidens odorata</i> crecidas a partir del cultivo de brotes en medio MS semisólido con ácido indol butírico (AIB, 0.5 mg L <sup>-1</sup> ). ....	85
Figura 31. Plantas de <i>Bidens odorata</i> en invernadero.....	86
Figura 32. Micropropagación de <i>Chenopodium album</i> en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L <sup>-1</sup> . ....	86
Figura 33. Plantas de <i>Chenopodium album</i> crecidas a partir del cultivo de brotes en medio MS semisólido con ácido indol butírico (AIB, 0.5 mg L <sup>-1</sup> ). ....	87

Figura 34. Micropropagación de *Chenopodium graveolens* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. ..... 88

Figura 35. Micropropagación de *Cucurbita foetidissima* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. ..... 89

Figura 36. Plantas de *Cucurbita foetidissima* crecidas a partir del cultivo de brotes en medio MS con ácido indol butírico (AIB, 0.5 mg L<sup>-1</sup>). ..... 89

Figura 37. Micropropagación de *Eysenhardtia polystachya* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. ..... 90

Figura 38. Micropropagación de *Jatropha dioica* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. ..... 91

Figura 39. Micropropagación de *Lepidium virginicum* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. ..... 91

Figura 40. Productos de amplificación obtenidos por PCR empleando los cebadores para la detección de los genes *rolB*, *gus*, *nptII* y *virD1* en cepas bacterianas ..... 92

Figura 41. Raíces presuntamente transformadas de *Bidens odorata* generadas mediante la cepa A4/pESC4. .... 96

Figura 42. Expresión fenotípica del producto de la β-glucuronidasa en raíces pilosas de *Bidens odorata* a partir de la infección con A4/pESC4. .... 97

Figura 43. Amplificación por PCR del gen *rolB*, *gus*, *nptII* y *virD1* usando ADN de raíces transformadas de *Bidens odorata* crecidas mediante A4/pESC4. .... 99

Figura 44. Necrosamiento de raíces crecidas a partir de la infección con A4/pESC4. .... 100

Figura 45. Cultivos de raíces transformadas. .... 100

Figura 46. Cultivos de raíces presuntamente transformadas de *Bidens odorata* a partir de la inducción con la cepa Arqua1. .... 101

Figura 47. Transformación de *Bidens odorata* mediante la cepa K599 en co-cultivo de 48 h. Fotos tomadas a los 21 días de inducción. .... 102

Figura 48. Raíces presuntamente transformadas de *Chenopodium album* generadas mediante la cepa *A. rhizogenes* A4/pESC4 con la densidad bacteriana de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. .... 103

Figura 49. Expresión fenotípica del producto de la β-glucuronidasa y amplificación del gen *rolB* en raíces presuntamente transformadas de *Chenopodium album* con la cepa A4/pESC4. .... 104

Figura 50. Raíces presuntamente transformadas de *Chenopodium album* generadas mediante cepas de *Agrobacterium rhizogenes*. .... 105

Figura 51. Raíces presuntamente transformadas de *Cucurbita foetidissima* generadas mediante la cepa A4/pESC4. .... 106

Figura 52. Transformación inducida a explantes de *Cucurbita foetidissima* mediante cepas de *Agrobacterium rhizogenes* a la densidad bacteriana de 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. .... 107

Figura 53. Cinéticas de crecimiento de raíces transformadas de *Bidens odorata* provenientes de diferentes cepas bacterianas .....109

Figura 54. Cinética de crecimiento de raíces transformadas de *B. odorata* con A4/pESC4, con cambios de cultivo fresco. ....109

Figura 55. Cinéticas de crecimiento de raíces transformadas de *Bidens odorata* provenientes de la inducción con A4/pESC4 en diferentes medios de cultivo 111

Figura 56. TLC para la detección de aceites esenciales en extractos hexánicos de *Bidens odorata* .....116

Figura 57. TLC para la detección de aceites esenciales en extractos hexánicos de *Bidens odorata* .....117

Figura 58. TLC para la detección de alcaloides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*.....118

Figura 59. TLC para la detección de alcaloides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*.....119

Figura 60. TLC para la detección de derivados del antraceno en extractos metanólicos de *Bidens odorata* .....120

Figura 61. TLC para la detección de derivados del antraceno en extractos metanólicos de *Bidens odorata* .....121

Figura 62. TLC para la detección de flavonoides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*.....122

Figura 63. TLC para la detección de flavonoides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*.....122

Figura 64. TLC para la detección de glicósidos de diterpenos, triterpenos y esteroides en extractos acuosos de *Bidens odorata* .....123

Figura 65. TLC para la detección de glicósidos de diterpenos, triterpenos y esteroides en extractos acuosos de *Bidens odorata* .....124

Figura 66. TLC para la detección de saponinas en extractos etanólicos de *Bidens odorata*.....125

## ACRÓNIMOS

**2IP.** N6-(2-isopentil)-adenina.

**% Rf.** Factor de retención en porcentaje.

**AIB.** Ácido indol butírico.

**ANOVA.** Análisis de varianza.

**B5.** Medio de cultivo Gamborg.

**BA.** N<sup>6</sup>-benciladenina.

**CTAB.** Método del bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

**FGI.** Índice de crecimiento en fresco.

**H.** Hoja de planta no transformada.

**LB.** Medio de cultivo Luria Bertani.

**MPM.** Marcador de peso molecular.

**MS.** Medio de cultivo Murashine-Skoog.

**MT.** Meta-Topolina.

**MET.** Medicina tradicional.

**PC.** Planta completa sin transformar.

**PCR.** Reacción de la polimerasa en cadena.

**R.** Raíces no transformadas.

**RCV.** Regulador de crecimiento vegetal.

**RI.** Región internodal (tallo).

**RT.** Raíces transformadas.

**STET.** Solución de Tris HCl 1M pH 8.0, NaCl 2.5M, EDTA 0.5 M pH 8.0 y Tritón X-100 5% p/v.

**T.** Tallo de planta sin transformar.

**TAE.** Solución buffer de Tris-acetato-EDTA.

**TE.** Solución buffer de Tris-EDTA.

**TLC.** Cromatografía en capa fina.

**UFC.** Unidad formadora de colonia.

**YMB.** Caldo extracto de levadura y extracto de malta.



## RESUMEN

### GENERACIÓN, CULTIVO Y ANÁLISIS PRELIMINAR DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE SIETE PLANTAS MEDICINALES DEL ESTADO DE ZACATECAS

Se estudiaron siete plantas medicinales del estado de Zacatecas con respecto a su capacidad para producir raíces pilosas y metabolitos secundarios. Las plantas fueron *Bidens odorata* Cav., *Chenopodium album*, *Chenopodium graveolens* Lag., *Cucurbita foetidissima* H. B. Kunth, *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg., *Jatropha dioica* Sessé ex. Cerv., and *Lepidium virginicum*. Se obtuvieron plantas axénicas a partir de semillas cultivadas en medio MS. Las plantas se micropropagaron en medio MS con N<sup>6</sup>-benciladenina, N<sup>6</sup>-(2-isopentil)-adenina y meta-Topolina a 1 mg·L<sup>-1</sup>. Para la transformación genética se emplearon las cepas bacterianas A4 (tipo agropina, con el vector binario pESC4); Arqua1 (tipo agropina, C58C1:pRiA4-24B); y K599 (tipo cucumopina, pRi2659, a densidades de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> y 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, 48 y 72 h de co-cultivo bacteriano, y regiones internodales y hojas como explantes. La comprobación de la transformación se llevó a cabo mediante la amplificación de los genes *rolB*, *nptII* y *gus* para las raíces de la infección con A4, e histoquímicamente mediante la detección de la actividad de GUS; mientras que se detectó solo *rolB* para las raíces surgidas de las cepas Arqua1 y K599. Se hizo el estudio preliminar de los fitoquímicos aceites esenciales, alcaloides, derivados del antraceno, flavonoides, glicósidos de diterpenos dulces y esteroides, saponinas y triterpenos, empleando TLC.

*Bidens odorata* Cav. con la cepa A4 fue la única especie cuyas raíces crecieron de forma indefinida. El estudio preliminar fitoquímico de sus extractos reveló la gran capacidad que tienen estos cultivos de sintetizar metabolitos que se encuentran tanto en raíz como en la parte aérea de la planta.

Se concluye que los cultivos de raíces pilosas de *B. odorata* pueden considerarse una opción viable para la obtención de metabolitos de interés farmacológico, con un crecimiento estable, fácil manejo, adaptación y tiempo de duplicación relativamente corto.

**Palabras clave:** *Agrobacterium rhizogenes*, metabolitos secundarios, raíces transformadas, TLC.

## ABSTRACT

### GENERATION, CULTURE AND PRELIMINARY ANALYSIS OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN HAIRY ROOTS OF SEVEN MEDICINAL PLANTS IN ZACATECAS, MEXICO

It had been studied seven medicinal plants of Zacatecas, México regarded to their capacity to produce hairy roots and secondary metabolites. The plants were *Bidens odorata* Cav., *Chenopodium album*, *Chenopodium graveolens* Lag., *Cucurbita foetidissima* H. B. Kunth, *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg., *Jatropha dioica* Sessé ex. Cerv., and *Lepidium virginicum*. Axenic plants were obtained from disinfected seeds cultivated on MS medium. To obtain enough plant material, plants were micropropagated in MS medium supplemented with N<sup>6</sup>-benzyladenine, N<sup>6</sup>-(2-isopentyl)-adenine and meta-Topoline at 1 mg L<sup>-1</sup>. For genetic transformation agropine type bacterial strains A4 (with pESC4 binary vector) and Arqua1(C58C1: pRiA4-24B), and cucumopine type K599 (pRi2659) were used, at concentrations of 10<sup>7</sup> CFU mL<sup>-1</sup> and 10<sup>9</sup> CFU mL<sup>-1</sup>, 48 and 72 h of bacterial co-culture, and internodal segments and leaves as explants. Transformation testing was carried out by amplification of the *rolB*, *nptII* and *gus* genes for the roots from the A4 infection, and histochemically by GUS activity detection; while it was detected only *rolB* for the roots arisen of the strains Arqua1 and K599. Preliminary study of the phytochemicals essential oils, alkaloids, anthracene derivatives, flavonoids, sweet diterpene glycosides and steroids, saponins and triterpenes, was done using TLC.

*Bidens odorata* Cav. with strain A4 was the only species whose roots grew indefinitely. The preliminary phytochemical study of hair root extracts revealed the great ability of this cultures to synthesize metabolites found in both root and aerial parts of the plant.

It is concluded that hairy root cultures of *B. odorata* can be considered a viable option for obtaining metabolites of pharmacological interest, with stable growth, easy handling, adaptation and relatively short doubling time.

**Key Words:** *Agrobacterium rhizogenes*, secondary metabolites, TLC, transformed roots.

## 1. INTRODUCCIÓN

La presente investigación trata sobre el estudio de la susceptibilidad a transformación genética mediante *Agrobacterium rhizogenes* de siete plantas silvestres, con propiedades medicinales, empleadas en el Estado de Zacatecas para el tratamiento de afecciones tales como diarrea, enfermedades renales y de estómago, enfermedades parasitarias y hepáticas, entre otras. De igual forma se analiza la capacidad de producir los principios activos que les confieren las propiedades medicinales a las especies en los cultivos de raíces transformadas originados de la infección, incluyendo su comparación con las plantas crecidas *ex vitro*, mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Utilizar *Agrobacterium rhizogenes* para obtener raíces transformadas, es muy útil biotecnológicamente, para la obtención de fitoquímicos de interés debido, entre otras cosas, a la gran cantidad de biomasa y de metabolitos que se pueden obtener de los cultivos de raíces transformadas que se generan. De esta forma, el establecimiento de estos cultivos favorece la producción permanente de los metabolitos de interés.

El objetivo fue generar mediante *A. rhizogenes* y cultivar *in vitro* raíces transformadas de siete especies de plantas de uso medicinal del Estado de Zacatecas, y determinar si estos cultivos tienen la capacidad de producir los principios activos que les confieren sus propiedades.

El trabajo se dividió, de acuerdo con los objetivos específicos, en cuatro etapas: 1) Establecimiento y propagación *in vitro* de las especies medicinales, donde se incluyó la selección, colecta y especiación de las plantas medicinales de interés; 2) determinación de la susceptibilidad de las plantas a transformación genética mediante *A. rhizogenes*, empleando dos tipos de explantes, tres cepas bacterianas y dos tiempos de cocultivo bacteriano; 3) establecimiento de cultivos *in vitro* de raíces transformadas para la generación de biomasa; y 4) análisis preliminar de principios activos de interés en los cultivos de raíces transformadas, y la comparación de su perfil con las plantas creciendo *ex vitro*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Medicina Tradicional

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la Medicina Tradicional (MET) como “prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades” (Kerr 2002).

Los conocimientos aplicados son transmitidos generalmente de forma oral, de generaciones pasadas, y suelen utilizarse en círculos culturales bien definidos, como las comunidades indígenas y las rurales. Aunque hay que señalar que también existen conocimientos recientes como resultado de experimentaciones y de observaciones, que se han unido a la MET. Su aplicación varía y puede permanecer sólo en la región donde se da o incluso en otros países. Ejemplo de esto son la medicina tradicional China, el ayurveda, la medicina unani y tibetana, la mongola, tailandesa kampo y coreana, que se aplican en otros países (Correa 2002).

El uso de la MET, lejos de disminuir, ha ido en aumento, como lo demuestran las cifras de Estados Unidos, donde la demanda ha alcanzado un valor de 60 mil millones de dólares, con un crecimiento anual de entre 5 y 15% (Correa 2002). El empleo de la MET cubre las grandes necesidades de salud que existen en poblaciones limitadas por factores económicos y culturales, esto es, en los países considerados pobres o en vías de desarrollo. La OMS estima que arriba del 80% de la población en todo el mundo recurre a remedios tradicionales principalmente aquellos a base de plantas (Chandra *et al.* 2013).

Como una medida para garantizar mejores tratamientos y una mayor accesibilidad a los mismos por parte de la población en general, actualmente existen países que han establecido políticas para incorporar la MET a los sistemas nacionales de salud, para regular y fomentar el acceso a ésta, tal es el caso de Kenya donde, entre otras cosas, se han establecido registros de los curanderos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y herbalistas, con la información de las plantas que emplean para tal o cual padecimiento, métodos de preparación, cómo las administran, entre otras cosas, hasta la incorporación de esos conocimientos a la medicina moderna (Correa 2002).

Además de esto, se tienen registros de diversas sustancias que se encuentran de manera natural y que son empleadas como ingredientes en medicamentos tradicionales, los cuales son potencialmente tóxicos, carcinogénicos y teratogénicos. Muchas de las veces, las hierbas son vendidas como suplementos dietarios, con reglamentaciones menos estrictas para su uso. Por lo mismo se hace necesaria la realización de estudios clínicos estandarizados así como la elaboración de formulaciones adecuadas y seguras (Correa 2002).

Es importante también mencionar que las plantas crecidas en medios silvestres son aquellas que más se emplean en la MT e incluso por la industria de la medicina herbaria. África, por ejemplo, que depende en gran medida de la MET, usa las plantas silvestres, causando graves problemas de deforestación (tasa anual del 0.7% equivalentes a 3.7 millones de hectáreas forestales). Las especies de *Prunus africana* y *Pausinystalia yohimbe* se extraen de forma insostenible y destructiva para satisfacer el mercado internacional. Por otro lado, la industria herbaria en Asia, como parte de la solución a este problema, está haciendo uso del cultivo de las plantas medicinales (Correa 2002).

Se hace necesario entonces la adquisición de nuevas legislaciones en materia del uso de las plantas medicinales. Su promoción debe hacerse de manera responsable, que incluya la exploración de plantas medicinales con potencial, la capacitación de las personas que hacen uso de ellas, su habilitación y el registro de las mismas (Correa 2002). La OMS, atendiendo a lo anterior, define en general tres retos para hacer de la MET una propuesta para la satisfacción de las necesidades sanitarias de la población de los países en vías de desarrollo:

- 1) Tener como objetivo las enfermedades de mayor importancia de las poblaciones y determinar los niveles de acceso con los que se cuentan, tanto económicos como geográficos;

- 2) Se deben proteger los recursos naturales a los que se accederá para evitar la sobreexplotación de los mismos; y
- 3) Los conocimientos que se generarán del estudio de la MET, sus beneficios y los derechos de autor (Kerr 2002).

Aunado a lo anterior, se deben cubrir necesidades como el uso racional de los recursos, información confiable de los productos a emplear, sustentada en investigaciones científicas que avalen su uso y puedan servir de guía para la población; reducir el riesgo al utilizar medicinas a base de hierbas, informando a la población el momento más adecuado para su empleo mediante programas de educación y extensión comunitaria; desarrollar una mayor interacción con la medicina moderna; establecer políticas que incluyan la conservación y el uso sostenible de las plantas medicinales; y en general, controlar, evaluar y asegurar la calidad de los productos herbolarios (Correa 2002; Kerr 2002).

## **2.2. Medicina Tradicional en México**

En México, la MET proviene del desarrollo y de la unión de las culturas prehispánica y española, y el conocimiento se ha ido acumulando al pasar de los años. La herbolaria prehispánica ha sido citada en muchas obras, donde se describe el uso medicinal y la clasificación botánica que se les daba a las plantas. Pese a ello, es hasta el pasado siglo, cuando se comienza a intensificar nuevamente el estudio de la herbolaria mexicana (Heinrich *et al.* 1998; Olivas Sánchez 1999).

Hoy en día, su práctica es una realidad para más de 40 millones de mexicanos que no tienen acceso a los diferentes centros de salud, en los cuales se destacan los diferentes grupos étnicos que hacen uso de ella para tratar sus diferentes padecimientos, empleando de manera más abundante a las plantas (Heinrich *et al.* 1998).

En un estudio realizado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (1982), en el estado de Chiapas, se encontraron 53 padecimientos tratados con MT basada en plantas (Lozoya & Zolla 1983), número que sugiere un amplio uso

entre la población; en el Estado de México se tienen reportes de 110 plantas empleadas solo para tratar enfermedades gastrointestinales (Osuna Torres *et al.* 2005); en Chihuahua se encontró que la mayoría de las plantas medicinales son empleadas para tratar problemas digestivos, respiratorios, renales, del aparato reproductor femenino, para disminuir la temperatura, lavar heridas y para el tratamiento de la diabetes, con plantas pertenecientes a las familias *Asteracea*, *Poaceae*, *Chenopodiaceae*, *Ericaceae*, *Labiata*, *Malvaceae*, *Poligonaceae* y *Solanaceae* (Olivas Sánchez 1999).

### **2.3. Importancia del estudio de las plantas medicinales**

Es conocido por todos que cada región del mundo tiene una diversidad propia de plantas medicinales y que muchas de ellas son compartidas en varias partes del mundo. Se estima que en México existen entre 3 mil y 5 mil plantas con potencial medicinal, donde 3 mil de ellas son empleadas por diferentes grupos étnicos en el país. Desafortunadamente, solo el 1% de ellas han sido estudiadas a profundidad (González Stuart 2010). En un estudio llevado a cabo por un grupo de investigadores de Suiza y Alemania, acerca de las plantas medicinales empleadas en México, encontraron que éstas generalmente difieren dependiendo del grupo étnico estudiado, y que su empleo se debe principalmente a la falta de accesibilidad de estos grupos a la medicina alopática (Heinrich *et al.* 1998).

Las terapias tradicionales con plantas medicinales involucran el uso de extractos de las plantas o de sus principios activos. Por ejemplo, en Estados Unidos, el 25% de las prescripciones hechas por los farmacéuticos de 1959 a 1980 contemplaron extractos de plantas o principios activos preparados de plantas superiores. Por otro lado, China y Japón han estado trabajando en la obtención de principio activos a partir de plantas medicinales. Esto último es uno de los objetivos por los que algunos gobiernos, instituciones de investigación y empresas privadas están trabajando en conjunto. Es de destacarse los casos de Merck y el Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), de Costa Rica, así como

la empresa brasileña Extracta y Glaxo-Wellcome, esta última con el objetivo de investigar compuestos naturales para su uso como antibióticos y para el tratamiento de enfermedades tropicales, como el dengue. De esta manera, la importancia de las plantas medicinales no solo radica en su empleo mediante infusiones u otras técnicas que las emplean de forma directa, sino en la obtención de los principios activos para su uso como medicamentos (Farnsworth *et al.* 1985; Correa 2002).

Grupos de trabajo en diferentes partes del mundo están estudiando diferentes aspectos de las plantas medicinales y de su uso. Por ejemplo, La India, en 1982, inició un proyecto multidisciplinario de investigación llamado *All India Coordinated Research Project on Ethnobiology* (AICRPE) que duró 16 años, donde realizó estudios profundos acerca de la vida, cultura, tradición y el sistema de conocimientos de las comunidades tribales de la India. Esta investigación arrojó 10 mil plantas silvestres utilizadas por dichas comunidades para cubrir sus diferentes necesidades. En la República Democrática Popular Lao, el *Tradicional Medicines Resources Centre* (TRMC) trabaja con curanderos locales para obtener información sobre la MT que emplean con el fin de promover el intercambio de conocimientos; en los Emiratos Árabes Unidos, el *Zayed Complex for Herbal Research & Tradicional Medicine* (ZCHRMT) se creó con el fin de realizar investigaciones herbarias y en MT; e Irán ha clasificado 2,500 plantas de un total de 8 mil, con respaldo del gobierno (Correa 2002).

#### **2.4. Biotecnología aplicada al estudio de plantas medicinales**

La importancia de emplear herramientas biotecnológicas para el estudio de las plantas medicinales tiene varios objetivos. Es sabido que el uso irracional de recursos naturales en una zona dada tiende a poner en peligro los mismos e incluso, puede llevarlos a su extinción. Por ejemplo, en México de las plantas medicinales más usadas el 99% son silvestres, anuales o perennes (Osuna Torres *et al.* 2005); en la India y en China toman el 90% y el 80%



respectivamente, también de fuentes no cultivadas. Un dato alarmante lo arrojan los Apéndices de la CITES (Convención del Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora silvestres), donde aparecen alrededor de 200 plantas medicinales (Correa 2002).

En base a un estudio hecho a diversas plantas medicinales que se emplean para tratar trastornos gastrointestinales en la región del Estado de México, se sugirieron varias estrategias a seguir, teniendo como objetivo principal la producción de fitomedicamentos formulados a partir de extractos vegetales estandarizados y debidamente regularizados, basados en un perfil completo previo, con estudios preclínicos y clínicos. En el mismo estudio también se proyecta la posible formulación de proyectos de micropropagación de especies de lenta propagación y/o en peligro de extinción, así como la producción de líneas celulares hiperproductoras de metabolitos de interés (Osuna Torres *et al.* 2005). Además, en el estudio se plantean otras estrategias que coinciden en gran medida con las que la OMS propone para el estudio de la MET.

Por otro lado, a finales del siglo pasado, la industria farmacéutica obtenía los principios activos a partir de orígenes vegetales, como extractos, jarabes, tinturas, pomadas y emplastos. Desafortunadamente, estos principios activos se encuentran regularmente en poca cantidad, debido a que pueden encontrarse en solo ciertos tipos de células, órganos o en compartimentos celulares; además pueden ser elaborados por la planta durante ciertos periodos del desarrollo o bajo ciertas condiciones de estrés. Aunado a esto, estaba la necesidad cada vez más imperiosa de medicamentos por la creciente población. Por lo mismo, la industria se vio en la necesidad de recurrir a la síntesis de dichos principios. Estados Unidos, por ejemplo, en los años 80, utilizó la síntesis orgánica para el 75% de sus medicamentos (Olivas Sánchez 1999; Itkin & Aharoni 2009).

## **2.5. Generación de raíces transformadas mediante *Agrobacterium rhizogenes***

### **2.5.1. Clasificación de la especie *Agrobacterium rhizogenes***

El género *Agrobacterium* fue descrito por primera vez por Conn en 1942 para describir a las bacterias que causaban las enfermedades de las agallas y de las raíces pilosas. Por otro lado, está el género *Rhizobium*, descrito por primera vez por Frank en 1889, para referirse a las bacterias fijadoras de nitrógeno que vivían formando nódulos en las raíces de las plantas. Recientes estudios del DNA de ambos géneros sugieren que éstos probablemente no deberían ser considerados diferentes. Sin embargo, debido al amplio uso que se le ha dado al género *Agrobacterium*, el nombre de *Rhizobium* para ambos no ha sido aceptado del todo. En el año 2011, el subcomité sobre la taxonomía de *Agrobacterium* y *Rhizobium* del *International Committee on Systematics of Prokaryotes* (ICSP) propuso que las agrobacterias se dividieran en dos géneros: *Agrobacterium* y *Rhizobium*. Con esta nomenclatura, *A. rhizogenes* sería *Rhizobium rhizogenes*, mientras que las otras bacterias se agruparían en el género *Agrobacterium*, definido ahora como un taxón monofilético. El género *Agrobacterium* incluirá entonces a las especies del biotipo 1 y otras como *A. vitis* y *A. rubi*. En este género estará incluido el *A. tumefaciens*. Hoy en día, ambos nombres son empleados y los diferentes investigadores no se han puesto de acuerdo del todo respecto a esto (Shams *et al.* 2013; Weir 2013).

En el presente trabajo se empleará el nombre de *Agrobacterium rhizogenes* por cuestiones de familiaridad entre los investigadores de las diferentes instituciones y su relación con las publicaciones existentes.

La especie *Agrobacterium rhizogenes* es una bacteria gram negativa, aerobia obligada que se encuentra en suelo, capaz de vivir en forma saprófita o como parásito; es responsable de la enfermedad de raíces pilosas en plantas dicotiledóneas. En condiciones de laboratorio se han encontrado más de 450 diferentes especies de plantas, que incluyen monocotiledóneas, dicotiledóneas y

algunas gimnospermas, susceptibles a ser infectadas por esta bacteria (Winans 1992; Veena & Taylor 2007).

En un principio, las cepas de *Agrobacterium* se clasificaron de acuerdo a la sintomatología que presentaban en sus hospedadores. Más tarde, la clasificación se basó en sus diferencias metabólicas y fisiológicas (homología DNA-DNA, secuencias ribosomales 16S, utilización de la cetolactosa y tipos de opinas producidas). Al parecer el estudio de las secuencias del RNA ribosomal (rRNA) ha sido el más apropiado. Este dio lugar a la clasificación en tres biotipos. El **biovar 1**, representado por la cepa de *A. tumefaciens* C58 el cual posee un cromosoma circular grande y uno lineal también grande, y en un momento dado con plásmidos asociados a inducción de tumores (Ti) y ayudadores (helper); el **biovar 2**, representado por la cepa de *A. radiobacter* K84, con un cromosoma principal pequeño, de una sola hebra, y en un momento dado con un mega plásmido (2.65 Mb) y varios plásmidos más pequeños; y el **biovar 3**, representado por la cepa de *A. vitis* S4, el cual tiene dos cromosomas circulares grandes y arriba de cinco plásmidos adicionales más pequeños. Las cepas de *A. rhizogenes* pueden estar incluidos dentro del biovar 1 ó 2, ya que se caracterizan por tener un plásmido grande inductor de raíces (Ri). La cepa A4 de *A. rhizogenes*, que aún se está secuenciado, se piensa puede corresponder al biovar 2, con un cromosoma grande sencillo y varios plásmidos pequeños (Veena & Taylor 2007).

Por diferentes experimentos se sabe que todas las cepas de *A. rhizogenes* poseen una región central de DNA altamente conservado esencial para la formación de raíces pilosas, pero dependiendo de las opinas que producen, las cepas se pueden sub-clasificar en cepas del **tipo agropina**, representadas por plásmidos *pRiA4*, *pRi1855*, *pRiHRI*, *pRi15834* y *pRi LBA9402*; cepas del **tipo manopina**, representadas por *pRi8196*; cepas del **tipo cucumopina**, representadas por *pRi2659*; y cepas del **tipo mikimopina**, representadas por *pRi1724*. Entre las cepas conocidas, las K47, K599 y HRI son tipos hipervirulentos capaces de infectar una amplia variedad de especies de plantas.

Cabe mencionar que los resultados dependerán de la combinación entre planta y tipo de cepa empleada (Veena & Taylor 2007).

### 2.5.2. Proceso de transformación genética mediante *A. rhizogenes*

La generación de raíces pilosas se lleva a cabo por la transferencia de un fragmento discreto de DNA bacteriano al núcleo de las células vegetales. Este fragmento de DNA (T-DNA), pertenece a la familia de plásmidos grandes y es llamado plásmido Ri (inductor de raíces) (Figura 1). En el plásmido Ri de tipo agropina, el T-DNA está formado por dos fragmentos en los extremos, de 15 a 20 kb aproximadamente. En el borde izquierdo ( $T_L$ -DNA) se localizan los genes responsables de la producción del fenotipo de raíces pilosas, y en el borde derecho ( $T_R$ -DNA) se encuentran los genes que controlan la síntesis de opinas y auxinas (Winans 1992; Veena & Taylor 2007).

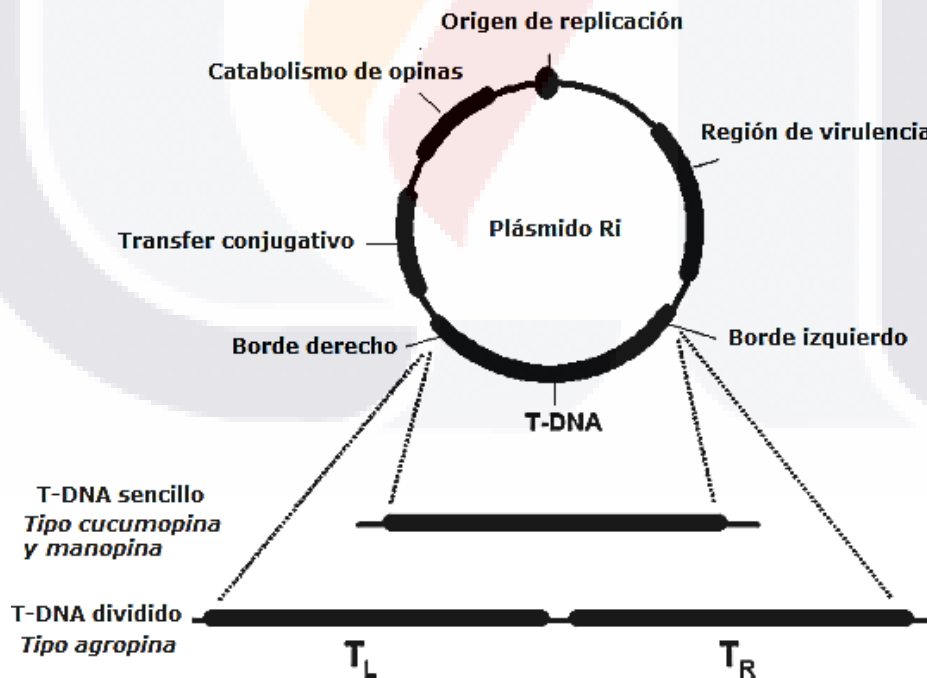


Figura 1. Estructura del plásmido Ri de *A. rhizogenes* (Adaptado de Veena & Taylor 2007).

Una vez en el núcleo, éste se integra al DNA genómico dirigiendo una hipersensibilidad en la planta, así como una producción de opinas, estas últimas con la función de inducir la transcripción de genes bacterianos necesarios para su transporte y su catabolismo, al igual que servir como fuente de carbono, nitrógeno y, algunas veces de fósforo, a las bacterias. Los clones varían en morfología, crecimiento y productividad metabólica debido a la naturaleza, al sitio y al número de T-DNA integrados dentro de la célula vegetal, y pueden mantenerse estables, tanto genéticamente como biosintéticamente, por grandes periodos (Winans 1992; Wahby 2007; Roychowdhury *et al.* 2013).

Para atraer la planta a la bacteria, ésta libera compuestos químicos por las partes heridas, por lo que son considerados de suma importancia para que se pueda llevar a cabo el movimiento de la bacteria (quimiotaxis) hacia el tejido vegetal. Los diferentes reportes sugieren que factores como el pH extracelular (5.0 a 5.5), y sustancias como compuestos fenólicos, monosacáridos, la acetosiringona y compuestos relacionados, son capaces de inducir a los **genes *vir***, responsables de la virulencia de las cepas. Esta inducción requiere de dos proteínas que codifican plásmidos, VirA y VirG. VirA pertenece a la clase de las histidin protein cinasas capaces de reconocer directa e indirectamente a los compuestos fenólicos y a los monosacáridos liberados; y VirG a la clase de reguladores de respuesta, algunos con N-terminal y otras con C-terminal, generalmente capaces de unirse a promotores. Además de lo anterior, la eficiencia de la inducción depende también de la proteína ChvE perteneciente a las proteínas unidas a azúcares, con función también en el transporte. Para que esta última lleve a cabo su función requiere de su adición al dominio periplásmico de VirA (Winans 1992).

Otros genes están involucrados en la inserción del fragmento T-DNA al genoma de la planta. El gen *virD1* expresa la proteína VirD1, la cual al parecer cataliza cortes en sitios específicos en bordes en posición *trans*; y el gen *virD2*, expresa a la proteína VirD2, que parece guiar al fragmento T-DNA al núcleo mediante la imitación de las proteínas celulares reconocidas por el núcleo de la célula vegetal, así como ayudar a la integración del fragmento al genoma de la planta.

También se encuentra el gen *virB* capaz de codificar 11 proteínas cuyas funciones ayudan a la salida del fragmento T-DNA a través de la envoltura bacteriana (Winans 1992).

Existen genes que están relacionados con una sobreproducción de auxinas. Ejemplo de éstos es el gen *ipt*, conocido también como transcripto 3 o *tmr*, el cual cataliza la condensación de isopentenil pirofosfato y adenosin monofosfato, para formar isopentenil-AMP, este último transformado por las enzimas vegetales en *trans*-zeatina y *trans*-ribosilzeatina. En plásmidos Ri de tipo agropina se pueden encontrar también los genes *aux1*, *aux2*, *rolB* TR, *mas1*, *mas2* y *ags*, los cuales controlan la biosíntesis de auxinas y opinas. Los genes *aux* se cree que solo son auxiliares para la producción de raíces pilosas, mas no necesarios para que se exprese el fenotipo. Cabe mencionar que las agrobacterias de tipo cucumopina y manopina no contienen los genes *aux*, solo los *rol* (Winans 1992; Veena & Taylor 2007).

Sin embargo, los genes de mayor importancia para que aparezcan raíces pilosas parecen ser los genes *rol* (*rolA*, *rolB* y *rolC*), que son genes inductores de raíces y son esenciales para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de las raíces transformadas. Estos se encuentran en el extremo T<sub>L</sub>-DNA del plásmido Ri de tipo agropina. Se caracterizan por aumentar la sensibilidad de las raíces transformadas a auxinas agregadas exógenamente y generan fenotipos característicos. El gen *rolA* está asociado con los internudos cortos, hojas rugosas, etc.; el *rolB* genera estambres cortos, estigmas sobresalidos e incremento de las raíces adventicias sobre los tallos; y el *rolC* es responsable de la reducción en la dominancia apical, acortamiento de los internudos e incremento de las ramificaciones, por lo que las plantas obtenidas a partir de cultivos de raíces pilosas son diferentes fenotípicamente a sus contrapartes (Winans 1992; Veena & Taylor 2007; Wahby 2007; Roychowdhury *et al.* 2013).

El T-DNA contiene varios ORF. Los ORF 3, 8 y 13 influyen de alguna manera en el fenotipo (Veena & Taylor 2007).

Existen algunas cepas de *A. rhizogenes* que igualmente transfieren genes para la biosíntesis de auxinas. Estos genes son los *iaa*. En experimentos se ha visto que éstos son responsables de la generación de raíces pilosas solo en la superficie apical de las raíces, donde de forma natural existen altas concentraciones de auxinas. La adición de estos genes da como resultado la generación de tumores en la superficie basal. Por lo tanto, las células que contienen los genes *iaa* sintetizan auxinas adicionales, mientras que las células que contienen los genes *rol* adquieren una mayor sensibilidad a esas auxinas (Winans 1992).

Una forma de verificar la inserción del T-DNA es la adición de genes reporteros o de selección, y mediante ensayos sencillos o con el empleo de antibióticos, poder comprobar que se haya llevado de manera correcta la inserción. Por un lado, está el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (*gus*), un gen reportero, que puede ser analizado más fácilmente por un ensayo histológico al generarse una coloración azul en el tejido. De la misma forma, se puede utilizar el gen *npt-II* que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II, que le confiere resistencia a la kanamicina. Recientemente se está empleando también el gen para la proteína verde fluorescente (GFP), también un gen reportero (Zhi-Bi & Min 2006).

En su trabajo de investigación, Wahby distingue seis siguientes etapas en el proceso de transformación genética mediada por *Agrobacterium*:

**1.- Reconocimiento planta-*Agrobacterium*.** La planta, una vez herida, comienza el proceso de reparación del tejido produciendo compuestos fenólicos, que son precursores empleados para la síntesis de lignina. Además, hay liberación de compuestos quimioatrayentes, como azúcares y aminoácidos, que atraen a las agrobacterias.

**2.- Adhesión de *Agrobacterium* a la célula vegetal.** El *Agrobacterium*, se une a la superficie de la célula vegetal mediante polisacáridos y celulosa. Este proceso se lleva a cabo mediante la información contenida en los locus *attR* y *ceIABCDE*, respectivamente, localizados en el cromosoma bacteriano. Los genes *chv* están involucrados de igual forma con la adhesión de la bacteria a la célula

vegetal al codificar para factores que permiten reconocer la proximidad de un posible huésped y su infección.

### **3.- Activación de los genes de virulencia y producción de la hebra-T.**

Mientras se está llevando a cabo la unión de la bacteria a la zona herida, los genes *vir* se activan debido a sustancias inductoras, pH ácido y azúcares que se encuentran en el medio. La proteína VirA, con actividad autocinasa, está localizada en la membrana de la bacteria y transfiere un grupo fosfato a la proteína VirG para su activación. Esta última se encuentra en citoplasma y activa la transcripción de todos los genes *vir*, dando como resultado el procesamiento del T-DNA dentro de las células. Este último comienza con el corte en los extremos T<sub>L</sub>-DNA y T<sub>R</sub>-DNA por las proteínas con actividad de endonucleasa VirD1 y VirD2 (codificadas del operón *virD*). En seguida, al parecer la proteína VirD2 se une al extremo 5' del T-DNA y lo guía hacia la membrana bacteriana y después hacia la célula vegetal.

**4.- Transferencia del T-DNA a la célula vegetal.** El complejo T-DNA/VirD2 y otras proteínas Vir, atraviesan la membrana plasmática vegetal por un canal formado por las proteínas codificadas del operon *virB*. Una vez en el citoplasma, el T-DNA es protegido de las endonucleasas por la proteína VirE2. Esta última proteína y la virD2, poseen secuencias de localización nuclear, por lo que ayudan a transferir el T-DNA al núcleo de la célula vegetal.

**5.- Integración del T-DNA en el cromosoma vegetal.** Cuando el T-DNA llega al núcleo celular, la proteína VirE2 la dirige hacia la cromatina para posiblemente integrarse dentro del genoma vegetal. Además, participan también otras enzimas vegetales y la proteína virD2. La inserción del fragmento T-DNA se sabe que es aleatoria.

**6.- Expresión del T-DNA en la célula vegetal.** El resultado del proceso de infección por *Agrobacterium* se manifiesta como una alteración hormonal en la célula vegetal debido a la expresión de oncogenes que se encuentran dentro del T-DNA; de igual forma, hay una elaboración de opinas, realizada por los genes *ops*, para ayudar al mantenimiento y crecimiento de la bacteria (Wahby 2007).



### **2.5.3. Características de las raíces transformadas**

Las raíces de las plantas pueden sintetizar, almacenar y secretar una gran cantidad de compuestos. Los metabolitos secundarios son producidos en la raíz de la planta y después son traslocados a las partes de la planta donde son requeridos. En un cultivo *in vitro* de raíces pilosas, las sustancias producidas en las raíces serán liberadas al medio de cultivo. Estas sustancias pueden ser posteriormente extraídas y empleadas para diversos fines. Los metabolitos alcaloides, cumarinas, saponinas, ácidos fenólicos, aceites esenciales, terpenos, glicósidos, lactonas esteroidales, son ejemplos de sustancias que ya se han estado estudiando mediante esta metodología (Roychowdhury *et al.* 2013).

A nivel laboratorio se pueden emplear diferentes tipos de explantes para la obtención de raíces transformadas, como hipocotilos, hojas, tallos, peciolo, ápices de raíces cotiledones, protoplastos, raíces almacenadas y tubérculos. La ventaja de usar este tipo de transformación es que cada raíz principal producida en el sitio de infección es el resultado de un evento simple de transformación, esto es, se genera un clon, aunque cabe mencionar que se han reportado variaciones somaclonales en cultivos de raíces transformadas. Las raíces transformadas se han establecido en varias especies, incluyendo las plantas medicinales (Winans 1992; Veena & Taylor 2007; Roychowdhury *et al.* 2013)

La obtención de plantas a partir de raíces pilosas también puede ser posible. Se han reportado, por un lado, la regeneración de plantas transgénicas a partir de regiones viejas de cultivos de raíces en medios libres de reguladores, de manera espontánea; y por otro, la posibilidad de generar dichas plantas induciéndolas mediante el agregado de reguladores de crecimiento. Se han reportado casos en lo que al agregar solamente citocininas como la N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) o en combinación con alguna auxina, se regeneraron plantas (Roychowdhury *et al.* 2013).

El cultivo de raíces pilosas posee también otras ventajas: el procedimiento es relativamente sencillo y con bajos costos; los clones de las raíces son

genéticamente y biosintéticamente estables por grandes periodos, incluso en la criopreservación; se pueden producir una gran cantidad de compuestos propios de la planta madre, e incluso, nuevos compuestos; la cantidad obtenida de metabolitos puede ser igual o mayor que en las plantas de origen; y puede haber una producción continua de dichos metabolitos (Roychowdhury *et al.* 2013).

#### **2.5.4. Obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces transformadas**

En los últimos años el cultivo de raíces transformadas ha sido empleado con gran éxito para la obtención de proteínas terapéuticas recombinantes para ser expresadas en sistemas de expresión en bacterias, levaduras y en mamíferos. Ejemplos de esto es la obtención de la acetilcolinesterasa humana recombinante (ACH-R<sub>ER</sub>) a partir de raíces transformadas de plantas transgénicas; y las líneas transgénicas de *Nicotiana tabacum* (Ac2 y AcK6) las cuales son capaces de expresar anticuerpos monoclonales 14D9 (Makhzoum *et al.* 2013).

Se han llevado a cabo también estudios transformaciones en las cuales se han insertado genes que codifican para enzimas que normalmente no se encuentran en la célula vegetal, con el fin de aumentar la cantidad del metabolito a producir. A *Nicotiana tabacum*, por ejemplo, se le insertó dos veces el gen de la lisina descarboxilasa elevando los niveles de cadaverina y anabasina; y en *Rubia peregrina* L. se introdujo la enzima isocorismato sintasa para aumentar la producción de antraquinona y alizarina (Zhi-Bi & Min 2006).

A pesar de la cantidad de estudios hechos para ver la factibilidad de obtener metabolitos secundarios, pocos son los análisis que se han hecho acerca de las cantidades de estos metabolitos tanto en raíces como en brotes provenientes de plantas transformadas con *A. rhizógenes*. Los reportes indican niveles similares o incluso más altos que en las plantas no transformadas, en muchos de los casos, y en otras se han reportado niveles más bajos. La transformación con la cepa A4 de *T. indica* obtuvo de 20 a 60% más de tiloforina que en el control; y *B. monnieri*, con la misma cepa, llegó a obtener arriba de cinco veces más de

saponinas bacopa que en aquellas no transformadas (Roychowdhury *et al.* 2013).

En cuanto a la morfología de las raíces transformadas, ésta no ha sido muy estudiada. Los pocos reportes que se han hecho muestran tanto similitudes como diferencias dependiendo del tipo de cepa a emplear, silvestre o transformada. Las diferencias que se han encontrado son en referencia al aumento de pilosidad, a la cantidad de células vasculares y corticales, a un rápido crecimiento y a la extensión de las raíces laterales (Makhzoum *et al.* 2013).

#### **2.5.5. Cepas de interés**

Existen diferentes cepas de agrobacterias, tanto silvestres como transformadas. En este sentido, la cepa **K599** fue descubierta en los años 70's en la enfermedad de raíces pilosas de pepino (*Cucumis sativus*) y en camas de paja. Ésta fue aislada y caracterizada como NCPPB2659, con plásmido pRi2659 (Figura 2), como el arquetipo de la agrobacteria del tipo cucumopina. Es una inusual combinación de una fuente cromosómica de biovar 1 y un plásmido rizogénico. Se considera una cepa apropiada para realizar estudios de mejoramiento de transformación, debido a su agresividad y capacidad de inducir raíces pilosas de forma eficiente en una amplia variedad de cultivares de frijol de soya. Se tiene reportes de transformaciones estables de *Arabidopsis thaliana*, maíz (*Zea mays*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Mankin *et al.* 2007); y de una versión de una cepa K599 con eficiencias de transformación elevadas, con calidades de inserción mejoradas y una introducción reducida de secuencias principales de plásmidos binarios (Veena & Taylor 2007). Además, se han llevado a cabo diversas investigaciones empleando dicha cepa (**Tabla 1**).

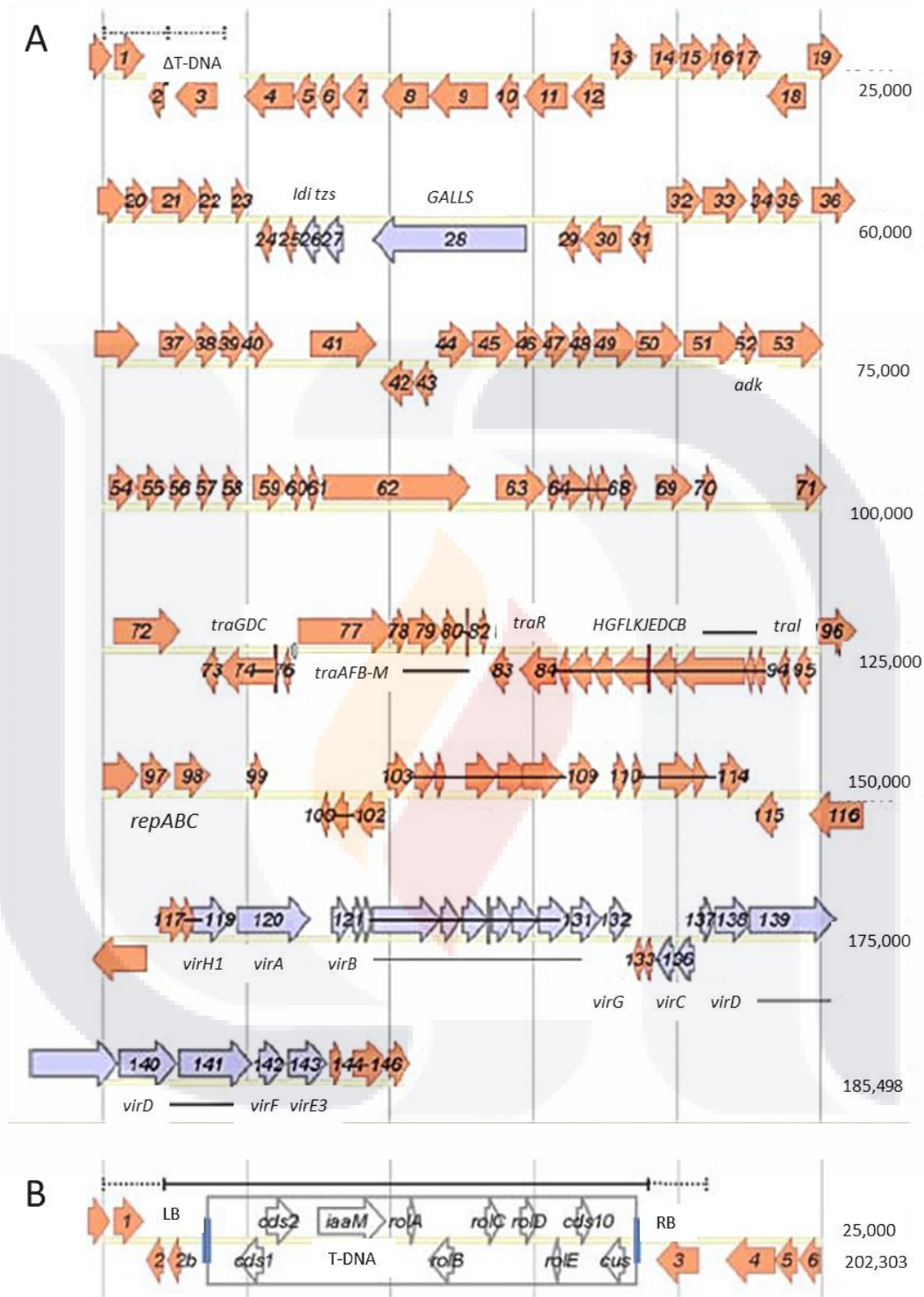


Figura 2. Mapa del plásmido para pRi2659 y la región T-DNA. (A) Se muestra la región T-DNA de pRi2659 de 1 a 25,000 pb. (B) Se muestran las regiones flanqueantes por líneas punteadas; los ORFs relacionados con el T-DNA y los genes *vir* se muestran de color blanco y azul, respectivamente. En pRi2659 la localización del T-DNA borrado y del *oriT* están marcados con una línea vertical negra y un óvalo café, respectivamente. En pRi2659, la región T-DNA está enmarcada en un rectángulo (Mankin *et al.* 2007).

**Tabla 1.** Especies de plantas transformadas con la cepa K599.

Investigación realizada	Especies de plantas transformadas
Producción de artemisina	<i>Artemisia annua</i>
Expresión de genes	<i>Cucumis sativus</i>
Aumento en la biosíntesis de ácido cafeico	<i>Glycine max</i>
Cultivo de tejidos	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Inducción de raíces transformadas en varios genotipos	<i>Glycine max</i>

Makhzoum *et al.* 2013; Veena & Taylor 2007.

La cepa **ARqua1** es una agrobacteria de tipo pRiA4. El *A. rhizogenes* **A4** es una cepa de tipo agropina virulenta la cual posee tres plásmidos: el plásmido a (pArA4a, de 180 kb) que no es necesario para la transformación, el plásmido b (de 250 kb) responsable de la inducción de raíces, y el plásmido c (pArA4c) considerado un plásmido cointegrativo de pArA4a y pRiA4 (Jouanin *et al.* 1986). Se conocen la secuencia de 6 kb en la región T<sub>R</sub>-DNA que lleva los genes *aux1* y *aux2* responsables de la producción de auxinas en las raíces transformadas. Contiene además dos orígenes de lectura abierta correspondientes a proteínas de 749 aminoácidos para el gen *aux1*, y de 466 aminoácidos para el gen *aux2*. Estos genes muestran similitudes en aquellos que igualmente producen auxinas en *A. tumefaciens* (Camilleri & Jouanin 1991). Reportes de transformación de *M. truncatula* con la cepa dieron como resultado la producción de raíces transformadas bien adaptadas, de forma similar a la infección que se lleva a cabo de forma eficiente por *Sinorhizobium melioliotti* (Chabaud *et al.* 2006). La cepa A4 se ha empleado para transformar diversas plantas para la obtención de metabolitos secundarios con potencial médico (**Tabla 2**), donde muchas de ellas se están empleando para obtener cantidades importantes de los mismos.

A diferencia de lo anterior, también se ha reportado un número bajo de raíces generadas en plantas de *Vicia hirsuta*, donde utilizando ARqua1 y C58C1:pRiA4-24B se obtuvieron de 1 a 3 raíces por herida, solamente. En estas plantas, las raíces transformadas fueron muy similares en apariencia a las raíces de las plantas silvestres (Quandt *et al.* 1993).

Existen reportes, aunque son pocos relativamente, de la transformación de especies de plantas empleando la cepa ARqua1 (**Tabla 3**), para llevar a cabo investigaciones de expresión de genes, de producción de metabolitos secundarios, en bioquímica y sobre estudios de transformación.

Chabaud *et al.* consideran a las cepas K599 y ARqua1 de baja virulencia basado en el número de raíces producidas, ya que son capaces de inducir un número limitado de raíces transformadas con un crecimiento y morfología comparables a las raíces normales (Chabaud *et al.* 2006).

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios obtenidos a partir de raíces transformadas con la cepa A4.

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Especies de plantas transformadas</b>
Heteratisina, atisina, hetidina	<i>Aconitum heterophyllum</i>
20-hidroxiecdsona	<i>Ajuga multiflora</i>
Umbeliferona	<i>Ammi majus</i>
Artemisina	<i>Artemisia annua</i>
Serpentina, ajmalicina	<i>C. roseus var. Prabal</i>
Ácido rosmarínico	<i>Coleus blunei,</i>
Escopolamina	<i>Duboisia leichhardtii, Hyoscyamus muticus, Przewalskia tangutica, Buboisia myoporoides X. D. leichhardtii</i>
Flavonoides	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Licochalcona A	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Harpagosido, verbascósido, isoverbascósido	<i>Harpagophytum procumbens</i>
Atropina	<i>Hyoscyamus albus</i>
Hisociamina	<i>Hyoscyamus muticus, Przewalskia tangutica</i>
Ginsenoide	<i>Panax ginseng</i>
Plumbagina	<i>Plumbago zeylanica</i>
Baicalina, wogonosido, baicaleina, wogonina	<i>Scutellaria baicalensis</i>
Tiloforina	<i>Tylophora indica</i>
Isovalerohidroxido, didrovaltrato, didrovaltrato, acevaltrato, homodidrovaltrato	<i>Valeriana wallichii</i>
Witasteroides	<i>Withania somnifera</i>
Bacopasaponinas D, F y C, Bacopásido II y V, Bacósido A3	<i>Bacopa monnieri</i>
-	<i>Brassica juncea*</i>
-	<i>Levisticum officinale*</i>
Isoflavona	<i>Nicotiana benthamiana</i>
Salidrósido	<i>Rodhiola sachalinensis</i>
-	<i>Vigna aconitifolia*</i>

\*Se realizaron las transformaciones de las plantas con fines distintos a la obtención de metabolitos secundarios (Extraído de Roychowdhury *et al.* 2013 y Makhzoum *et al.* 2013).

**Tabla 3.** Especies de plantas transformadas con la cepa ARqua1.

Investigación realizada	Especies de plantas transformadas
Fijación de nitrógeno y simbiosis endomicorrízica	<i>Brassica napus</i>
Mejoramiento en la producción de flavonoides	<i>Medicago truncatula</i>
Inducción de raíces transformadas	<i>Populus tremuloides</i>
Expresión de genes	<i>Vicia hirsuta</i>

Extraído de Makhzoum *et al.* 2013 y Quandt *et al.* 1993.

## 2.6. Fitoquímicos de interés

Anteriormente los fitoquímicos provenientes de las plantas, principalmente aquellos formados como parte del metabolismo secundario de las mismas, no presentaban mayor interés, debido a que eran considerados como productos de desecho. Gracias a diversas investigaciones que se han estado realizando en los últimos años, se sabe que esos fitoquímicos son importantes para las plantas y son útiles para el ser humano. De acuerdo a su origen biosintético, estos compuestos pueden ser clasificados en cuatro grupos: alcaloides, fenilpropanoides o productos derivados de la ruta del shikimato, policétidos y terpenoides (Osbourn *et al.* 2009).

**1.- Alcaloides.** De forma tradicional, los alcaloides se definen como compuestos heterocíclicos nitrogenados (provenientes de la biosíntesis de los aminoácidos (Figura 3), y comprenden el grupo más grande de productos naturales. Muchos compuestos que no precisamente corresponden a esta definición son incluidos dentro de este grupo, ya sea por a razones históricas o por su actividad biológica (Osbourn *et al.* 2009).

**2.- Fenilpropanoides.** En las plantas, la ruta del shikimato proporciona precursores para derivados del ácido benzoico y compuestos fenilpropanoides (Figura 4) (Osbourn *et al.* 2009).

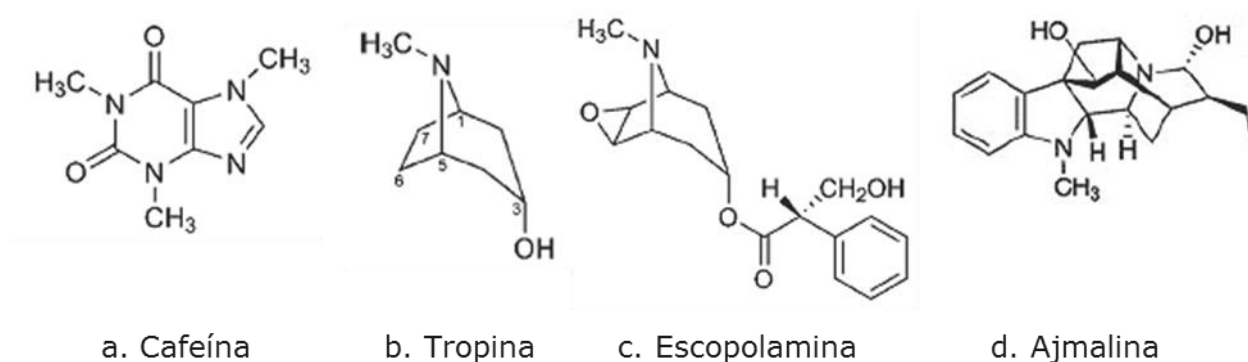


Figura 3. Algunos alcaloides de importancia. La cafeína (a) es el alcaloide de mayor abundancia; los tropano alcaloides (b y c) se encuentran solamente en la familia Solanaceae; y los monoterpenos indol alcaloides (d) se encuentran en las familias Apocynaceae, Loganiaceae, Nyssaceae y Rubiaceae (Extraído de Osbourn *et al.* 2009).

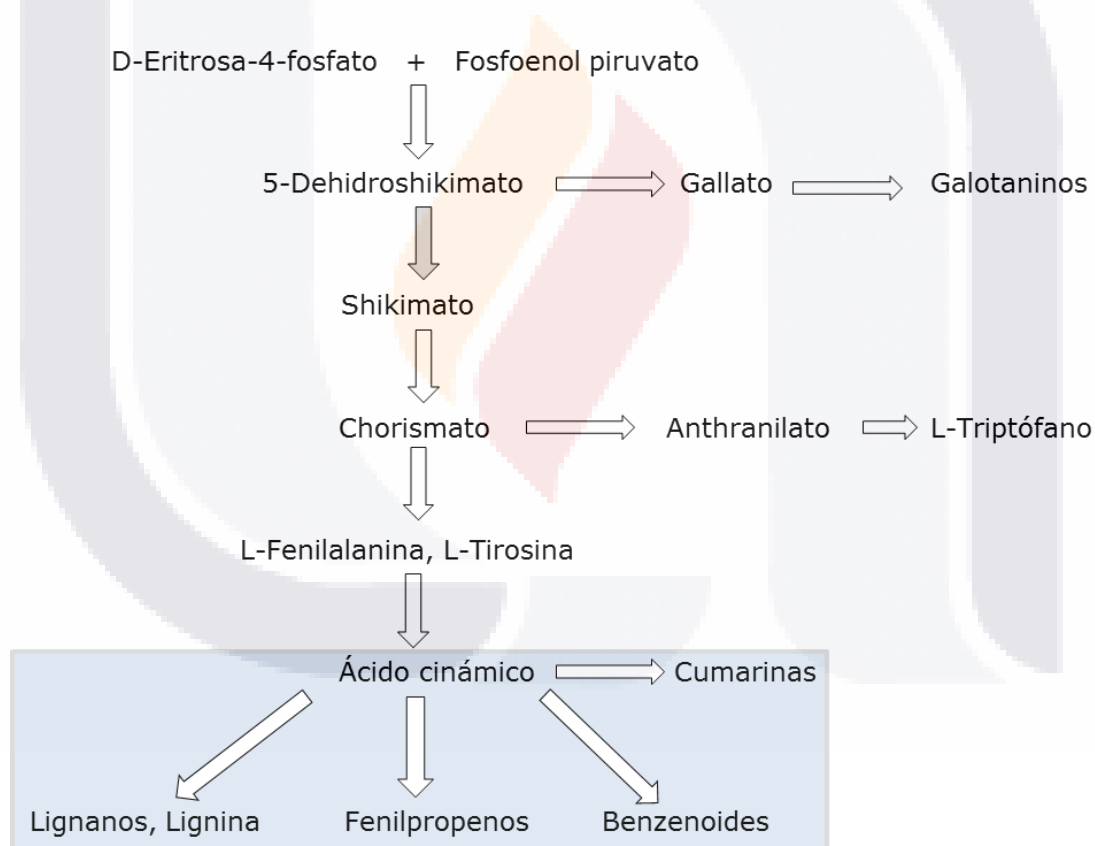


Figura 4. Esquema general de la ruta del shikimato. En el recuadro azul se muestran los compuestos fenilpropanoides (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009).

**3.- Policétidos.** Los policétidos son compuestos usualmente sintetizados de dos unidades de carbono derivados de una molécula de acetato activado en forma



de acetyl CoA; pueden distinguirse de otros compuestos similares por la presencia de átomos de oxígeno en posición *meta* en el anillo aromático. Algunos policétidos se encuentran glicosilados y pueden llevar sustituyentes acilo sobre la unidad de azúcar. Por otro lado, los policétidos también pueden contener nitrógeno (alcaloides policétidos) por originarse de una mezcla de rutas biosintéticas, ya sea de ácidos grasos o de aminoácidos (Osbourn *et al.* 2009).

El grupo más grande de policétidos son los **flavonoides**, con más de 6 mil compuestos conocidos, cuya estructura se caracteriza por tener un esqueleto C6-C3-C6, y generalmente se encuentran glicosilados. Esta forma básica puede sufrir diferentes modificaciones químicas, dando lugar a otras estructuras (Figura 5). Un intermediario importante dentro de la biosíntesis de los flavonoides es la **chalcona**, que es un precursor de otros grupos de compuestos, también de importancia biológica: auronas, isoflavonas, antocianidinas, flavan-4-oles, flavonoles, dihidroflavonoles, flavonas y flavan-3-oles (Osbourn *et al.* 2009).

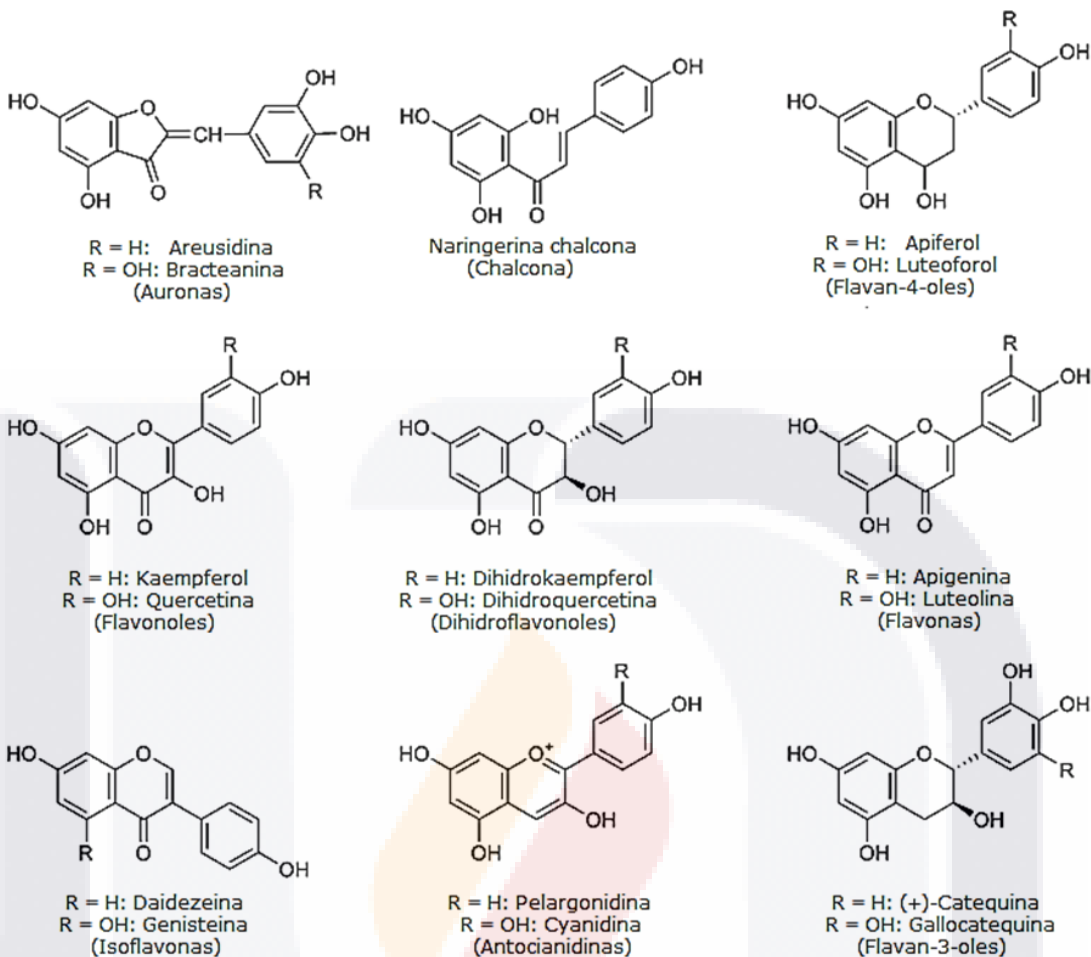


Figura 5. Flavonoides. El compuesto denominado chalcona es precursor de las demás clases de flavonoides (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009)

Los flavonoides son muy importantes para el hombre, ya que se ha demostrado que la ingesta de alimentos que contienen dichos compuestos, tiene múltiples beneficios a la salud, debido a su capacidad antioxidante y secuestrador de radicales libres; se consideran también preventivos contra enfermedades cardiacas por la inhibición a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDLs), actividad probada con el resveratrol; además se están haciendo investigaciones para medir su capacidad para prevenir algunos tipos de cáncer (Osbourn *et al.* 2009).

**4.- Terpenoides.** Los terpenoides, también conocidos como **isoprenoides**, son compuestos derivados de unidades de isopreno de cinco carbonos y comprenden más de 40 mil diferentes estructuras.

La clasificación de los terpenoides se basa en el número de moléculas de isopreno que se unen: hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ) y politerpenos. Los terpenoides surgen de dos diferentes rutas biosintéticas: del ácido mevalónico (MVA), ruta llevada a cabo en el citosol, de la cual se producen los sesquiterpenos, triterpenos y esteroides ( $C_{27}$ ); y de la desoxixilulosa fosfato (DXP), llevada a cabo en los plastidios, se derivan los hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (Osbourn *et al.* 2009).

Los **hemiterpenos** son moléculas derivadas del dimetilalildifosfato (DMAPP). El hemiterpeno de mayor importancia es el **isopreno**, debido a su amplia distribución (Figura 6). Se le puede encontrar en musgos, helechos, plantas gimnospermas y angiospermas. Hay árboles que de igual forma liberan al exterior isopreno, principalmente los álamos y los árboles de trópicos húmedos. Los hemiterpenos se encuentran de también como productos provenientes de otras rutas, como los flavonoides prenilados y las hiperporfirinas (Osbourn *et al.* 2009).

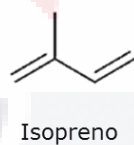


Figura 6. El isopreno es el hemiterpeno de mayor abundancia en las plantas (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009).

Los **monoterpenos** son compuestos volátiles lipofílicos que se originan de la unión de una molécula de DMAPP y una de isopentenil difosfato (IPP), produciendo moléculas de geranildifosfato (GPP); estas últimas pueden sufrir modificaciones y formar más de mil diferentes monoterpenos. Los monoterpenos se encuentran en las resinas de coníferas, aceites esenciales y esencias florales, contribuyendo a sabores y olores particulares de muchas de las plantas; por lo

mismo, tienen aplicaciones en perfumería, aromaterapia, en cosméticos e insecticidas. Un ejemplo de estos compuestos es el mentol, componente esencial de las especies de *Mentha*. Otros monoterpenos destacan por su actividad biológica, como son el alcohol perrillil y el (+)-(R)-limoneno, que se han reportado poseen actividad antitumoral (Figura 7) (Osbourn *et al.* 2009).

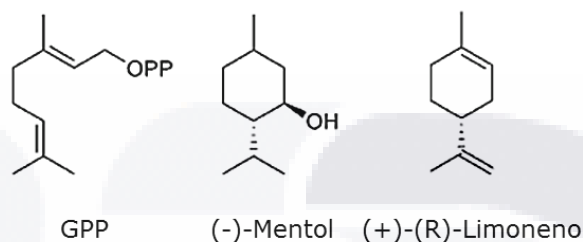


Figura 7. Monoterpenos. Se muestran el mentol y el limoneno, monoterpenos derivados del GPP (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009).

Los **sesquiterpenos** son compuestos menos volátiles que los monoterpenos, se forman por la condensación del DMAPP con dos moléculas de IPP. Algunos sesquiterpenos contienen una lactona pentacíclica, por lo que se les conoce como **sesquiterpeno lactonas**, siendo componentes abundantes de la familia *Asteraceae*. Las sesquiterpeno lactonas presentan actividad farmacológica al mostrar efectos antiinflamatorios, acción que se le atribuye a la presencia de una lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada que actúa como nucleófilo y alquila proteínas. Otros sesquiterpenos de importancia son, por ejemplo, la chamomila, proveniente de la planta medicinal *Matricaria recutita*, actualmente empleada en todo el mundo; y la artemisina (Figura 8), un agente novedoso proveniente de la *Artemisia annua*, empleado contra la malaria (Osbourn *et al.* 2009).

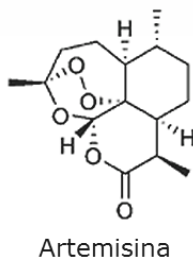


Figura 8. Artemisina. Sesquiterpeno de importancia médica empleado para tratar la malaria (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009).

Los **diterpenos** son moléculas sintetizadas de la unión de un DMAPP y tres moléculas de IPP, produciendo el metabolito **geranilgeranil difosfato (GGPP)**. Este último compuesto es de importancia ya que es el precursor de moléculas como la clorofila y la plastoquinona. De igual forma, también los GGPP pueden sufrir modificaciones y dar origen a diversas estructuras. Ejemplo de estas estructuras están las **giberelinas**, que son diterpenos tetracíclicos que actúan promoviendo la elongación de los brotes, la floración y la germinación de las semillas. El paclitaxel (Figura 9) es un diterpeno que actualmente es producido a nivel industrial a partir de cultivo de tejidos de varias especies de *Taxus* o por síntesis de baccatin III y de 10-deacetilbaccatin III (compuestos obtenidos de hojas de *T. bacata*), para tratar algunos tipos de cáncer (ovario, mama y pulmón) (Osbourn *et al.* 2009).

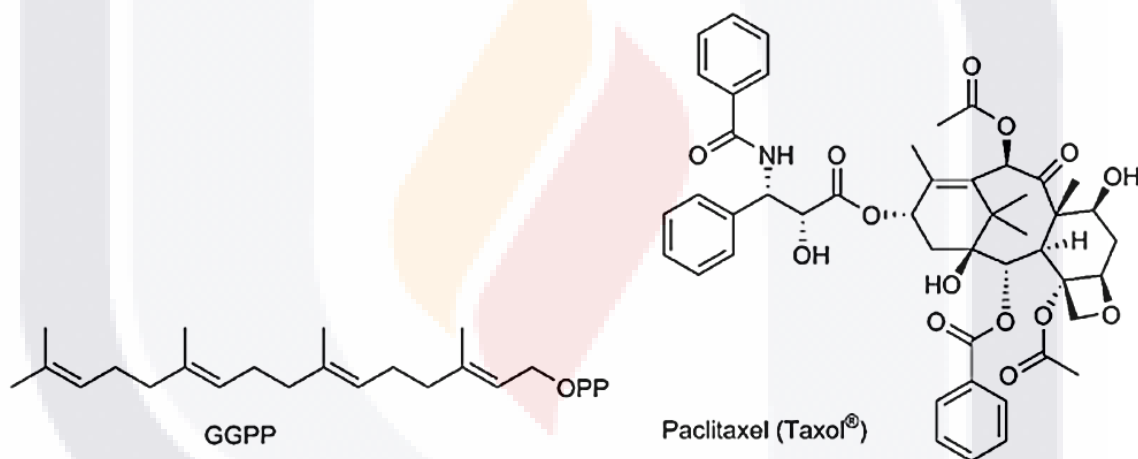


Figura 9. GGPP y Paclitaxel. El paclitaxel es un diterpeno empleado para tratar diversos tipos de cáncer (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009)

Los **triterpenos** son moléculas que se originan por la unión de dos moléculas de FPP que se unen por condensación a un escualeno. La ciclación de su metabolito 2,3-oxidoescualeno, seguido por algunas modificaciones, da origen a diversas estructuras principalmente tetra o pentacíclicas. El metabolito **2,3-oxidoescualeno** también es precursor de los esteroides en las plantas, donde estas moléculas son metiladas o etiladas en el C24 para dar origen a algunos **fitoesteroles** de importancia (Figura 10), como el campesterol y el estigmasterol, constituyentes esenciales de las membranas celulares con

influencia en su permeabilidad. El consumo de fitoesteroles ayuda a la inhibición de la absorción de colesterol en los animales, por lo que son empleados para tratar problemas de colesterol (Osbourn *et al.* 2009).

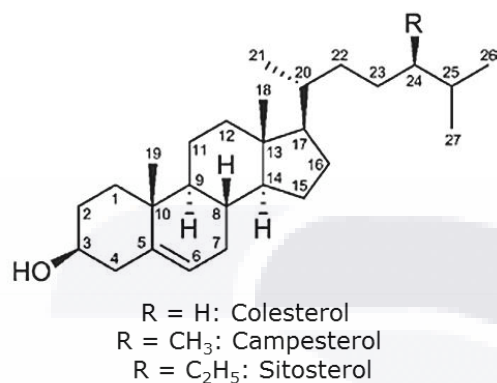


Figura 10. Esteroles (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009).

Otras moléculas de importancia son las **saponinas** las cuales poseen dos grupos funcionales, uno de carácter lipofílico (triterpenoide o aglicona esteroidal) y otro hidrofílico (azúcares). Esta característica hace que las saponinas sean capaces de producir espuma cuando se agitan las soluciones acuosas de las mismas, y por lo mismo, en tiempos atrás, las plantas que contenían las mismas eran empleadas como detergentes. Actualmente se usan en la preparación de cosméticos y como agentes espumantes en bebidas ligeras. Hay dos clases de saponinas: las **triterpeno saponinas**, que están ampliamente distribuidas en plantas que incluyen las familias *Araliaceae*, *Cariophyllaceae*, *Fabaceae* y *Primulaceae*; y las **saponinas esteroidales**, que se encuentran en las plantas monocotiledóneas, como las familias *Agavaceae*, *Dioscoraceae* y *Yuccaceae* (Osbourn *et al.* 2009).

En general, las saponinas con una cadena de azúcar (monodesmósidos) poseen un fuerte efecto hemolítico y antifúngico, más elevado que los que contienen dos cadenas de oligosacáridos (bidesmósidos), por lo que estas sustancias son empleadas como defensa por las plantas. Un ejemplo de este tipo de saponinas son los extractos de Licorica que, debido a su sabor dulce, son empleados para preparar dulces y como endulzantes. De la misma forma, son empleados como

expectorantes y como agentes antiinflamatorios, este último debido a su capacidad para inhibir a una enzima que inactiva el cortisol. Otro ejemplo de empleo del efecto benéfico de las saponinas son las provenientes de las raíces del *Panax ginseng* (Figura 11), raíz que se ha usado ampliamente en la medicina tradicional de Korea, China y Japón. Estas agliconas se caracterizan por tener dos o tres cadenas laterales de azúcar, y presentan posibles actividades contra el cáncer. Cabe destacar que las preparaciones de agliconas de ginseng han sido aprobadas para emplearse para el tratamiento de varios tumores (Osbourn *et al.* 2009).

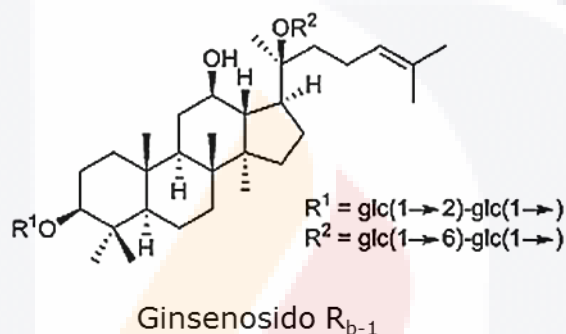
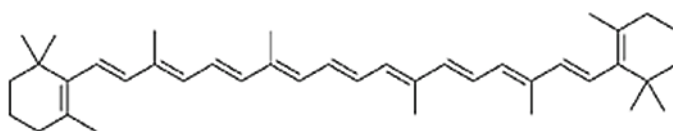


Figura 11. Ginsenosido. Saponina proveniente de la especie *Panax ginseng* con actividad anticancerígena (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009).

Los **tetraterpenos** comprenden al grupo de los **carotenoides** (Figura 12). Estas moléculas son sintetizadas a partir de dos moléculas de GGPP, cicladas en los extremos por un anillo de seis carbonos. Los dobles enlaces son insertados en configuración *trans*, lo que los hace responsables del color amarillo, naranja y rojo de los carotenoides. Para las plantas es sabido que los carotenoides son muy importantes. Por otro lado, para los humanos, los carotenoides son esenciales para la salud. El  $\alpha$ -caroteno, el  $\beta$ -caroteno y la  $\beta$ -criptoxantina son precursores de la vitamina A, y sirven como pigmento de los receptores de la luz en los ojos, además el consumo de alimentos con carotenoides, ayudan a disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de cáncer, debido a sus propiedades antioxidantes (Osbourn *et al.* 2009).



B-Caroteno

Figura 12. Molécula de  $\beta$ -caroteno. Precursor de la vitamina A esencial para la salud humana (Adaptado de Osbourn *et al.* 2009).

## 2.7. Plantas medicinales de interés de la región de Zacatecas

Las plantas medicinales ocupan un lugar muy importante para el tratamiento de diversos trastornos en la región de Zacatecas. Desafortunadamente los estudios que hasta el momento se han hecho de las mismas, como son su uso, propiedades, entre otros, han sido insuficientes. En 1986, como un esfuerzo de varios profesores de la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ), se abrió un consultorio de Medicina Tradicional para dar servicio a la población en general. Su directora, la Dra. Jáquez Méndez ha mencionado la importancia que ha tenido hasta nuestros días la MET y la herbolaria, así como el reconocimiento por parte de las personas de las distintas comunidades que acuden a su consultorio; pero ella misma reconoce que falta información de las plantas medicinales que se emplean, como lo son la acción farmacológica, dosis, reacciones indeseables, efectos colaterales, entre otras, para darle la importancia que merece (Girón Hernández 2011).

La Unidad Académica de Agronomía de la UAZ realizó un estudio para adquirir un mejor conocimiento acerca de las especies que principalmente están siendo utilizadas en la región de Zacatecas, para el tratamiento de diferentes padecimientos. Los resultados obtenidos fueron muy sorprendentes: 522 especies distribuidas en 299 géneros y 97 familias. Los géneros con mayor número de especies fueron: *Pseudognaphalium* (13 especies), *Salvia* (13), *Opuntia* (12), *Euphorbia* (10) y *Quercus* (8). Con respecto a los municipios, se encontró que Juchipila ocupa el primer lugar con el mayor número de plantas



medicinales (209 especies), seguido de Jerez y Zacatecas, con 154 y 137 especies respectivamente (Balleza & Enríquez 2007).

### **2.7.1. *Bidens odorata* Cav.**

**Nombre común:** Aceitilla.

**Categoría taxonómica:** Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta; Superdivisión: Spermatophyta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Asteridae; Orden: Asterales; Familia: Asteraceae (Perdomo Roldán & Mondragón Pichardo 2009).

**Descripción:** *Bidens odorata* Cav. es una especie que pertenece a un grupo taxonómico fuertemente emparentado llamado *Bidens pilosa*; presenta la siguiente sinonimia: *Bidens pilosa* L., *Bidens pilosa* var. *bimucronata* (Turcz.) Schultz-Bip. y *Bidens pilosa* var. *Minor* (Blume) Sherff (Perdomo Roldán & Mondragón Pichardo 2009; Rojas Alba 2009).

Debido a la estrecha relación de las especies que conforman el taxón se cometieron durante mucho tiempo varias imprecisiones en su clasificación. Gracias a diversos estudios, hoy en día se pueden diferenciar por su morfología, hábitat, genética y fitoquímicos (Perdomo Roldán & Mondragón Pichardo 2009; Rojas Alba 2009).

La especie de *Bidens odorata* Cav. pertenece a la familia Asteraceae. es una planta anual C3, diploide, erecta, de 20 cm hasta de 1.5 m de alto; requiere de 10 a 14 h para inducir la floración. Posee tallo cuadrangular ramificado, hojas opuestas largamente pecioladas, ovaladas o lanceoladas, y aserradas, compuestas por tres o cinco foliolos; cabezuelas agrupadas por varias en las porciones terminales de las ramas, con corolas blancas a moradas, y hasta 50 florecillas amarillas en el centro. Presenta aquenios de 5 a 15 mm de largo, los interiores lineares y más largos, los exteriores más o menos obcomprimidos y más cortos, negruzcos o café, vilano por lo común de dos aristas retrorsamente barbadas (con barbilla dirigida hacia abajo) que ayudan a su dispersión, de 1 a 3 mm de largo o a veces ausente, nunca con 3 o más aristas (Figura 13) (Barba

Avila *et al.* 2003; González Elizondo *et al.* 2004; Perdomo Roldán & Mondragón Pichardo 2009).



Figura 13. *Bidens odorata* Cav.

(<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/bidens-odorata/fichas/pagina1.htm>).

**Hábitat y distribución geográfica:** Su área de origen se considera México y Guatemala, y se ha encontrado también en algunas partes de Estados Unidos (Nuevo México) y de Sudamérica. Se tienen registros de esta planta en casi todo el país (excepto en Yucatán). Se encuentra en campos de cultivo, orillas de caminos, lugares perturbados y alrededor de ríos. Es una de las especies más comunes en las áreas rurales y terrenos baldíos de los valles altos, encontrándose además como maleza en las áreas de cultivo (Perdomo Roldán & Mondragón Pichardo 2009; Rojas Alba 2009).

**Usos:** Se le atribuyen diferentes propiedades como son desinflamante, antidiarreico, antiemético, antiespasmódico, antidisentérico, tónico, diurético y antidiabético (Rojas Alba 2009). Se usa como vitamínico y tranquilizante, para el cansancio y debilidad cerebral; también se usa para el tratamiento de tumores, dolores de espalda, cabeza y estómago, enfermedades del riñón, para engrosar el pulmón y purificar la sangre. En la región de Durango se usa para descongestionar los riñones y la vejiga, para bajar la fiebre y para la inflamación del estómago (Barba Avila *et al.* 2003; Perdomo Roldán & Mondragón Pichardo 2009). Hay reportes de que las mujeres la usan para el tratamiento de flujo vaginal (Perdomo Roldán & Mondragón Pichardo 2009).

Otras especies de "aceitillas" son también empleadas para tratar padecimientos similares, como la *B. bipinnata* L. (Rojas Alba 2009). Por otro lado, la *B. pilosa* es una especie empleada en Brasil para el tratamiento de la malaria (Oliveira *et al.* 2004), y se tienen reportes de tener funciones antihiper glucémicas, antihipertensivas, inmunosupresivas, antiinflamatorias, antileucémicas y antimicrobianas (Deba *et al.* 2007).

**Fitoquímicos:** Otras especies del género *Bidens* ya han sido ampliamente estudiadas con respecto al contenido de fitoquímicos de importancia, por ejemplo, a su sinonimia *B. pilosa* L., se le han encontrado glucósidos de fenilpropanoides, poliacetilenos, un diterpeno, flavonoides y glicósidos de flavonas (Deba *et al.* 2007). A diferencia, en la especie de *B. odorata* Cav. hasta el momento se han reportado la presencia de flavonoides y triterpenos (Andrade Cetto & Heinrich 2005), así como de los ácidos oleico, palmítico, linoleico y esteárico (Zavala Mendoza *et al.* 2013).

**Farmacología:** Zavala Mendoza *et al.* (2013) encontraron efectos antidiarreicos al administrar extractos clorofórmicos de *Bidens odorata* Cav. en ratas, a los que refieren su efecto a los de diferentes aceites encontrados en dichos extractos. Por otro lado, se ha reportado que *Bidens odorata* Cav. puede producir una respuesta diurética, encontrándose una excreción de sodio más alta que la generada por la administración de furosemida al administrar extractos acuosos a ratas adultas (Camargo *et al.* 2004).

### **2.7.2. *Chenopodium album* L.**

**Nombre común:** Cenizo o quihuilla

**Categoría taxonómica:** Reino: Plantae; Subreino: Tracheobionta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Caryophyllidae; Orden: Caryophyllales; Familia: Chenopodiaceae; Subfamilia: Chenopodioideae (naturalista.conabio.gob.mx).

**Descripción:** Tiende a alcanzar una altura de 10 a 150 cm, en posición vertical, hasta al final de la floración, donde toma una posición reclinada. Las hojas son

alternas, tomando varias formas: las que se encuentran cerca de la base, son dentadas en forma de diamante, de 3 a 7 cm de longitud y de 3 a 6 cm de ancho; las de la parte superior de los tallos son la floración con forma romboidal-lanceoladas de 1 a 5 cm de longitud y de 0.4 a 2 cm de ancho, cerosas y de aspecto harinoso, con una capa blanquecina en la parte inferior. Las pequeñas flores son radialmente simétricas, densas y ramificadas de 10 a 40 cm de largo (Figura 14) (naturalista.conabio.gob.mx).



Figura 14. *Chenopodium album* L.  
(Dan Mullen, naturalista.conabio.gob.mx).

**Hábitat y distribución geográfica:** Su origen no es certero, debido a que se ha encontrado en gran parte de Europa, así como en Asia, África, Australasia, América del Norte y Oceanía. Esta especie crece en casi todas partes en los suelos ricos en nitrógeno, especialmente en terrenos baldíos (Naturalista 2016).

**Usos:** Sus propiedades medicinales están principalmente en hojas y semillas (Sharma *et al.* 2016). Se emplea como laxante, nutritivo, diurético, ligeramente sedante, antiparasitario y hepatoprotector (Laghari *et al.* 2011; Naturalista 2016); así como en el tratamiento de piedras urinarias, problemas de riñón, cólicos y en el control de los dolores provocados al orinar (Sharma *et al.* 2016).

**Fitoquímicos:** Esta especie se ha difundido en terrenos cultivados, debido al alto contenido proteico y al balance en el espectro de aminoácidos, con alto contenido en lisina (5.1 – 6.4%) y metionina (0.4 – 1.0%); un contenido de fenólicos totales superior a otros extractos de frutos (3066 mg de GAE/100 g)

identificando ácido p-cumárico, ácido ferúlico, y ácidos m-cumárico y o-cumárico (Laghari *et al.* 2011). En extractos acuosos se han identificado flavonoides (83 mg equivalentes de quercetina/g de extracto) y saponinas (1.6 mg de saponinas/100 g de peso seco) (Sharma *et al.* 2016).

**Farmacología:** Los estudios en esta especie se han enfocado en las hojas. Estudios *in vitro* de extractos acuosos exhibieron efecto de anticristalización sobre el óxido de calcio y cristales de óxido de magnesio (brucita) (Sharma *et al.* 2016); extractos metanólicos mostraron un mejor desempeño en su capacidad antioxidante (Laghari *et al.* 2011); y extractos acuosos presentaron actividad antibacterial sobre *Bacillus subtilis* (13 mm de zona de inhibición) (Korcan *et al.* 2013).

### 2.7.3. *Chenopodium graveolens* Lag.

**Nombre común:** Epazote de zorrillo.

**Categoría taxonómica:** Reino: Plantae; subreino: Traqueobionta; superdivisión: Spermatophyta; división: Magnoliophyta; clase: Magnoliopsida; subclase: Caryophyllidae; orden: Caryophyllales; familia: *Chenopodiaceae* (Mondragón Pichardo 2009).

**Descripción:** Es una planta herbácea anual muy olorosa con tallo frecuentemente rojizo y con rayas a todo lo largo, de hasta de 1 m de alto, con las hojas sinuado-pinnitífidas, de color verde grisáceo de hasta de 9 cm de largo y hasta de 3 cm de ancho, con glándulas amarillas en el envés; las flores son verdosas, muy pequeñas, y se presentan en densos racimos. Presenta un fruto pequeño (utrículo), de alrededor de 1 mm de diámetro, cubierto de forma incompleta por el perianto; el tamaño de su semilla es de 0.5 mm de diámetro, de color café oscuro o negro y con el pericardio adherente (Figura 15) (Barba Avila *et al.* 2003; González Elizondo *et al.* 2004; Mondragón Pichardo 2009).



Figura 15. *Chenopodium graveolens* Lag.  
(<http://abundantadventures.com>).

**Hábitat y distribución geográfica:** Es una planta anual de hábitat arvense y ruderal; se considera una especie nativa de México y se ha encontrado ampliamente en todo el país. Se tienen registros de ella desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina, y en África (González Elizondo *et al.* 2004; Mondragón Pichardo 2009).

**Usos:** Se usa como "agua de uso" para la tos, la bronquitis y el dolor de pecho; para el dolor de espalda, de estómago y para sacar parásitos, también se usa para la úlcera. Se emplea la infusión de hojas y tallos en el tratamiento del dolor de aire, mezclada con gordolobo. En la Farmacopea Mexicana se cita como antihelmíntica. También se usa contra la diarrea y la urticaria (Barba Avila *et al.* 2003; González Elizondo *et al.* 2004).

**Fitoquímicos:** Contiene flavonas, sesquiterpenoides y esteroides. Se reconoce un alcaloide, principios peptídicos, ácido tartárico y oxálico, y varias sales (González Elizondo *et al.* 2004). Se han identificado también tres flavonoides, cuatro terpenoides y tres esteroides: ponostrobina, estigmasterol, estigmast-22-en-3-ol; así como 3 $\alpha$ -sitosteril glucósido, acetato de geranil, pinocembrina, crisina, criptomeridiol y dos sesquiterpenos (Mata *et al.* 1986). Se han llevado a cabo diversas investigaciones con varias especies del género *Chenopodium*, de

las que se ha aislado el ascaridol (Figura 16), un metabolito secundario del que se tienen registros de poseer propiedades medicinales (Bonzani *et al.* 2003).

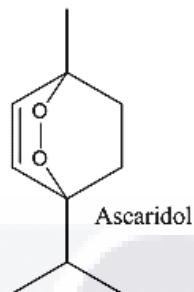


Figura 16. Ascaridol. Este compuesto (1-isopropil-4-metil-2,3-dioxabicyclo[2.2.2]oct-5-eno) se encuentra en el género *Chenopodium* (<http://duoclieu.net/Dlieuhoc/chuong5.html>).

**Farmacología:** Se tienen registros del desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de raíces pilosas de la especie *Ch. murale* L., con un 11.1% de eficiencia de transformación. En las raíces producidas de esta especie se identificaron los ácidos caféico, ferúlico y p-cumárico (Mitic *et al.* 2012).

#### 2.7.4. *Cucurbita foetidissima* H. B. Kunth

**Nombre común:** Calabacilla loca.

**Categoría taxonómica:** Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta; Superdivisión: Spermatophyta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Dilleniidae; Orden: Violales; Familia: Cucurbitaceae (Hanan Alipi & Mondragón Pichardo 2009).

**Descripción:** Planta rastrera, perenne de olor desagradable, de hojas triangular-ovaladas de 10 a 30 cm de largo; tiene flores monopétalas amarillentas masculinas y femeninas. Las flores masculinas se diferencian de las femeninas principalmente porque poseen un tamaño de hasta 12 cm de largo, mientras que las femeninas son de menor tamaño. El fruto es esférico de 7 cm, con manchas o bandas claras, una pulpa fibrosa muy amarga, y numerosas semillas fuertemente comprimidas ovado-oblongas, de aproximadamente 12

mm de largo. Conforme los frutos se maduran su color cambia de verde oscuro a amarillo. Posee además raíces que avanzan a gran profundidad. Los tallos tienen una longitud de hasta de 6 m, son ásperos, arrugados y a veces tienen finos pelillos; Sus hojas son alternas, correasas, de color verde grisáceo, triangular ovadas, de hasta 30 cm de largo, son ásperas al tacto con vellos blancos y venas muy prominentes. Posee zarcillos gruesos y lóbulos ligeramente angulares, y los peciolo son de 5 a 15 cm (Figura 17) (Eggl 2002; Barba Avila *et al.* 2003; Hanan Alipi & Mondragón Pichardo 2009).



Figura 17. *Cucurbita foetidissima* H. B. Kunth. Se muestran las flores y los frutos de la calabacilla loca (<http://climbers.lsa.umich.edu/>; <http://museum2.utep.edu/chih/gardens/list/species.htm>).

**Hábitat y distribución geográfica:** Se considera una planta nativa de México que crece en lugares áridos, arenosos o en llanuras, a una altura de 300 a 2130 msnm. Se ha encontrado en orillas de las vías del ferrocarril y de las carreteras. Se tienen registros de *C. foetidissima* H. B. Hunk en Baja California Norte, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora y Zacatecas, e incluso en Estados Unidos (Eggl 2002; Hanan Alipi & Mondragón Pichardo 2009).

**Usos:** Se considera una planta medicinal, ornamental y comestible, esto último siempre y cuando haya un procesamiento previo. Por ejemplo, las semillas pueden molerse y ser usadas como espesantes para elaborar jabón, o como cereales en diferentes platillos; en Estados Unidos las tribus nativas consideran a las semillas de *C. foetidissima* H. B. Kunth como un vermífida efectivo y seguro. De las semillas se ha obtenido también aceite comestible. El fruto se



utiliza para lavar la ropa, debido a la presencia de saponinas; los tallos, las hojas y las raíces son usados como laxativos, y como cataplasmas para el tratamiento de llagas y úlceras en la piel. Las raíces se emplean como edulcorante y estabilizante para diferentes postres. Se sugiere toxicidad por parte de las raíces y de las semillas germinadas, por lo que hay que tener cuidado en su consumo. (Eggli 2002; Barba Avila *et al.* 2003; Hanan Alipi & Mondragón Pichardo 2009; Kunth 2012).

**Fitoquímicos:** Las semillas son una rica fuente de proteína (29%) y aceite (28%) (Khoury *et al.* 1982). Se han determinado, en el aceite comestible obtenido a partir de las semillas, ácido linoleico (63%), proporciones altas de ácidos grasos insaturados a saturados, y bajas cantidades de ácido linolénico. Las cantidades reportadas de ácidos grasos presentes son similares a las que se reportan para el aceite obtenido de las semillas de girasol (DeVeaux & Shultz 1985). En extractos alcohólicos de raíces se han identificado nueve saponinas, siendo la de mayor importancia la saponina 3,28-bidesmosídico triterpenoide (Figura 18), ya que se encuentra en mayor cantidad, y se han reconocido sus glucósidos cucurbitacina B y E, cucurbitacina D e isocucurbitacina B (Khoury *et al.* 1982; Dubois *et al.* 1988; Gaidi *et al.* 2000; Eggli 2002).

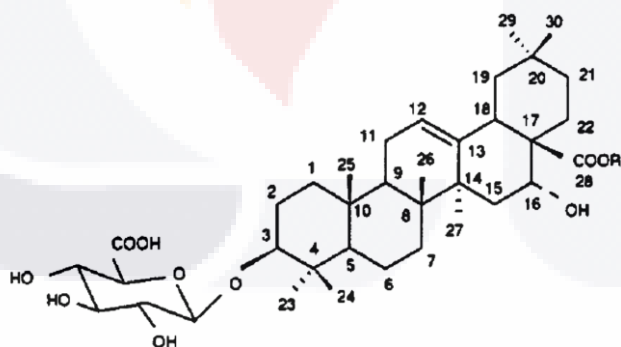


Figura 18. Foetidisimósido B. El 3,28-bidesmosídico triterpenoide se encuentra en *C. foetidissima* H. B. Kunth en cantidades importantes (Gaidi *et al.*, 2000).

**Farmacología:** En una investigación llevada a cabo en extractos alcohólicos de raíces, se encontró que éstos poseían propiedades farmacológicas, como acción oxitócica, efecto espasmolítico sobre el intestino aislado de rata y ratones, constricción de vasos sanguíneos del corazón de rata, y efectos de irrigación

(Gaidi *et al.* 2000). Los estudios químicos hechos al aceite comestible de las semillas de *C. foetidissima* H. B. Kunth han mostrado que éste poseen un óptimo índice de yodo e índice de saponificación, comparados con los valores de otros aceites comestibles; además de carecer de sustancias tóxicas para el consumo humano (Khoury *et al.* 1982). Se realizó una investigación acerca de la fermentación de la harina de semillas, donde el 52.2% de ésta produjo bioetanol, lo que sugiere es apropiada para producir este biocombustible. De igual forma, debido a la calidad del aceite que se puede obtener, es factible la producción de biodiesel (DeVeaux & Shultz 1985).

#### **2.7.5. *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.**

**Nombre común:** Palo azul, varaduz, palo dulce

**Categoría taxonómica:** Reino: Plantae; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Orden: Fabales; Familia: Fabaceae; Subfamilia: Faboideae; Tribu: Amorpheae (CONABIO 2009).

**Descripción:** Árbol o arbusto caducifólio, hermafrodita, normalmente de 3 a 6 m de altura. Posee hojas alternas, compuestas, pinnadas de 3 a 5 cm de largo, con folíolos de 10 a 15 pares por hoja, elípticos, de 7 a 13 mm de largo por 3 a 5 mm de ancho, tienen glándulas resinosas aromáticas. Sus tallos son ramificados de color café oscuro con una corteza externa amarilla, de textura ligeramente rugosa, escamosa. Cuando la corteza se seca, se puede extraer en placas irregulares de color oscuro de 1 mm de grosor. La corteza interna es de color pardo rojiza. La *E. polystachya* tiene inflorescencias dispuestas en racimos espigados terminales o subterminales, de 5 a 7 cm de largo; poseen un cáliz campanulado de 2.5 a 3 mm de largo, lobulados. Los frutos son vainas ligeramente curvadas, atenuadas en el ápice, pubescentes, de 7 a 9.5 mm de largo, con el estilo persistente, frágil e indehiscente, provisto con glándulas (Figura 19). Cada vaina contiene una semilla, que posee testa delgada y permeable al agua (Sprague Sargent 1892).



Figura 19. *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.  
(<http://conabio.inaturalist.org>).

**Hábitat y distribución geográfica:** Especie considerada nativa de México y ha sido reportada desde el sureste de Arizona (Estados Unidos) hasta Oaxaca. En la República Mexicana ha sido encontrada en Colima, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Morelos, Oaxaca, Puebla Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas. Esta planta se encuentra en forma abundante en zonas semicálidas con temperaturas entre los 12 y 19°C. Crece en lugares perturbados, en suelos pedregosos y de suelo somero. Se encuentra en bosques de encino, dpino-encino, espinoso, mesófilo de montaña, tropical caducifolio, tropical perennifolio y de matorral xerófilo (Sprague Sargent 1892).

**Usos:** Se tienen reportes desde el siglo XVI del uso “del palo para los males de los riñones, y de orina”, donde se tomaba el agua azul resultante del remojo, de media hora aproximadamente, de la madera (Acuña & Amat Guerri 2007). Especie muy usada para leña. Proporciona abundante forraje para el ganado bovino y caprino. Es empleada como planta medicinal, con la madera se prepara una infusión para el tratamiento de enfermedades renales y de la vesícula. Se le atribuyen además propiedades diuréticas (Sprague Sargent 1892).

**Fitoquímicos:** *E. polystachya* es considerada la principal fuente de la 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxisoflavona, compuesto que se encuentra en la madera (madera llamada anteriormente *Lignum nephriticum*) y que en solución emite una

coloración fluorescente (Figura 20) (Acuña & Amat Guerri 2007). Se han identificado y aislado además varios compuestos: grandes cantidades de coatlinas A y B (con estructuras C-β-glucopiranosil-α-hidroxi-dihidrochalcona) (Acuña & Amat Guerri 2007); tres alfa-hidroxi-dihidrochalconas, una con actividad insecticida (Alvarez & Delgado 1999); isoflavonas A y B (7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona y 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavona, respectivamente) (Pérez Gutiérrez *et al.* 2002); y 3,4,8,9-dimetilendioxiptero-carpano (Figura 20) (Jiménez González *et al.* 2008).

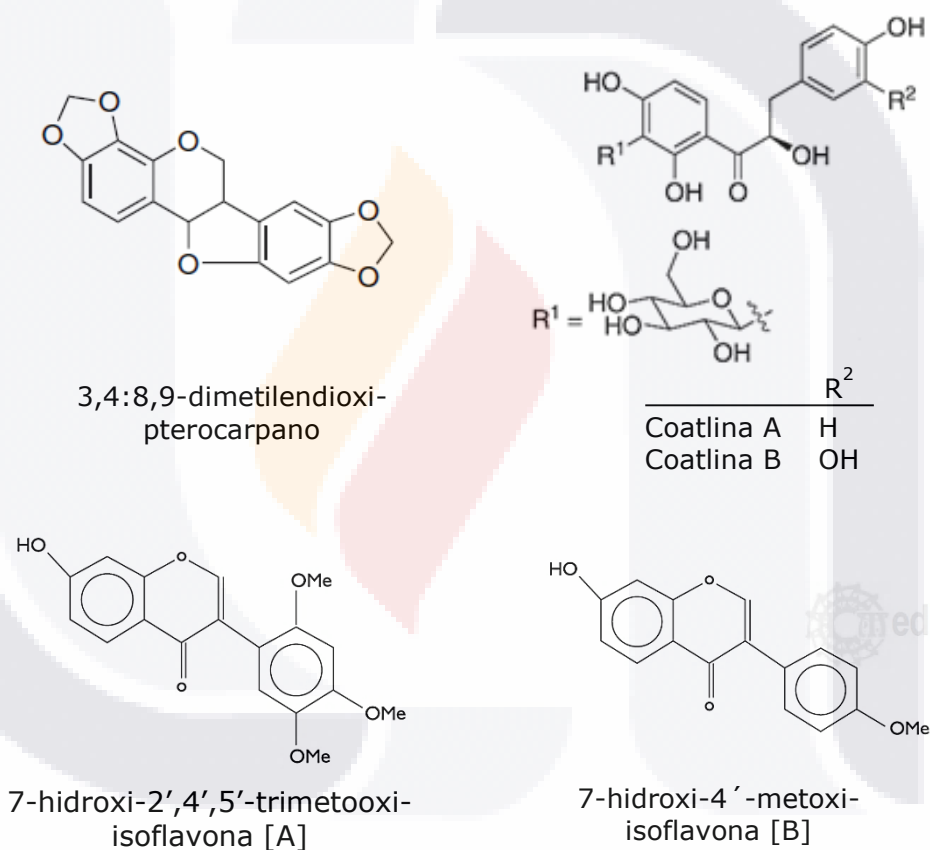


Figura 20. Fitoquímicos de interés encontrados en *E. polystachya* (Extraídos y adaptados de Jiménez González *et al.* 2008, Acuña & Amat Guerri 2008, Pérez Gutiérrez *et al.* 2002, con modificaciones.)

**Farmacología:** Por varios estudios llevados a cabo se sabe que los compuestos llamados pterocarpanos tienen una importante función como fitoalexinas, es decir, son sustancias con actividad antimicrobiana producidas como respuesta a

factores de estrés, tales como hongos o bacterias, encontradas en un gran número de especies de la familia *Fabaceae* (Jiménez González *et al.* 2008). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en ratas con urolitiasis inducida, se observó la reducción de cristales de oxalato y fosfato de calcio en orinas normal, anormal y artificial tratadas con la isoflavonas A y B (hasta 64.23% para isoflavona A y hasta 55.95% para la isoflavona B), lo que se traduce en una protección significativa dosis-dependiente de dichas isoflavonas (Pérez Gutiérrez *et al.* 2002). Se ha reportado que la coatlina B es la responsable de proporcionar una fuerte coloración azul fluorescente, en agua ligeramente alcalina a temperatura ambiente, la cual es responsable de la emisión azul del té de la madera (Acuña & Amat Guerri 2007).

#### **2.7.6. *Jatropha dioica* Sessé ex. Cerv.**

**Nombre común:** Sangregrado, sangre de grado o sangre de drago.

**Categoría taxonómica:** Reino: Plantae; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Orden: Malpighiales; Familia: Euphorbiaceae (NatureServe 2014).

**Descripción:** Pertenece a la familia Euphorbiaceae. Es una planta arbustiva de fisonomía inconfundible, de 50 a 150 cm de altura. Presenta tallos simples o poco ramificados, correosos y flexibles, creciendo cerca unos de otros formando colonias, de color café rojizo, con látex incoloro que se torna rojizo al contacto con el aire. Permanece sin hojas la mayor parte del año. En época de lluvias aparecen las hojas, agrupadas en fascículo, espatuladas a obovadas con borde entero o lobulado. Presenta flores pequeñas (aproximadamente 5 mm), blanquecinas, y tiene frutos asimétricos de aproximadamente 1.5 cm de largo y tienen una semilla en su interior (Figura 21) (González Elizondo *et al.* 2004; Wong Paz *et al.* 2010).



Figura 21. *Jatropha dioica* Sessé ex. Cerv.  
<http://swbiodiversity.org>; <http://www.wildflower.org/gallery>).

**Hábitat y distribución geográfica:** Se localiza en las zonas áridas y semiáridas del norte del país y de Estados Unidos al centro de México (González Elizondo *et al.* 2004).

**Usos:** Posee propiedades astringentes, por lo que se usa para diversas afecciones. El cocimiento se aplica a manera de cataplasma para tratar várices y golpes; las raíces y/o los tallos se mastican para calmar el dolor de muelas y fortalecer las encías; el látex se toma para curar las úlceras y se aplica para eliminar nubes en los ojos y curar los ojos irritados. Se reporta el uso del látex para tratar las erupciones de la piel, hemorroides, enfermedades venéreas y heridas. Se emplea también para la caída del cabello, darle brillo, para evitar la caspa y orzuela, mediante un cocimiento de los tallos, la planta entera, o la raíz machacada en agua (González Elizondo *et al.* 2004; Wong Paz *et al.* 2010).

**Fitoquímicos:** Se han reportado en diversas investigaciones constituyentes químicos contenidos en varias especies de *Jatropha*, como alcaloides, péptidos cíclicos, terpenos (un monoterpeno, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos), flavonoides, lignanos, cumarinas, lignoides-cumarinos, un glucósido no cianogénico, floroglucinoles, éster ferulatos, fenólicos, desoxipreusomerinas y ácidos grasos (Sabandar *et al.* 2013). En *J. dioica*, en la raíz, se han aislado taninos, terpenos (riolozatriona, citlalitriona y jatrofona), y un esteroil ( $\beta$ -sitosterol, reportado en fracciones de hexano provenientes de raíz en más del 90% de éstas) (Figura 22); de las raíces se ha obtenido un aceite esencial,

resinas, saponinas, un alcaloide y ácido oxálico; y de los tallos emana un látex con alto contenido en taninos (Dominguez *et al.* 1980; González Elizondo *et al.* 2004; Wong Paz *et al.* 2010; Silva Belmares *et al.* 2014). Se tienen reportes de concentraciones de 0.81 mg/g de planta del tanino ácido elágico, por lo que la *J. dioica* es considerada una fuente importante de este compuesto (Wong Paz *et al.* 2010).

**Farmacología:** Se han reportado varios fitoquímicos con propiedades importantes: la riolozatriona de *J. dioica* posee actividad antibacterial; la jatrofona presenta efectos antitumorales *in vitro*. Cabe destacar, que la estructura de la citlalitriona es muy parecida a la jatrofona, por lo que se está empleando para la elaboración de agentes anticáncer (Devappa *et al.* 2011). Hay reportes de la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* de extractos acuosos de raíz (Wong Paz *et al.* 2010). Por otro lado, extractos de hexano también de raíz, han mostrado actividad antimicrobiana contra los microorganismos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* y *Sporothrix xchenckii* (Silva Belmares *et al.* 2014).

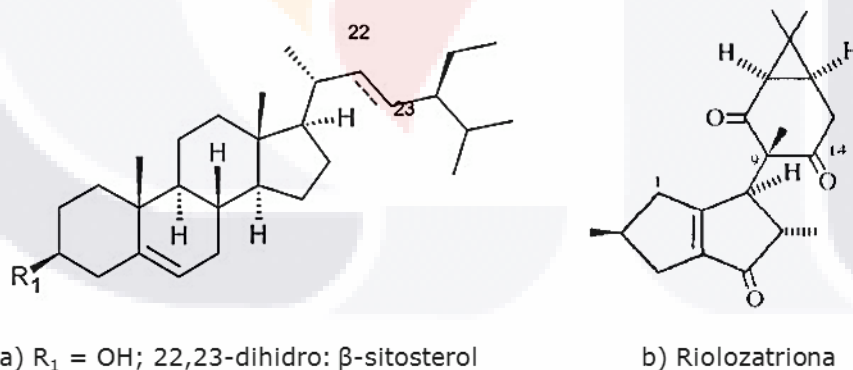


Figura 22. Algunos fitoquímicos de *J. dioica*. a) Esterol encontrado en cantidades importantes en raíz; y b) Rioloatriona, terpeno encontrado principalmente en raíz (Tomados de Sabandar *et al.* 2013 y Domínguez, *et al.* 1980, con modificaciones).

### 2.7.7. *Lepidium virginicum* L.

**Nombre común:** Lentejilla (lentejilla de campo).

**Categoría taxonómica:** Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta; Superdivisión: Spermatophyta; División: Magnoliophyta; Clase: Magnoliopsida; Subclase: Dilleniidae; Orden: Capparales. Familia: Cruciferae. Se reconocen algunas subespecies, siendo la de mayor importancia para México *L. virginicum* var. *Pubescens* (Greene) C. L. Hitch. localizada en la mayor parte del país. Las otras subespecies son *L. virginicum* var. *centrali-americanum* (Thell.) C. L. Hitch, situada desde el sur de México hasta Costa Rica; y *L. virginicum* var. *duranguense* C. L. Hitch, encontrada en Zacatecas y Durango (Perdomo Roldán *et al.* 2009).

**Descripción:** Es una hierba anual o bianual, relativamente pequeña (20 a 30 cm), por lo general erecta, muy ramificada. Presenta hojas basales hasta de 15 cm de largo y 5 cm de ancho, pinatífidas, estas hojas se secan antes de la fructificación; hojas del tallo más pequeñas con margen partido, aserrado o entero. Las flores son muy pequeñas, blancas y forman racimos largos. Los frutos son pequeños, verdes, ovales a orbiculares (semejantes a lentejas), de 3 a 4 mm y se encuentran sobre pedúnculos de dos a tres veces más grandes (Figura 23). *L. virginicum* var. *Centrali-americanum* (Thell.) C. L. Hitch. casi no presenta pétalos y tiene los pedicelos aplandados con un ala delgada; *L. virginicum* var. *duranguense* C. L. Hitch es grisácea por sus cilios y tiene frutos más pequeños (aproximadamente de 2.5 mm); y *L. virginicum* var. *ubescens* (E. L. Greene) Thell tiene hojas no lobadas, dos estambres y los frutos carecen de cilios (González Elizondo *et al.* 2004; Perdomo Roldán *et al.* 2009).

**Hábitat y distribución geográfica:** Se considera una especie nativa de México que se puede encontrar en la mayoría del territorio mexicano y en el Continente Americano. Se tienen reportes de esta especie en las Antillas, el Pacífico y Eurasia. Es una especie de hábitat ruderal y arvense, encontrándose en las orillas de caminos y en los alrededores de las casas. Se ha reportado su



presencia también en otras partes del mundo (González Elizondo *et al.* 2004; Perdomo Roldán *et al.* 2009).



Figura 23. *Lepidium virginicum* L. (<http://melanys.tripod.com/natives.htm>).

**Usos:** Se emplea para lavados vaginales y se toma para controlar hemorragias posparto, diarrea y dolor de estómago. Para problemas de la bilis los Tepehuanes la toman cruda. En Nayarit se utiliza su té para el dolor de riñones y en Michoacán para el dolor de aire. En Nuevo León para calmar dolor e inflamación de tracto digestivo. En otras partes de México las hojas molidas se aplican sobre la parte afectada para los "jotes" o granos y el té de las hojas se toma para la tos. También se emplea como alimento para las aves y como forraje para los animales. Se considera nociva en grandes cantidades (González Elizondo *et al.* 2004; Perdomo Roldán *et al.* 2009).

**Fitoquímicos:** Se ha identificado el bencil glucosinolato en raíces (Figura 24), el cual ha presentado actividad *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* (IC<sub>50</sub> de 20.4 µg/mL) (Calzada *et al.* 2003).

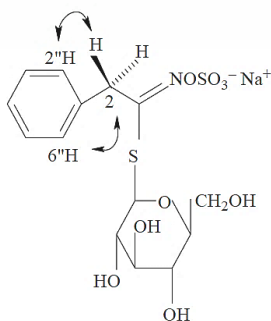
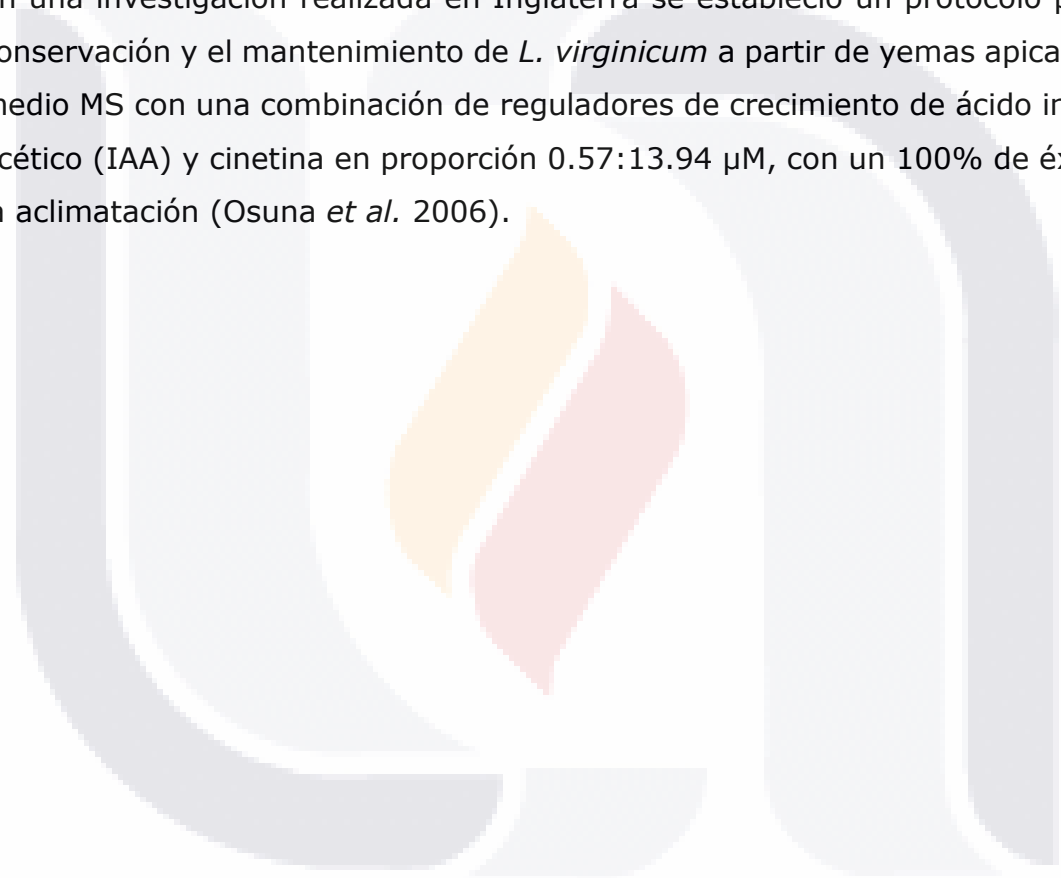


Figura 24. Bencil glucosinolato (Osuna *et al.*, 2006).

**Farmacología:** En un estudio realizado en el Hospital de Pediatría del IMSS en México, D. F., se encontró que el extracto metanólico crudo de raíces de *L. virginicum* presentó actividad antiprotozoaria contra los trofozoitos de la cepa de *Entamoeba histolytica* HMI-IMSS (IC<sub>50</sub> de 100.1 µg/mL) (Calzada *et al.* 2003); de igual forma, Osuna *et al.* (2006) reportaron una actividad antiprotozoaria mayor contra el mismo microorganismo de IC<sub>50</sub> 141.9 a 268.53 µg g/mL. En lo referente a estudios de microporpagación ya se tienen avances. En una investigación realizada en Inglaterra se estableció un protocolo para la conservación y el mantenimiento de *L. virginicum* a partir de yemas apicales, en medio MS con una combinación de reguladores de crecimiento de ácido indol-3-acético (IAA) y cinetina en proporción 0.57:13.94 µM, con un 100% de éxito en la aclimatación (Osuna *et al.* 2006).



### 3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales han tenido un amplio uso en todo el mundo debido a las propiedades que se les atribuyen, principalmente por aquellos grupos de la población con escasez de recursos y de servicios de salud. Sin embargo, se hace necesario realizar investigaciones encaminadas al estudio de dichas propiedades para respaldarlas. Otros países ya se han adelantado en la investigación y aplicación de productos obtenidos a partir de plantas, los cuales han encontrado metabolitos novedosos capaces de ayudar en el tratamiento de diferentes padecimientos, incluso de algunos considerados problemas de salud pública.

A lo largo de todo el territorio mexicano es posible encontrar un sinnúmero de especies de plantas con potencial medicinal, las cuales son usadas por gran parte de la población. Los diferentes tipos de clima han definido las especies vegetales de cada región. En Zacatecas, una región de clima semiárido mayoritariamente, se han encontrado diferentes plantas con potencial medicinal y forman parte de la cultura de las familias. Las hojas y semillas de *Chenopodium album* (cenizo) son usadas para el tratamiento de enfermedades parasitarias y renales; la infusión de la flor de *Bidens odorata* (aceitilla) se usa para tratar enfermedades del riñón, engrosar el pulmón, inflamación del estómago, purificar la sangre, entre otros usos; el agua de uso de *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo) es usada para la tos, la bronquitis y como antiparasitario; las semillas de *Cucurbita foetidissima* (calabacilla loca) son consideradas un vermífugo efectivo; la infusión de los tallos de *Eysenhardtia polystachya* (palo azul) es empleada para el tratamiento de enfermedades renales y de la vesícula; cataplasmas de las raíces y tallos de *Jatropha dioica* (sangregrado) son usados para calmar el dolor de muelas y fortalecer las encías, además su látex se usa para tratar los ojos irritados y heridas, y el cocimiento de la planta entera, para evitar la caída del cabello; y la infusión de la planta *Lepidium virginicum* (lentejilla) es empleada para trastornos gastrointestinales, lavados vaginales y en el control de hemorragias.

Las herramientas biotecnológicas han mostrado ser útiles en áreas como la alimentación, la medicina, la agricultura, entre otras, y en este sentido, podrían ser empleadas adecuadamente para atacar las problemáticas anteriormente descritas. Entre esas herramientas destaca el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, con la que ya se han propagando diversas especies y se ha utilizado para repoblar las regiones naturales que presentaban escasez de plantas. La generación y cultivo de raíces transformadas a través de la infección con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* es otra herramienta útil, ya que estas raíces pueden cultivarse *in vitro*, de forma masiva, y constituirse en una fuente alterna y permanente de los metabolitos potencialmente medicinales producidos por las plantas que, de forma natural, solo se encuentran en ciertas épocas del año.

A diferencia de México, en el ámbito internacional ya hay varios reportes de generación de raíces transformadas de especies vegetales medicinales. Hace falta también establecer condiciones para llevar a cabo la propagación *in vitro* de las plantas con potencial medicinal que se usan actualmente. En consecuencia, es necesario caracterizar fitoquímicamente a estas plantas, especialmente a las más empleadas en la región.

La información obtenida a partir de esta investigación será trascendental para que se puedan determinar y obtener metabolitos de interés. Esto abrirá la posibilidad de elaborar medicamentos naturales eficaces y seguros, con una disminución en los costos de producción, la identificación de los principios activos, y se podrán dar a conocer a la población las afecciones que podrán ser tratadas eficazmente por las plantas que están utilizando.

## 4. HIPÓTESIS

Algunas plantas silvestres de importancia medicinal de la región de Zacatecas serán susceptibles a la transformación mediante al menos una cepa de *Agrobacterium rhizogenes* para generar raíces transformadas, y podrán ser cultivadas *in vitro* y ser una fuente potencial para la producción de los principios activos de estas plantas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Generar mediante *A. rhizogenes* y cultivar *in vitro* raíces transformadas de siete especies de plantas de uso medicinal del Estado de Zacatecas, y determinar si estos cultivos tienen la capacidad de producir los principios activos que les confieren sus propiedades.

### 5.2. Objetivos específicos

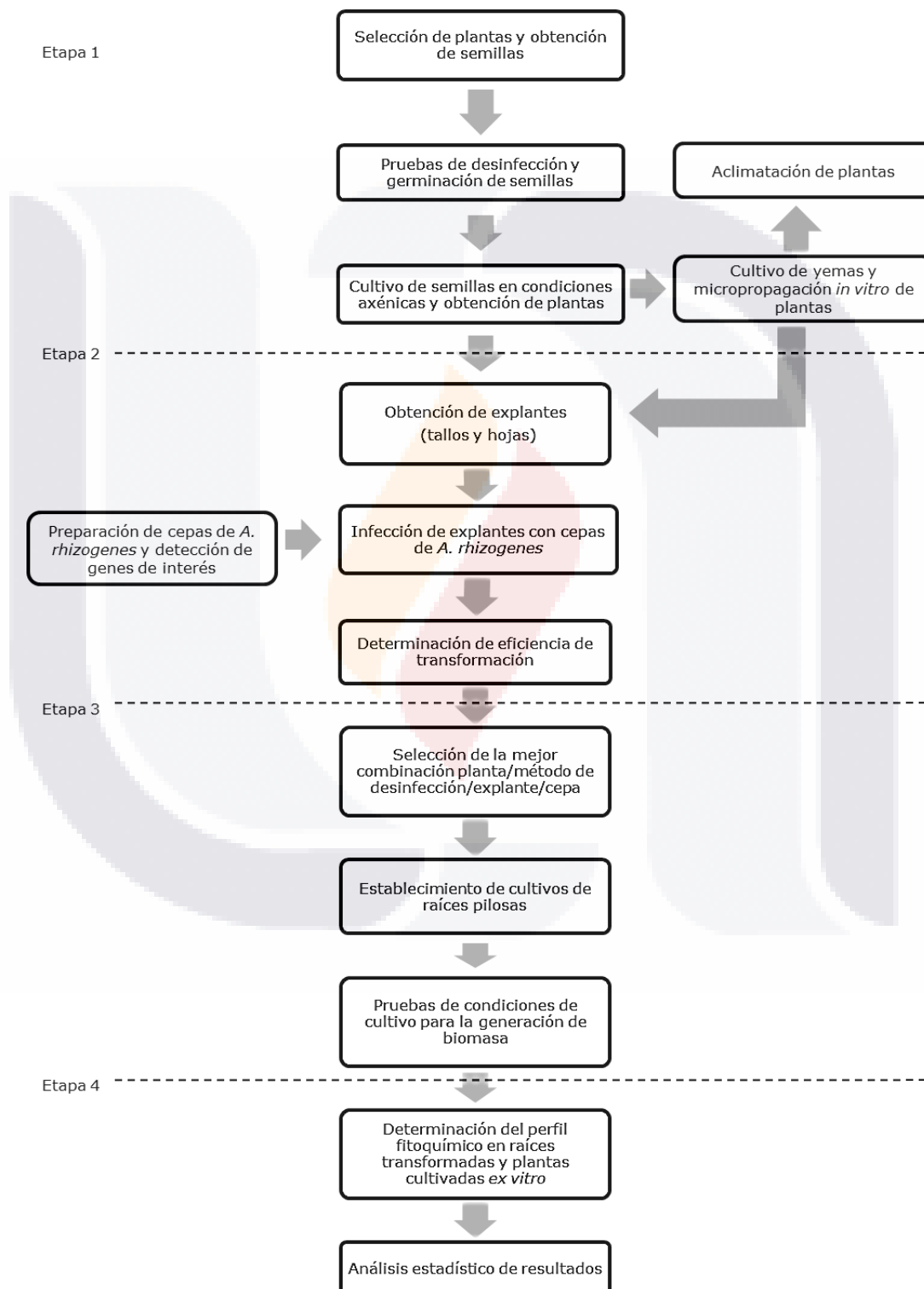
- 1.- Establecer cultivos y propagar *in vitro* las especies medicinales del Estado de Zacatecas: *Bidens odorata*, *Chenopodium album*, *Chenopodium graveolens*, *Cucurbita foetidissima*, *Eysenhardtia polystachya*, *Jatropha dioica* y *Lepidium virginicum*.
- 2.- Determinar la susceptibilidad a la transformación genética en diferentes explantes de *Bidens odorata*, *Chenopodium álbum*, *Chenopodium graveolens*, *Cucurbita foetidissima*, *Eysenhardtia polystachya*, *Jatropha dioica* y *Lepidium virginicum* con las cepas de *A. rhizogenes* A4/pESC4, K599 y ARqua1.
- 3.- Establecer sistemas de cultivo *in vitro* para generar biomasa de raíces pilosas de al menos cuatro especies que hayan resultado eficaces a la transformación con alguna de las cepas de *A. rhizogenes*.
- 4.- Hacer un análisis preliminar de los principios activos de raíces transformadas de al menos tres especies seleccionadas y comparar este perfil con el de plantas completas creciendo *ex vitro*.

### 5.3. Metas

- 1.- Para el primer objetivo específico, se probarán al menos 8 especies diferentes. Para ello, se llevará a cabo la colecta de semillas en diferentes regiones de Zacatecas y se establecerá su ubicación geográfica. Se determinarán las condiciones óptimas de germinación de las semillas, incluyendo el método de desinfección. De la misma manera, se probarán diferentes reguladores de crecimiento para realizar la micropropagación *in vitro* de las especies y, finalmente, se llevará a cabo su aclimatación.
- 2.- Para el segundo objetivo específico, se conocerá la susceptibilidad a la transformación de los tejidos cultivados *in vitro* con tres cepas de *A. rhizogenes*: A4, K599 y ARqua1.
- 3.- Para el tercer objetivo específico, se trabajará con al menos cuatro especies, seleccionando a aquellas cuyas raíces transformadas hayan mostrado la mayor tasa de generación de biomasa *in vitro*.
- 4.- Para el cuarto objetivo específico, se trabajará con al menos tres especies, seleccionando a aquellas cuyas raíces transformadas hayan mostrado la mayor tasa de generación de biomasa *in vitro*.

## 6. METODOLOGÍA

La metodología general para el presente trabajo se muestra en el siguiente diagrama.



## 6.1. Material vegetal

Se trabajó con semillas de plantas silvestres de *Chenopodium album*, *Cucurbita foetidissima* H. B. Kunth, *Jatropha dioica* Sessé ex. Cerv., *Lepidium virginicum* L., *Aloysia gratissima*, *Bidens odorata* Cav., *Chenopodium graveolens* Lag. y *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.

## 6.2. Obtención de plantas axénicas

### 6.2.1. Pruebas de desinfección y germinación de semillas

Se llevaron a cabo tres protocolos de desinfección diferentes dependiendo de las características de las semillas en particular. Todas las semillas se comenzaron a desinfectar con el protocolo 1. Conforme se avanzó y se fueron analizando los porcentajes de contaminación y las semillas en particular, se modificó el tiempo de exposición al cloro, así como se agregaron ciclos de vacío y con Captán®. Los protocolos de desinfección empleados se describen en seguida.

**Protocolo 1:** Las semillas se lavaron tres veces con una mezcla de agua corriente y unas gotas de jabón líquido (Dermoclean®). El proceso se llevó a cabo por 5 minutos para cada lavado. En seguida se lavaron por 30 segundos con etanol 70% y se enjuagaron inmediatamente dos veces con agua corriente. A continuación, las semillas se colocaron en una solución de cloro 10% por 20 minutos. Una vez transcurridos este tiempo se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Cada uno de los procedimientos antes mencionados se realizó en agitación suave.

**Protocolo 2:** Las semillas se lavaron tres veces con una mezcla de agua corriente y unas gotas de jabón líquido (Dermoclean®). El proceso se llevó a cabo por 5 minutos para cada lavado. En seguida se lavaron por 30 segundos con etanol 70% y se enjuagaron inmediatamente dos veces con agua corriente. A continuación, las semillas se colocaron en una solución de cloro 10% por 30 minutos. En los primeros 10 minutos, se sometieron a dos ciclos de vacío de 1 minuto cada uno. Al término de este tiempo se enjuagaron tres veces con agua



destilada estéril. Cada uno de los procedimientos antes mencionados se realizó en agitación suave.

**Protocolo 3:** Las semillas se lavaron con una mezcla de agua corriente y unas gotas de jabón líquido (Dermoclean®) durante 5 minutos. Inmediatamente después se sumergieron en Captán® y se mantuvieron ahí por aproximadamente 20 horas. Transcurrido el tiempo, las semillas se lavaron con agua corriente y se hicieron dos lavados más con jabón líquido. En seguida se lavaron por 30 segundos con etanol 70% y se enjuagaron inmediatamente dos veces con agua corriente. A continuación, las semillas se colocaron en una solución de cloro 10% por 30 minutos. En los primeros 10 minutos, se sometieron a dos ciclos de vacío. Una vez transcurrido los 30 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Cada uno de los procedimientos antes mencionados se realizó en agitación suave.

Las semillas de *B. odorata* recibieron un raspado de la testa previo a la desinfección. Posteriormente, se procedió con el protocolo 1.

### **6.2.2. Cultivo de semillas en condiciones axénicas**

Una vez elegido el protocolo de desinfección más adecuada para cada una de las semillas, éstas se cultivaron en frascos de vidrio de 100 mL que contenían 35 mL de medio Murashine Skoog (MS) semisólido (8 g L<sup>-1</sup> de agar y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa) sin reguladores de crecimiento vegetal (RCV). Se incubaron bajo fotoperiodos de 16 h luz. Se evaluaron el porcentaje de contaminación y el porcentaje de germinación.

### **6.3. Micropropagación de plantas axénicas**

Para obtener suficiente cantidad de plantas axénicas de las especies vegetales en estudio, se llevó a cabo la micropropagación mediante el cultivo de yemas axilares. Las yemas se obtuvieron de las plantas germinadas de 4 a 6 semanas,

mediante cortes en las regiones internodales (RI) (Figura 25). De esta forma, se obtuvieron explantes para la transformación: RI y hojas (H).

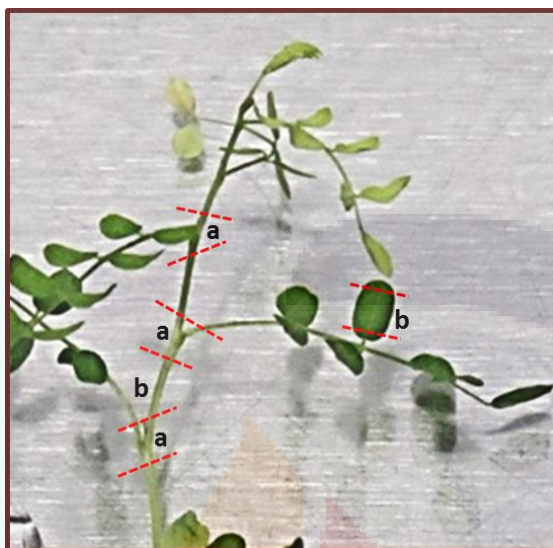


Figura 25. Obtención de explantes para transformación genética y micropropagación. Las líneas punteadas indican los cortes hechos a la planta. (a) Yemas empleadas en la micropropagación; (b) regiones internodales y hojas utilizados como explantes en la transformación genética mediada con *A. rhizogenes*.

El cultivo se hizo en 35 mL de medio MS semisólido en frascos de vidrio de 100 mL con 4 explantes por frasco, con un total de 40 explantes por tratamiento. Se probaron tres reguladores de crecimiento diferentes: N<sup>6</sup>-benciladenina (BA), N<sup>6</sup>-(2-isopentil)-adenina (2IP) y meta-Topolina (MT), todos en una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. El experimento se repitió al menos dos veces. Una vez obtenidos los brotes, se determinaron los siguientes parámetros: a) Promedio de brotes por explante; b) número de brotes totales, c) porcentaje de explantes con brotes, y d) la relación de número de brotes totales/número de explantes. Como control negativo se utilizaron 4 brotes sembrados en medio MS semisólido (35 mL) sin RCV.

De las especies de las cuales se obtuvo suficiente material, se tomaron nuevamente yemas para obtener plantas axénicas y llevarlas a aclimatación. Para ellos se utilizaron plántulas de 3 semanas, los cuales fueron cultivados en

medio MS semisólido y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol butírico (AIB) como agente enraizante (n = 10). También se inocularon 5 brotes en medio MS sin RCV para verificar su capacidad de enraizar bajo estas condiciones. A las dos semanas, ya con raíces, se comenzó el proceso de aclimatación, abriendo y cerrando la tapa de los frascos el primer día. Al segundo día se abrieron nuevamente los frascos permaneciendo así durante una hora. Al tercer día, las plántulas se sacaron del medio; las raíces se lavaron al chorro de agua para quitar el agar y se midieron la longitud de las raíces (en centímetros, cm) y el número de raíces por plántula. En seguida, se trasplantaron a maceta con suelo arcillo arenoso húmedo y se mantuvieron dentro de bolsas de polietileno transparentes durante 3 días. Al cuarto día se les hizo una abertura, manteniendo la humedad de la tierra. Una vez completados los 7 días, se abrió totalmente la bolsa y se asperjó ligeramente.

#### **6.4. Cepas de *Agrobacterium rhizogenes***

Se emplearon las cepas bacterianas de *A. rhizogenes* A4, la cual posee el vector binario pESC4 que tiene el gen de selección *nptII* que le confiere resistencia a kanamicina, y el gen reportero  $\beta$ -glucuronidasa (gen GUS); ARqua1, que contiene el gen de resistencia a estreptomina; ARqua1 fue transformada con el vector pCAMBIA, para conferirle resistencia a kanamicina, así como el gen reportero GUS; y la cepa K599, que contiene el gen para resistencia a kanamicina. Las cepas ARqua1 y K599, así como el vector pCAMBIA, fueron proporcionados por el Dr. Saúl Fraire Velázquez, del Laboratorio de Biología Integrativa de Plantas y Microorganismos, de la Unidad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

##### **6.4.1. Cultivo de cepas bacterianas en medio líquido**

Previo a la transformación genética de las plantas, las cepas bacterianas se cultivaron en el medio líquido correspondiente, preparado con los antibióticos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

necesarios para su crecimiento. Para la cepa A4 pESC4, el medio usado fue YMB (caldo extracto de levadura y extracto de malta) con rifampicina y kanamicina (cada uno en concentraciones de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ); para K599, el medio fue LB (medio de cultivo Luria Bertani) con kanamicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ); para ARqua1/pCAMBIA, el medio fue YMB con estreptomycinina ( $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) y con kanamicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ); y para ARqua1, YMB con estreptomycinina ( $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ). Los cultivos bacterianos se dejaron crecer de 48 a 72 h a  $28^\circ\text{C}$  en oscuridad. Los cultivos bacterianos se ajustaron a densidades aproximadas de  $10^7$  o  $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  mediante el estándar de Mc Farland (Scott 2011) y midiendo la densidad óptica a 620 nm.

#### **6.4.2. Inserción del vector pCAMBIA en cepa ARqua1**

La transformación de la cepa ARqua1 se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por (Weigel & Glazebrook 2006). Este método se fundamenta en la preparación de células bacterianas competentes y su subsecuente transformación. La bacteria se estableció en 2 mL de medio YMB líquido con estreptomycinina ( $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), y se dejó crecer durante 24 h en agitación constante a temperatura de  $28^\circ\text{C}$  en oscuridad. Una vez transcurrido el tiempo, la cepa bacteriana se agregó a un volumen de 50 mL del mismo medio y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica en un rango de 0.5 y 1.0 a 600 nm. El cultivo se enfrió en hielo y se centrifugó durante 8 a 10 min a  $10,000g$ , manteniendo una temperatura constante de  $4^\circ\text{C}$ . Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de  $\text{CaCl}_2$  20 mM frío. Las células se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

A  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de las células competentes congeladas mantenidas en hielo se les agregó  $1 \text{ } \mu\text{L}$  del plásmido pCAMBIA ( $1 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ). La mezcla se sumergió en  $\text{N}_2$  líquido durante 5 min, después se descongeló a temperatura ambiente por 5 a 10 min. Las células se transfirieron a 2 mL de medio YMB con estreptomycinina ( $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) y se incubaron en agitación constante durante 3 h a una temperatura de  $28^\circ\text{C}$ . Al finalizar, las células se centrifugaron a velocidad alta y

la pastilla se resuspendió en 0.5 mL de medio YMB líquido que contenía estreptomina ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y kanamicina ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Las células bacterianas transformadas se establecieron en placas de medio YMB con los antibióticos de selección antes mencionados.

### **6.4.3. Detección de genes de interés en cepas bacterianas**

La detección de los genes de interés para cada cepa bacteriana incluyó la extracción, amplificación y electroforesis en gel de agarosa del ADN de la cepa. Para la extracción de ADN se utilizó la solución STET (Tris HCl 1M pH 8.0, NaCl 2.5M, EDTA 0.5 M pH 8.0, y Tritón X-100 5% p/v) con lisozima. Se tomaron 1.5 mL del cultivo líquido de la cepa de *A. rhizogenes* y se centrifugaron durante 5 minutos a 12,000 rpm. La pastilla se resuspendió en 350  $\mu\text{L}$  de solución de STET con lisozima y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Después se colocó en baño maría por 40 segundos y se enfrió inmediatamente en baño de hielo. Se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm. Al sobrenadante se le agregaron 40  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 2.5 M (pH 5.2); enseguida se le añadieron 420  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío hasta que precipitó (se mantuvo a -20°C por 2 h). Después se centrifugó por 10 minutos a 12,000 rpm. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% y se dejó secar. La pastilla se resuspendió con 40  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C hasta su uso. La calidad del ADN se estimó mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm, y una electroforesis en gel de agarosa con buffer TAE (solución buffer de Tris-acetato-EDTA) 1X a 90 volts. La tinción del gel de agarosa se hizo con bromuro de etidio y se visualizó mediante UV.

La extracción del ADN bacteriano se utilizó para la amplificación de los genes, *rolB*, *gus*, *nptII* y *virD1*. Para el gen *rolB* (5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA y 3' TTAGGCTTTTTCTTCAGTTTACTGCAGC-3'), un fragmento de 780 pb; para el gen *gus* (5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG y 3' GTTTACGCGTTGCTTCCGCAA) se amplificó un segmento de 1200 pb; para el gen *nptII* (5'

TATTCGGCTATGACTGGGCA y 3' GCCAACGCTATGTCCTGAT) un fragmento de 517 pb; y para el gen *virD1* (5'-ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA y 3' GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA), un fragmento de 450 pb.

La amplificación se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en un termociclador BioRad Gene Cyclor. Se utilizaron 50  $\mu$ L de mezcla de reacción del kit 2x Ready Mix RED Taq (SIGMA®) con un ciclo inicial de 4 min a 94°C para una desnaturalización, 1 min a 55°C para un alineamiento, y 3 min a 72°C para una extensión; después se continuará con un segundo ciclo de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 3 min a 72°C. Para finalizar, se corrió un ciclo de 7 min a 72°C. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (p/v), en buffer TAE 1X con un voltaje de 90 volts. Para verificar del tamaño de los fragmentos deseados, se utilizó un marcado de peso molecular (MPM) SIGMA 038K6012. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó mediante UV.

### **6.5. Transformación genética mediada por cepas de *A. rhizogenes***

Para la transformación se siguió la metodología propuesta por (González-Díaz *et al.* 2006) con modificaciones en las densidades bacterianas. Se utilizaron un total de 80 explantes (40 de tallo y 40 de hoja, con 20 explantes por tratamiento), los cuales fueron obtenidos de las plantas crecidas *in vitro*. Estos explantes se colocaron en frascos que contenían 45mL de medio MS líquido con 100  $\mu$ L de una mezcla de antioxidantes ácido cítrico y ácido ascórbico (100 mg L<sup>-1</sup>) (6 explantes por frasco). Una vez obtenidos todos los explantes, estos fueron preincubados en 45 mL de medio MS líquido adicionado con 50  $\mu$ L de acetosiringona (100 mM) y con 5 mL de la cepa bacteriana previamente cultivada y ajustada a una densidad de 10<sup>7</sup> o 10<sup>9</sup> en medio líquido. Transcurrido el tiempo, los explantes se sacaron quitándoles el exceso de líquido mediante una gasa estéril, en medio MS semisólido sin antibióticos. Se incubaron a 28°C en la oscuridad, con tiempos de cocultivo de 48 y 72 horas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cumplido el tiempo de cocultivo, los explantes se transfirieron a 45 mL de medio MS líquido adicionado con cefotaxima ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ), para eliminar el exceso de bacteria. Se dejaron por 30 minutos y se transfirieron a medio MS semisólido (25 mL) con los antibióticos correspondientes, colocando 5 explantes por caja de Petri. Se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad durante 20 días. Al día 21, los cultivos se transfirieron a la luz. Los explantes se subcultivaron 4 semanas después del cocultivo bacteriano. Como control negativo se utilizaron 3 explantes, tanto de tallo como de hoja, incubados en caja Petri con medio MS semisólido (25 mL) con los antibióticos correspondientes, pero sin contacto con la solución bacteriana.

Para comprobar la presunta transformación de las raíces obtenidas, se llevó a cabo un análisis histoquímico y una PCR, amplificando los genes *rolB*, *gus*, *nptII* y *virD1*. El análisis histoquímico consiste en detectar la actividad del producto del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. Este se realizó en las raíces que presentaban un buen crecimiento y cuyos explantes fueron cocultivados con las cepas bacterianas A4/pESC4 y Arqua1/pCAMBIA. Las raíces se incubaron con una mezcla de reacción (buffer de fosfatos 1M, EDTA 0.25 M, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, Tritón X-100 10% v/v y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido 1 mM) a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta observar una coloración azul. Se eliminó la clorofila mediante el lavado de los tejidos con etanol al 70%. Se almacenaron en etanol al 70% a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Por otro lado, se hizo la extracción del DNA de las raíces presuntamente transformadas amplificando el gen *rolB* (*rolB1* 5'-ATGGATCCCAAAT TGCTATTCCTTCCACGA-3' y *rolB2* 5'-TTA GGCTTTTTTCTTCAGGTT TACTGCAGC-3'), correspondiente a un fragmento de 780 pb. La amplificación se realizó mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) en un termociclador BioRad Gene Cycler.

## **6.6. Detección de genes de interés en raíces presuntamente transformadas**

Para verificar la transformación de las raíces obtenidas, se amplificaron los genes *rolB*, *gus*, *nptII* y *virD1* en los cultivos de raíces GUS positivas derivadas de la transformación con la cepa A4/pESC4. Para ello se efectuó la extracción, amplificación mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa, del ADN de dichas raíces.

Para la extracción del ADN vegetal se utilizó el método CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Melody 1997) con ajustes en los volúmenes finales de resuspensión. El método consistió en pesar 300 mg del material vegetal y congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Transcurrido el tiempo, el material se pasó a un mortero y se maceró con nitrógeno líquido. Al polvo obtenido se le agregaron 700  $\mu\text{L}$  de la solución de extracción precalentada a  $60^{\circ}\text{C}$ ; se homogeneizó en vórtex y se incubó a  $60^{\circ}\text{C}$ , en baño maría, por 20 minutos. En seguida, se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió un volumen (aproximadamente 700  $\mu\text{L}$ ) de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v, saturado en buffer TE [Tris-EDTA]) y se agitó manualmente durante 2 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo añadiendo un volumen de isopropanol frío (aproximadamente 500  $\mu\text{L}$ ). La mezcla se incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Al día siguiente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 80%. La pastilla de ADN vegetal se secó a  $50^{\circ}\text{C}$  y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La calidad del ADN se estimó mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm, y una electroforesis en gel de agarosa con buffer TAE 1X a 90 volts. La tinción del gel de agarosa se hizo con bromuro de etidio y se visualizó mediante UV.

Una vez extraído el ADN de las raíces presuntamente transformadas, se llevó a cabo la amplificación de cada uno de los genes: un fragmento de 780 pb correspondiente al gen *rolB* empleando los cebadores 5'



ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA y 3' TTAGGCTTTTTTCTTCAGGTTTACT GCAGC; un fragmento de 1200 pb para el gen *gus* empleando los cebadores 5' GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG y 3' GTTTACGCGTTGCTTCCGCAA; un fragmento de 517 pb para el gen *nptII* con los cebadores 5' TATTCGGCTATGACTGGGCA y 3' GCCAACGCTATGTCCTGAT. Además, para verificar la ausencia de la cepa bacteriana en las raíces presuntamente transformadas, se amplificó un fragmento de 450 pb, con los cebadores 5' ATGTCGCAAGGACGTAAGCCCA y 3' GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA.

La amplificación se realizó mediante PCR en un termociclador BioRad Gene Cycler. Se utilizaron 50 µL de mezcla de reacción del kit 2x Ready Mix RED Taq (SIGMA®) con un ciclo inicial de 4 min a 94°C para una desnaturalización, 1 min a 55°C para un alineamiento, y 3 min a 72°C para una extensión; después se continuará con un segundo ciclo de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 3 min a 72°C. Para finalizar, se corrió un ciclo de 7 min a 72°C. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (p/v), en buffer TAE 1X con un voltaje de 90 volts. Para verificar del tamaño de los fragmentos deseados, se utilizó un MPM SIGMA 038K6012. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó mediante UV.

### **6.7. Establecimiento de cultivos de raíces transformadas y cuantificación de biomasa**

Las raíces presuntamente transformadas crecidas a partir de un solo explante, se sub cultivaron separadas de las raíces de los otros explantes inicialmente en medio MS semisólido, tanto en luz como en oscuridad. Para ello se utilizaron cajas Petri las cuales contenían 25 mL de medio MS semisólido con los antibióticos correspondientes para cada cepa bacteriana: 250 mg L<sup>-1</sup> de cefotaxima para todos los cultivos de raíces; 50 mg L<sup>-1</sup> de kanamicina para las raíces provenientes de las cepas K599 y A4/pESC4; y 100 mg L<sup>-1</sup> de estreptomycin para las raíces surgidas de la cepa A4/pESC4. Algunas se mantuvieron en luz y otras en oscuridad. Posteriormente se siguió el protocolo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

empleado para *Tylophora indica* con modificaciones (Chaudhuri *et al.* 2005). Este consistió en llevar a cada explante que derivó en raíces a frascos de 100 mL que contenían 25 mL de medio MS líquido, con los antibióticos antes descritos, probando tanto el reposo como la agitación constante (80 rpm), todos con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad (n=3). Se evaluó su capacidad de crecimiento o acumulación de biomasa, pesando cada uno de los cultivos en intervalos de 6 o 7 días, eliminando previamente el exceso de medio con ayuda de una gasa estéril. El medio de crecimiento no se cambió en el transcurso de la prueba. Para su evaluación se determinó el Índice de Crecimiento en Fresco (FGI):  $\text{Peso fresco final de biomasa} - \text{Peso fresco inicial del inóculo} / \text{Peso fresco inicial del inóculo}$  (Jacob & Malpathak 2005).

Por otro lado, a las raíces que presentaron problemas en la eliminación de la bacteria transformante, se les hizo cambios de medio cada tercer día, durante las primeras 4 semanas, cambiando después a intervalos de 7 días, reduciendo gradualmente la concentración de cefotaxima hasta  $100 \text{ mg L}^{-1}$  y su completa eliminación.

Las raíces fueron evaluadas para la presencia o ausencia de bacteria cultivando segmentos de ellas en caja Petri con medio YMB semisólido, en oscuridad a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 72 h y mediante la amplificación del gen *virD1*. Dichas pruebas se llevaron a cabo cada 7 días. Una vez comprobada la completa eliminación de la bacteria transformante, las raíces fueron sub cultivadas cada 4 semanas en medio MS líquido sin cefotaxima.

Una vez obtenidos cultivos de raíces sin presencia bacteriana y con crecimiento constante, éstos se emplearon para evaluar el efecto del medio de cultivo sobre su capacidad para acumular biomasa. Para ello se probaron tres medios de cultivo: MS, MS a la mitad de su concentración ( $\text{MS}^{1/2}$ ) y Gamborg (B5), todas en medio líquido adicionados con sacarosa a la concentración establecida en los protocolos. Se inocularon  $500 \pm 5 \text{ mg}$  en peso fresco (pf) de raíces, equivalente a  $35.5 \text{ mg}$  en peso seco (ps) en matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 15 mL de medio líquido ( $2.3 \text{ g ps L}^{-1}$ ) (n=8). En ambos experimentos, se determinaron el día de mayor acumulación de biomasa y el FGI.

## **6.8. Análisis preliminar de principios activos de raíces transformadas**

El análisis preliminar de los principios activos se llevó a cabo mediante la elaboración de extractos con diferentes solventes y su análisis posterior en cromatografía en capa fina (TLC) (Uddin *et al.* 2012, Wagner & Bladt 1996).

### **6.8.1. Preparación del extracto del material vegetal**

El material vegetal, lavado previamente, se secó a 25°C durante 48 h. Éste se molió, pesó y se sumergió en metanol en una relación 1:10. Se le dieron 3 ciclos de sonicación de 10 min cada uno y se dejó en reposo, tapado, durante 72 h. El extracto obtenido se recuperó y se hicieron extracciones sucesivas con n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, para obtener diferentes fracciones. Por otro lado, partiendo del material vegetal seco, se hizo una extracción adicional con agua destilada, con agitación ocasional.

### **6.8.2. Análisis preliminar mediante TLC**

Para el análisis preliminar de los fitoquímicos mediante TLC (Wagner & Bladt 1996) se utilizaron placas de aluminio recubiertas con sílica gel 60F de 5 x 5 cm, empleando diferentes sistemas de solventes y revelado para la separación e identificación de los fitoquímicos.

#### **6.8.2.1. Derivados del antraceno**

Se utilizaron 2 µL de extracto metanólico. El sistema de solventes que se utilizó fue acetato de etilo-metanol-agua destilada (100:13.5:10). La detección se hizo mediante luz UV a 254 nm y la reacción de Bornträger. En la primera, todos los derivados del antraceno se observan como manchas oscuras (apagado de la fluorescencia); en la segunda, las antraquinonas se observan como manchas

rojas en el visible y en UV a 365 nm, y las antronas y antranoles, amarillas, también en el visible, y como una fluorescencia amarilla brillante en UV a 365 nm.

#### **6.8.2.2. Aceites esenciales**

Se utilizó el extracto de n-hexano: 8  $\mu$ L para las raíces transformadas (RT) y 4  $\mu$ L para las raíces (R) y la planta completa sin transformar (PC). El sistema de solventes que se utilizó fue hexano-acetato de etilo (93:7). La detección se hizo mediante la visualización de la placa bajo luz UV-365 nm y en el espectro visible previo al asperjeo con el reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico (calentado por 10 seg a 100 °C). En la primera, la presencia de aceites esenciales resulta en la aparición de zonas oscuras (apagado de la fluorescencia); y en con el reactivo revelador, se observan zonas de color azul fuerte, verdes, rojas y cafés.

#### **6.8.2.3. Flavonoides**

Se utilizó el extracto metanólico: 2  $\mu$ L para RT y 1  $\mu$ L para R y PC. El sistema de solventes que se utilizó fue acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua destilada (100:11:11:26). La detección se hizo mediante: 1) luz UV-254 nm, con la visualización de zonas oscuras; y 2) luz UV-365, en la que, dependiendo del tipo de estructura, los flavonoides se observan como amarillo oscuro, o como verde o azul fluorescente.

#### **6.8.2.4. Saponinas**

Se utilizó el extracto etanólico: 4  $\mu$ L para RT y 1.5  $\mu$ L para R y PC. El sistema de solventes que se utilizó fue cloroformo-ácido acético glacial-metanol-agua (64:32:12:8). La detección se hizo mediante: 1) luz UV-254 nm y UV-365 nm, con la visualización de zonas oscuras; y 2) reactivo de anisaldehído-ácido sulfúrico (temperatura de 100 °C por 10 seg), mediante la identificación en el

visible de zonas de color azul, azul-violeta y rojo o amarillo-café, y bajo luz UV-365 nm, como zonas azules, violetas y verdes fluorescentes.

#### **6.8.2.5. Glicósidos de diterpeno, triterpenos y esteroides**

Se utilizaron 2  $\mu$ L de extracto acuoso. El sistema de solventes que se utilizó fue cloroformo-metanol-agua destilada (65:25:4). La detección se hizo empleando el reactivo de anisaldehído-ácido sulfúrico (temperatura de 100°C durante 10 seg), observándose en el visible como zonas azules, azul-violeta, rojas o café-amarillas, y bajo luz UV-365 nm como zonas azules, violeta o verde fluorescentes.

#### **6.8.2.6. Triterpenos**

Se utilizó el extracto metanólico: 2  $\mu$ L para RT y 1  $\mu$ L para R y PC. El sistema de solventes que se usó fue acetato de etilo-ácido acético glacial-ácido fórmico-agua destilada (100:11:11:26). La detección se hizo con el reactivo de Liebermann-Burchard (temperatura de 110 °C por 10 seg), visualizándose posteriormente como zonas azul-violeta y rojo-violeta.

El reactivo de Dragendorff se prepara mediante la elaboración de dos soluciones: Solución A: se disolvieron 0.65 g de nitrato básico de bismuto en 2 mL de HCl concentrado y 10 mL de agua destilada. Solución B: se disolvieron 6 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Una vez preparadas las dos soluciones, éstas se mezclaron en volúmenes iguales (1:1), y se les agregó 22 mL de HCl diluido (7 mL de HCl con 15 mL de agua destilada) y 400 mL de agua destilada. El reactivo se almacenó en frasco ámbar a temperatura ambiente.

## **6.9. Análisis estadístico de resultados**

Previo al análisis estadístico de los resultados con los diferentes tratamientos de micropropagación, se hicieron pruebas de hipótesis por pares para el análisis de las medias de las repeticiones de los experimentos (t de Student, con un nivel de significancia del 95%), usando para ello el programa Minitab 16.1.0 Statistical Software. Una vez llevado a cabo lo anterior, se procedió a hacer el análisis estadístico correspondiente. Dicho análisis se hizo con la ayuda del software R versión 3.2.2. El análisis de los brotes obtenidos en la micropropagación y de las raíces obtenidas en la transformación genética, se hizo empleando la regresión binomial negativa. Y para determinar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos empleados en la transformación, se aplicó ANOVA (análisis de varianza) de un solo factor. Para el análisis de la longitud obtenida de los brotes de la micropropagación, se aplicaron primeramente pruebas para verificar el cumplimiento de los supuestos requeridos, y se realizó el ANOVA de un solo factor completamente al azar para evaluar la influencia del mismo sobre la variable de respuesta, empleando la prueba LSD con un nivel de significancia de 0.05. De esta forma, se determinaron diferencias significativas entre las medias de los diferentes tratamientos. Además, para evaluar el efecto que tienen cada uno de los RCV sobre la longitud de los brotes, se llevó a cabo la regresión lineal. Los datos se representan con la media  $\pm$  error estándar (EE).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Obtención de plantas axénicas

#### 7.1.1. Selección de plantas y obtención de semillas

Se llevó a cabo la selección de las plantas medicinales a emplear en base a su uso en la región de Zacatecas y a su potencial de uso (Figura 26).

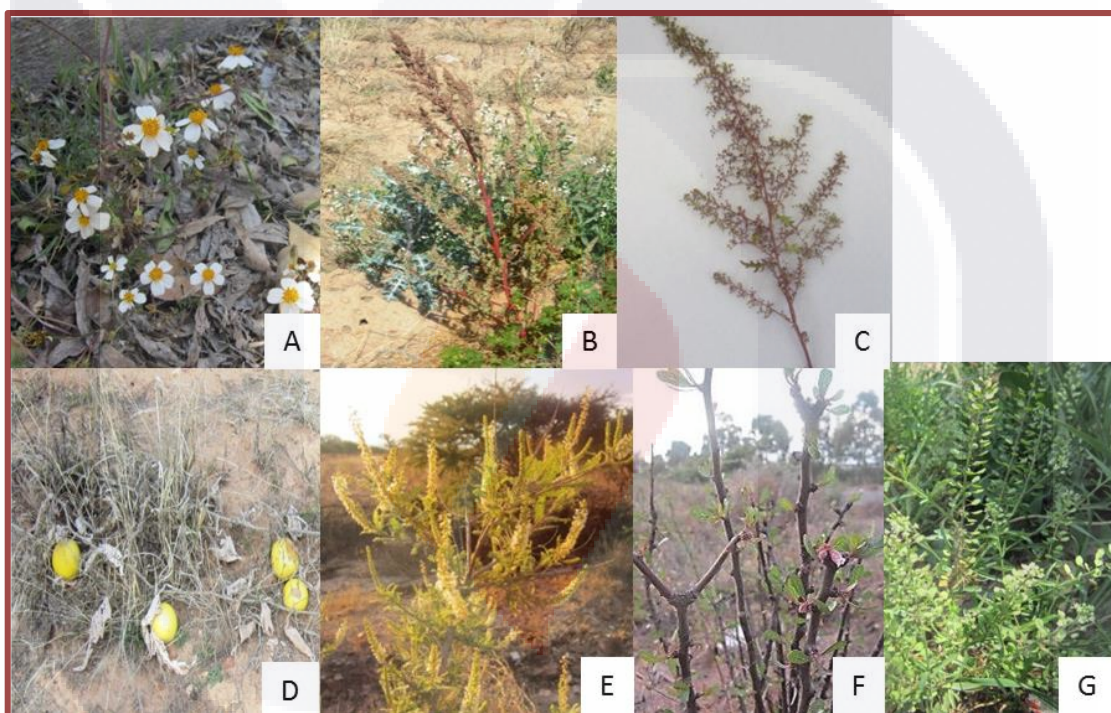


Figura 26. Plantas medicinales seleccionadas. A: *Bidens odorata* Cav.; B: *Chenopodium album*; C: *Chenopodium graveolens* Lag.; D: *Cucurbita foetidissima* H. B. Kunth; E: *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg.; F: *Jatropha dioica* Sessé ex. Cerv.; y G: *Lepidium virginicum* L.

De estas plantas, se colectaron semillas en diferentes lugares de la región de Zacatecas (**Tabla 4**) muestreando de 5 a 10 plantas aproximadamente, dependiendo de la especie.

**Tabla 4.** Registro de colecta de semillas de las especies medicinales.

Especie vegetal	Municipio	Localidad	Posición geográfica	
			Norte	Oeste
<i>B. odorata</i>	Ojocaliente	Triana	22°25'58.93"	102°11'32.12"
<i>C. album</i>	Ojocaliente	Triana	22°26'08.00"	102°10'53.35"
<i>C. graveolens</i>	Zacatecas	Zacatecas	22°46'12.85"	102°33'28.85"
<i>C. foetidissima</i>	Ojocaliente	Triana	22°26'10.87"	102°10'52.18"
<i>E. polystachya</i>	Luis Moya	Luis Moya	22°26'07.32"	102°14'20.73"
<i>J. dioica</i>	Luis Moya	Griegos	22°26'35.48"	102°12'43.82"
<i>L. virginicum</i>	Ojocaliente	Triana	22°26'02.59"	102°11'31.87"

### 7.1.2. Pruebas de desinfección y germinación de semillas

Las semillas de las especies de *C. album*, *C. foetidissima*, *C. graveolens*, *L. virginicum*, *J. dioica* y *E. polystachya* se desinfectaron sin ningún problema con el protocolo 1, mientras que las semillas de *B. odorata* presentaron niveles altos de contaminación con el mismo protocolo. Por lo mismo, se probaron los protocolos 2 y 3. Desafortunadamente, la contaminación no disminuyó. En observaciones con el estereoscopio se pudo observar la contaminación que presentaban las semillas de *B. odorata* Cav. así como rugosidad, presencia de barbillas y algo de pilosidad (Figura 27).



Figura 27. Semillas de *B. odorata*. Se observa la testa rugosa y a contaminación.



Se decidió entonces realizar un segundo muestreo. Las semillas estuvieron mucho más limpias y sin contaminación visible aparente. El protocolo 1 fue el empleado para su desinfección, previo un raspado de la testa con bisturí para quitar las barbillas y la pilosidad. Los resultados fueron favorables: se logró la desinfección completa.

No hubo presencia de contaminación en el cultivo *in vitro* de las semillas desinfectadas (Figura 28). En cuanto a la germinación, los resultados más bajos se observaron para las semillas de *C. graveolens* (10%) y de *B. odorata* (17%); mientras que el 100% de germinación se obtuvo en las semillas de *C. album*, *C. foetidissima* y *E. polystachya* (**Tabla 5**). También se presentaron diferentes tiempos de germinación para cada una de las especies.

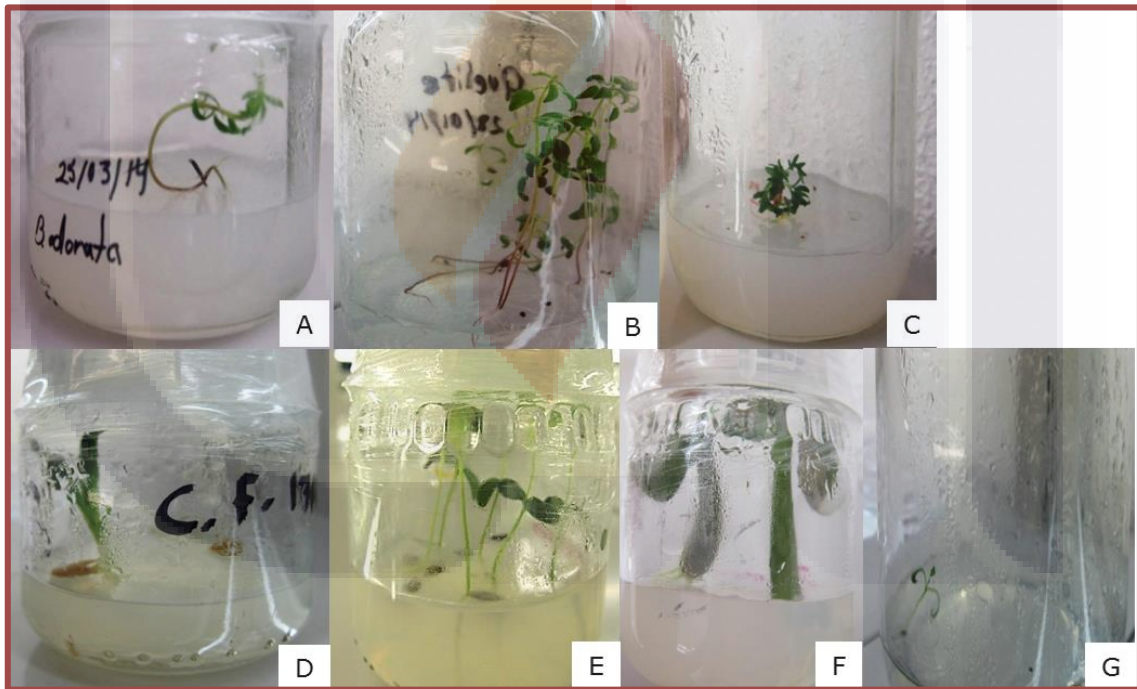


Figura 28. Germinación *in vitro* de semillas. Las semillas se germinaron en medio MS semisólido sin adición de RCV. Se observan plántulas de diferentes tiempos de germinación. A: *Bidens odorata*, 8 sem.; B: *Chenopodium album*, 5 sem.; C: *Chenopodium graveolens*, 6 sem.; D: *Cucurbita foetidissima*, 2 sem.; E: *Eysenhardtia polystachya*, 2 sem.; F: *Jatropha dioica*, 2 sem.; y G: *Lepidium virginicum*, 5 sem.

**Tabla 5.** Resultados de la germinación de las especies de plantas medicinales.

Especie de planta	Germinación (%)	Tiempo de germinación (días)	Tamaño de muestra
<i>Bidens odorata</i>	17	40	68
<i>Chenopodium album</i>	100	7	60
<i>Chenopodium graveolens</i>	10	7	81
<i>Cucurbita foetidissima</i>	100	4	20
<i>Eysenhardtia polystachya</i>	100	7	18
<i>Jatropha dioica</i>	58	5	17
<i>Lepidium virginicum</i>	45	34	60

### 7.1.3. Obtención de plantas axénicas

En base a los resultados obtenidos de las pruebas de desinfección, las semillas se cultivaron siguiendo el protocolo 1, con el raspado de la testa previo a la desinfección para las de *B. odorata*.

Los cultivos *in vitro* de las semillas han generado plantas axénicas, que han sido utilizadas tanto para la obtención de explantes para su transformación mediada con *A. rhizogenes*, como para la propagación de las mismas mediante el cultivo de sus yemas axilares.

## 7.2. Micropropagación de plantas axénicas mediante yemas axilares

Todas las especies de plantas medicinales manejadas en el proyecto, a excepción de la *J. dioica*, fueron micropropagadas exitosamente con los tres reguladores de crecimiento. En cuanto a *J. dioica*, no hubo una respuesta favorable a la adición de los mismos (tasa de multiplicación menor a 1) (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Resultados de la micropropagación de las especies de plantas medicinales.

<b>Tratamiento</b>	<b>Promedio de brotes por explante</b>	<b>Número de explantes</b>	<b>Número de brotes totales</b>	<b>Porcentaje de explantes con brotes</b>	<b>Número de brotes totales/número de explantes</b>
<b><i>Bidens odorata</i></b>					
MS (sin RCV)	3.0 ± 0.3	12	36	100 ± 0.00	3.0 ± 0.0b
MS + BA	5.5 ± 0.4*	80	435	87.5 ± 0.8	5.5 ± 0.0a
MS + 2IP	4.9 ± 0.3*	80	362	95.0 ± 0.4	4.7 ± 0.0a
MS + MT	3.5 ± 0.3	80	280	85.0 ± 0.0	3.5 ± 0.0b
<b><i>Chenopodium album</i></b>					
MS (sin RCV)	1.1 ± 0.1	20	21	100.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0c
MS + BA	2.4 ± 0.1**	80	188	100.0 ± 0.0	2.4 ± 0.0a
MS + 2IP	1.8 ± 0.1*	76	139	98.6 ± 0.2	1.8 ± 0.0b
MS + MT	1.8 ± 0.1*	80	154	96.3 ± 0.2	1.9 ± 0.0b
<b><i>Chenopodium graveolens</i></b>					
MS (sin RCV)	1.8 ± 0.8	4	7	100	1.8
MS + BA	1.5 ± 0.2	40	60	73	1.5
MS + 2IP	1.3 ± 0.2	39	51	72	1.3
MS + MT	1.3 ± 0.2	40	58	78	1.3
<b><i>Cucurbita foetidissima</i></b>					
MS (sin RCV)	1.0 ± 0.1	12	12	91.7 ± 3.4	1.0 ± 0.0
MS + BA	2.5 ± 0.1*	80	200	96.3 ± 0.6	2.5 ± 0.0
MS + 2IP	1.8 ± 0.1	80	127	96.3 ± 0.6	1.6 ± 0.1
MS + MT	1.2 ± 0.1	80	96	80.0 ± 0.0	1.2 ± 0.0
<b><i>Eysenhardtia polystachya</i></b>					
MS (sin RCV)	1.0 ± 0.0	12	12	100 ± 0.0a	1.0 ± 0.0a
MS + BA	1.3 ± 0.2*	80	105	63.8 ± 0.6bc	1.3 ± 0.0bc
MS + 2IP	0.6 ± 0.1	80	48	50.0 ± 1.2c	0.6 ± 0.0c
MS + MT	1.4 ± 1.0*	80	55	81.3 ± 1.0ab	0.7 ± 0.0ab
<b><i>Jatropha dioica</i></b>					
MS (sin RCV)	0.2 ± 0.2	6	1	17	0.2
MS + BA	0.3 ± 0.1	20	5	25	0.3
MS + 2IP	0.2 ± 0.1	20	4	30	0.2
MS + MT	0.5 ± 0.1	40	21	38	0.5
<b><i>Lepidium virginicum</i></b>					
MS (sin RCV)	2.2 ± 0.2**	12	26	100 ± 0.0	2.2 ± 0.1
MS + BA	1.6 ± 0.1	85	246	95.0 ± 0.4	1.7 ± 0.0
MS + 2IP	1.4 ± 0.1*	88	119	90.0 ± 0.4	1.7 ± 0.0
MS + MT	1.5 ± 0.1	86	125	98.8 ± 0.2	1.6 ± 0.0

Se muestra la media ± EE de dos réplicas. Asteriscos indican diferencias significativas con respecto al tratamiento sin adición de RCV ( $p \leq 0.05$ ). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de una misma especie de planta (Tukey,  $\alpha$  0.05). MS (sin RCV): Medio MS sin adición de RCV, tratamiento control; MS + BA: medio adicionado con N<sup>6</sup>-benciladenina; MS + 2IP: medio adicionado con N<sup>6</sup>-(2-isopentil)-adenina; y MS + MT: medio adicionado con meta-Topolina.

***Bidens odorata***. La adición de los RCV BA y 2IP al medio MS resultó en un mayor número de brotes con respecto a la no adición de los mismos (**Tabla 6**). Las yemas cultivadas en el tratamiento de MS con 2IP generaron un mayor porcentaje de brotes. Sin embargo, la mayor tasa de multiplicación se presentó en el medio adicionado con BA. En las observaciones fenotípicas, los brotes obtenidos a partir de la adición de BA exhibieron callo y en general una buena calidad, con abundantes hojas y con solo hiperhidricidad en las hojas de abajo y en algunos tallos (Figura 29, B), sin presencia de raíces. El tratamiento con 2IP resultó en brotes de muy buena calidad, sin hiperhidricidad, en los que muchos presentaron raíces, al igual que los crecidos en el medio MS sin RCV (Figura 29, A y C). En lo referente al tratamiento de MS + MT, los brotes presentaron callo, muchas hojas con hiperhidricidad, sobre todo las cercanas al medio, así como ausencia de raíces (Figura 29, D).



Figura 29. Micropropagación de *Bidens odorata* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>. Observaciones hechas a las 4 semanas de cultivo. A: MS sin RCV (control); B: MS + BA; C: MS + 2IP; y D: MS + MT.

Con respecto al proceso de aclimatación, las plántulas obtenidas tanto del medio MS + AIB como del MS tuvieron una respuesta a nivel de raíz diferente. En cuanto a la longitud de las raíces surgidas, las provenientes del medio que solo contenía MS fue más grande ( $8.3 \pm 0.5$  cm) que las cultivadas con el agente enraizante ( $5.9 \pm 0.5$  cm) (Figura 30).



Figura 30. Plantas de *Bidens odorata* crecidas a partir del cultivo de brotes en medio MS semisólido con ácido indol butírico (AIB,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Observaciones hechas a las 2 semanas de cultivo (MS,  $n = 5$ ; MS + AIB,  $n = 10$ ).

A pesar de ello, el número mayor de raíces obtenidas por plántula se presentó en el medio adicionado con AIB ( $7.7 \pm 0.5$ ). En el primer proceso de aclimatación se tuvo el 10 % de sobrevivencia en el invernadero, y en la repetición, el 75 % (Figura 31). En el primer proceso de aclimatación se observó la presencia de hongo en el 90 % de las plantas, atribuido a un exceso de humedad. Por lo que, en el segundo proceso de aclimatación, se modificó el tiempo de adaptación al medio exterior, disminuyendo su permanencia dentro de la bolsa de polietileno. Actualmente se tienen plantas en invernadero en floración (Figura 31, B).

***Chenopodium album***. Las yemas provenientes de esta especie respondieron bien a los tres RCV, siendo el más destacado el tratamiento de MS con BA, con el mayor promedio de brotes por explante, así como tasa de multiplicación (**Tabla 6**). En las observaciones realizadas, los brotes provenientes del cultivo con BA presentaron callo, hojas grandes y pigmentadas, con ausencia de raíces (Figura 32, B), con hiperhidratación en general.



Figura 31. Plantas de *Bidens odorata* en invernadero. A: proceso de aclimatación (7 días); B: planta de 2 meses.

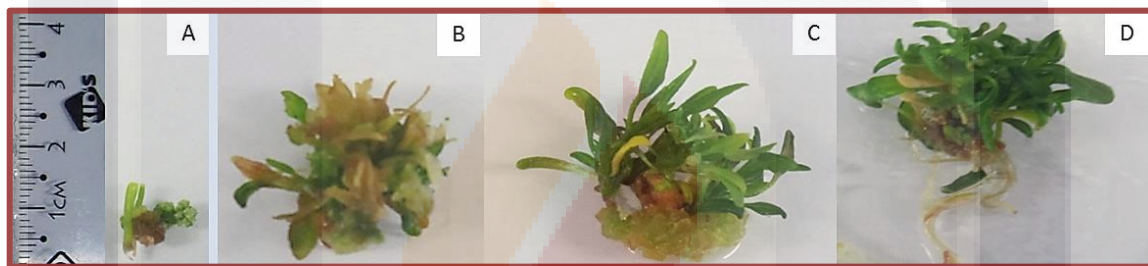


Figura 32. Micropropagación de *Chenopodium album* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Observaciones hechas a las 4 semanas de cultivo. a) MS sin RCV (control); b) MS + BA; c) MS + 2IP; y d) MS + MT.

El tratamiento con 2IP exhibió callo abundante, con algunos brotes hiperhidratados y sin raíces (Figura 32, C); y el tratamiento con MT presentó brotes sanos y la mayoría con raíces (Figura 32, D). Los brotes crecidos en el medio MS sin RCV tuvieron escasa hojas y tallos de menor tamaño que con la adición de los RCV (Figura 32, A).

Con respecto al proceso de aclimatación, las raíces desarrolladas en las plántulas fueron diferentes en relación con la longitud y al número de ellas. La longitud de las raíces provenientes del medio que solo contenía MS fue más menor ( $1.9 \pm 0.3 \text{ cm}$ ) que las cultivadas con el agente enraizante ( $4.4 \pm 0.6 \text{ cm}$ ) (Figura 33). En cuanto al número de raíces, en el medio MS + AIB se obtuvieron  $7.7 \pm 0.5$ ,

número superior a las desarrolladas en el medio solo con MS ( $2.8 \pm 0.2$ ) (Figura 33).



Figura 33. Plantas de *Chenopodium album* crecidas a partir del cultivo de brotes en medio MS semisólido con ácido indol butírico (AIB,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Observaciones hechas a las 2 semanas de cultivo (MS,  $n = 5$ ; MS + AIB,  $n = 10$ ).

El proceso de enraizamiento de esta especie se llevó a cabo dos veces. En ambas ocasiones, no se logró la aclimatación. Se hicieron modificaciones con relación al tiempo de permanencia dentro de la bolsa de poliestireno, así como en la apertura de la misma. Sin embargo, las plantas al parecer se vieron afectadas en buena proporción por la humedad originada en el microambiente, dando lugar a la aparición de hongo en ambas ocasiones. Una planta correspondiente al segundo proceso (10 %) no presentó hongo y fenológicamente se observaba sana. Desafortunadamente, al cabo de una semana, ésta murió.

***Chenopodium graveolens***. La micropropagación de esta especie con la adición de los tres RCV no mostró diferencias en el promedio de número de brotes por explante con respecto a la no adición de los mismos (**Tabla 6**). Incluso la tasa de multiplicación fue mayor en el tratamiento sin RCV adicionado. Con respecto a la morfología de los brotes, éstos se observaron sanos, sin hiperhidricidad, aunque con un menor tamaño en sus tallos y hojas con respecto a los crecidos

en el medio MS sin adición de RCV (Figura 34). Éstos últimos presentaron tallos más delgados (Figura 34, A). Algunos brotes de los tratamientos con BA y 2IP generaron raíces y algo de callo, y solo uno generado a partir de la adición de 2IP resultó también con raíces.



Figura 34. Micropropagación de *Chenopodium graveolens* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Observaciones hechas a las 4 semanas de cultivo. a) MS sin RCV (control); b) MS + BA; c) MS + 2IP; y d) MS + MT.

***Cucurbita foetidissima***. La adición de BA al medio MS resultó en un mayor promedio en el número de brotes por explante, con respecto tanto al medio MS sin RCV como a los adicionados con 2IP y MT (**Tabla 6**), con una tasa de multiplicación de 2.5. Los brotes crecidos en el tratamiento adicionado con BA presentaron una gran cantidad de hojas con ausencia de raíces (Figura 35, B); los brotes crecidos en el medio con 2IP mostraron algunas raíces, con tallos largos (Figura 35, C); y con respecto a los brotes crecidos en medio MS suplementado con MT, éstos resultaron con tallos más cortos y sin raíces (Figura 35, D). Los brotes generados en el medio sin RCV mostraron pocas hojas y en promedio tallos más largos que los brotes de los otros tratamientos (Figura 35, A).

La especie *C. foetidissima* fue sometida al proceso de aclimatación. En relación con las raíces obtenidas de la adición del AIB al medio de cultivo, éstas estuvieron en mayor proporción que sin la adición del mismo al medio ( $4.0 \pm 0.2$  y  $1.6 \pm 0.2$ , respectivamente) (Figura 36). Por otra parte, la longitud de las raíces fue mayor en el medio que solo contenía MS ( $9.3 \pm 0.5 \text{ cm}$ ). Al aclimatar esta especie, se obtuvo un 10 % de sobrevivencia ( $n = 10$ ).



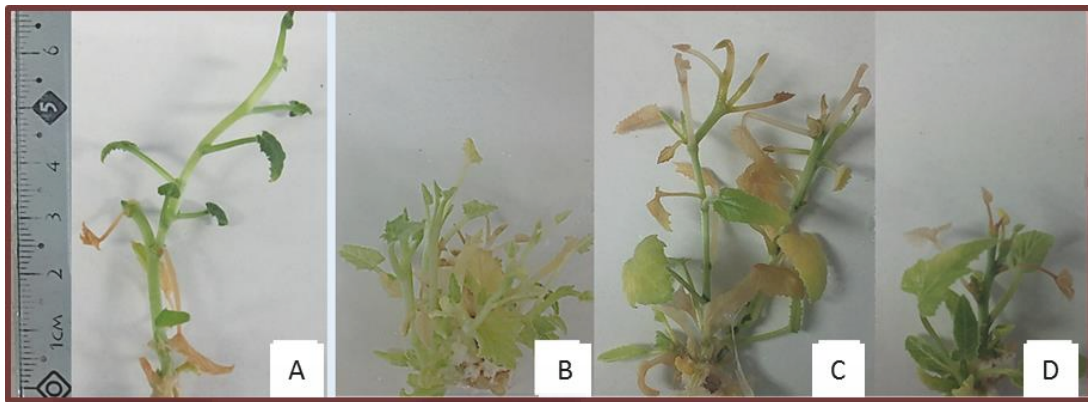


Figura 35. Micropropagación de *Cucurbita foetidissima* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Observaciones hechas a las 4 semanas de cultivo. a) MS sin RCV (control); b) MS + BA; c) MS + 2IP; y d) MS + MT.



Figura 36. Plantas de *Cucurbita foetidissima* crecidas a partir del cultivo de brotes en medio MS con ácido indol butírico (AIB,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Observaciones hechas a las 2 semanas de cultivo (MS,  $n = 5$ ; MS + AIB,  $n = 10$ ).

Las raíces crecidas en medio MS presentaron una morfología característica mencionada ya en otras investigaciones, que consistió en el desarrollo de raíces laterales tanto arriba del meristemo apical de la raíz principal como en él (Ilina *et al.* 2012).

***Eysenhardtia polystachya***. La micropropagación de esta especie con la adición de BA y MT dio como resultado un mayor promedio en el número de brotes por explante, con respecto a la adición de 2IP y a los crecidos sin RCV (**Tabla 6**). La

mayor tasa de multiplicación se presentó en el medio MS + BA, con 1.3. Todos los brotes obtenidos de los tratamientos con RCV presentaron callo, en mayor o menor proporción (Figura 37). Los brotes generados en los medios de BA y 2IP mostraron hojas más grandes, que los crecidos con MT y en ningún RCV se presentaron raíces. Después de cuatro semanas de crecimiento, empieza a haber necrosamiento de los tallos en la zona apical.

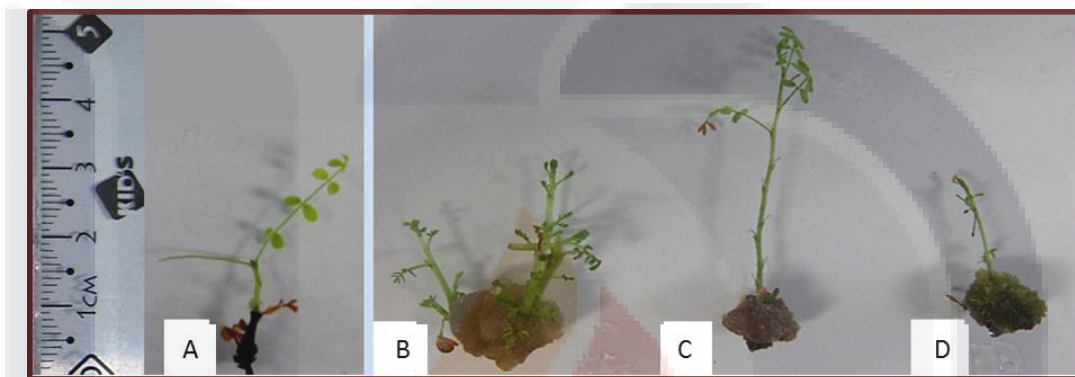


Figura 37. Micropropagación de *Eysenhardtia polystachya* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . a) MS sin RCV (control), b) MS + BA, c) MS + 2IP, y d) MS + MT.

***Jatropha dioica***. Esta especie presentó problemas en su multiplicación. La mayoría de los explantes no generaron brotes, y se obtuvo una tasa de multiplicación máxima de 0.5 en el medio adicionado con MT (**Tabla 6**). Aquellos brotes que llegaron a crecer lo hicieron muy lentamente, resultando en un brote con 2 o 3 hojas, y con un tallo menor a 0.5 cm (Figura 38, B y C); además, muchos de los brotes no fueron viables debido a hiperhidricidad. Todos los brotes presentaron callo, aunque de mayor tamaño en los cultivados en medio con BA (Figura 38, B). En los explantes que no generaron brotes, se observó oxidación en la base de los mismos.

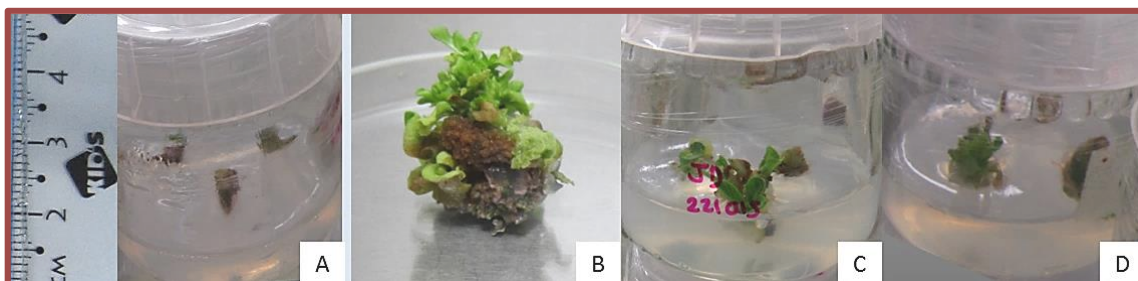


Figura 38. Micropropagación de *Jatropha dioica* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . a) MS sin RCV (control), b) MS + BA, c) MS + 2IP, y d) MS + MT.

***Lepidium virginicum***. Los resultados obtenidos de la micropropagación muestran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. El tratamiento con el mayor promedio de brotes por explante fue el de MS sin RCV (Figura 39, A), contrario a lo que se hubiera esperado. El menor promedio de número de brotes por explante se dio en el medio adicionado con 2IP (Figura 39, C) (**Tabla 6**). Sin embargo, la mayor tasa de multiplicación se presentó en el medio adicionado con BA (Figura 39, B), seguido del medio sin RCV. Con relación al aspecto de los brotes, las hojas provenientes de los brotes crecidos en los medios con MT fueron más largas, seguidas de las crecidas con BA y 2IP.



Figura 39. Micropropagación de *Lepidium virginicum* en medio MS suplementado con RCV a la concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . a) MS sin RCV (control), b) MS + BA, c) MS + 2IP, y d) MS + MT.

### 7.3. Detección de genes de interés en cepas bacterianas

Se verificó la capacidad de infectar e inducir raíces pilosas de las cepas bacterianas mediante la amplificación de los genes *rolB* y *virD1*. Además, para

A4/pESC4, se amplificaron los genes *gus* y *nptII*, para verificar actividad de GUS y resistencia a la kanamicina, respectivamente (Figura 40).

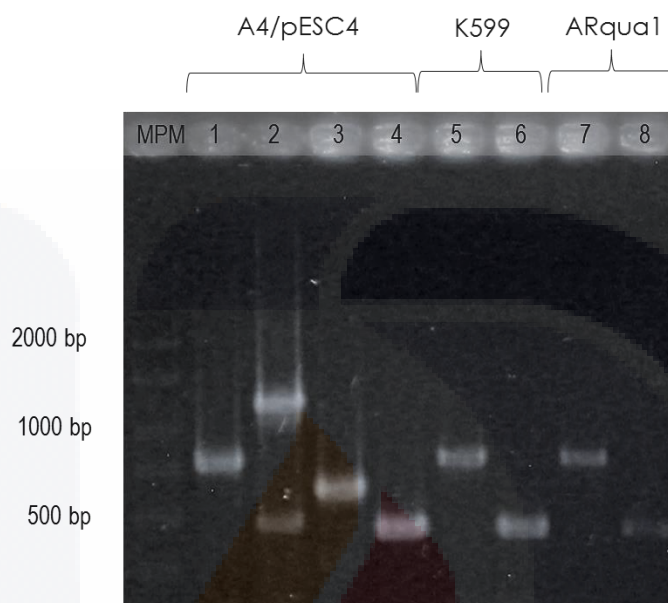


Figura 40. Productos de amplificación obtenidos por PCR empleando los cebadores para la detección de los genes *rolB*, *gus*, *nptII* y *virD1* en cepas bacterianas. 1, 5 y 7) gen *rolB* (780 pb) en cepas A4/pESC4, K599 y ARqua1, respectivamente; 2) gen *gus* (1200 pb) en A4 /ESC4; 3) gen *nptII* (517pb) en A4 pESC4; 4, 6 y 8) gen *virD1* (450 pb) en cepas A4/pESC4, K599 y ARqua1, respectivamente; y MPM) marcador de peso molecular (SIGMA 038K6012).

#### 7.4. Transformación genética mediada por cepas de *A. rhizogenes*

Las plantas medicinales se indujeron a una primera transformación empleando la densidad bacteriana de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Debido a que los resultados no eran favorables para la mayoría de las especies, se indujeron a una segunda transformación con una densidad bacteriana mayor ( $10^9$  UCF mL<sup>-1</sup>). En la **Tabla 7** se muestran los resultados obtenidos con todas las especies, de manera general, empleando ambas densidades bacterianas.

**Tabla 7.** Porcentajes de transformación de las especies de plantas obtenidas mediante la inducción con las cepas bacterianas A4/pESC4, ARqua1 y K599.

Especie de planta	10 <sup>7</sup> UFC·mL <sup>-1</sup>			10 <sup>9</sup> UFC·mL <sup>-1</sup>		
	A4/pESC4	ARqua1	K599	A4/pESC4	ARqua1	K599
<i>B. odorata</i>	40	44	20	49	69	44
<i>C. album</i>	40	1	1	0	6	8
<i>C. graveolens</i>	0	0	0	0	0	0
<i>C. foetidissima</i>	0	0	0	8	1	1
<i>E. polystachya</i>	0	0	0	0	0	0
<i>J. dioica</i>	0	0	0	0	0	0
<i>L. virginicum</i>	0	0	0	6	0	0

Tamaño de muestra: 80.

***Bidens odorata***. Esta especie resultó ser la especie más susceptible a transformación por las tres cepas bacterianas, en su mayoría con raíces crecidas en más del 40 % de los explantes infectados (**Tabla 7**).

La obtención de un número mayor de raíces pilosas fue significativa con la cepa ARqua1 empleando hoja como explante, con un cocultivo bacteriano de 48 h y una densidad de 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, aunque estadísticamente igual a otros tratamientos (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Raíces transformadas de *Bidens odorata* obtenidas de la transformación con *Agrobacterium rhizogenes*.

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>Explante</b>	<b>Tiempo de co-cultivo (h)</b>	<b>Densidad bacteriana (UFC·mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Inducción de raíces</b>	<b>Promedio de número de raíces por explante</b>	<b>% GUS positivo</b>
<b>A4/pESC4</b>	RI	48	10 <sup>7</sup>	44	0.46±0.1 <sup>abcd</sup>	82
			10 <sup>9</sup>	55	0.55±0.1 <sup>abc</sup>	50
	H	72	10 <sup>7</sup>	48	0.48±0.1 <sup>abcd</sup>	50
			10 <sup>9</sup>	32	0.40±0.1 <sup>bcd</sup>	10
		48	10 <sup>7</sup>	44	0.44±0.1 <sup>bcd</sup>	68
			10 <sup>9</sup>	55	0.55±0.1 <sup>abc</sup>	15
72	10 <sup>7</sup>	24	0.24±0.1 <sup>cd</sup>	77		
	10 <sup>9</sup>	45	0.45±0.1 <sup>abcd</sup>	7		
<b>K599</b>	RI	48	10 <sup>7</sup>	60	0.60±0.1 <sup>abc</sup>	-
			10 <sup>9</sup>	35	0.35±0.1 <sup>bcd</sup>	-
	H	72	10 <sup>7</sup>	0	0.20±0.1 <sup>cd</sup>	-
			10 <sup>9</sup>	60	0.60±0.1 <sup>abc</sup>	-
		48	10 <sup>7</sup>	20	0.00±0.0 <sup>d</sup>	-
			10 <sup>9</sup>	35	0.35±0.1 <sup>bcd</sup>	-
72	10 <sup>7</sup>	45	0.45±0.1 <sup>abcd</sup>	-		
	10 <sup>9</sup>	45	0.45±0.1 <sup>abcd</sup>	-		
<b>Arqua1</b>	RI	48	10 <sup>7</sup>	65	0.65±0.1 <sup>abc</sup>	-
			10 <sup>9</sup>	65	0.63±0.1 <sup>abc</sup>	-
	H	72	10 <sup>7</sup>	65	0.65±0.1 <sup>abc</sup>	-
			10 <sup>9</sup>	35	0.35±0.1 <sup>bcd</sup>	-
		48	10 <sup>7</sup>	0	0.00±0.0 <sup>d</sup>	-
			10 <sup>9</sup>	95	0.95±0.0 <sup>a</sup>	-
72	10 <sup>7</sup>	45	0.45±0.1 <sup>abcd</sup>	-		
	10 <sup>9</sup>	80	0.80±0.1 <sup>ab</sup>	-		

Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).  
RI: Regiones internodales; H: Hoja.

Según las relaciones de probabilidad de cada una de las variables estudiadas, podemos decir que hay un incremento en la probabilidad de obtener raíces en 2.1 veces si empleamos la bacteria A4/pESC4 con la densidad bacteriana de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, así como 3.1 veces si se emplea región internodal como explante, e incluso aumenta en 2.4 el cocultivo de 48 h. Además, hay una disminución en la probabilidad de obtener raíces en 0.43 y 0.35 veces si se usan A4/pESC4 y K599, respectivamente bajo la concentración de 10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

En relación con la longitud de las raíces, ésta osciló entre 2 y 25 mm. Al paso del tiempo, las raíces obtenidas de la infección con las cepas K599 y ARqua1 bajo la densidad de 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> no elongaron ni desarrollaron nuevas raíces, mientras que 5 cultivos de raíces crecidos a partir de la infección con A4/pESC4 respondieron positivamente al crecimiento plagiotrópico, característico de las

raíces pilosas. Estos últimos resultados coinciden con trabajos empleando la misma cepa bacteriana A4/pESC4 (Palomeque Carlín *et al.* 2015), así como lo reportado para *Tylophora indica*, con la cepa A4 y RI como explantes (Chaudhuri *et al.* 2005). El desarrollo de las raíces mostró una mayor estabilidad que las crecidas con as otras cepas bacterianas, con un crecimiento plagiotrópico constante; fenotípicamente se presentaron gruesas, de tonos blanquecinos y amarillos. Además, en el estereoscopio, muchas de ellas presentaron xilema de tono rojo oscuro y la cofia del mismo color (Figura 41, A, B, C). En el caso de los controles negativos, éstos generaron una raíz por explante en el 50 % de ellos, más delgadas, pequeñas, con poca o nula pilosidad, y sin ramificaciones (Figura 41, D).

El porcentaje de inducción obtenido, así como el fenotipo de las mismas pueden deberse a la hipervirulencia que en general presentan las cepas de tipo agropina (Makhzoum *et al.* 2013). Por otro lado, se observaron diferencias en la morfología de las raíces transformadas para las diferentes cepas, A4/pESC4 y ARqua1, como una mayor pilosidad con respecto a la cepa K599. Los resultados observados con la cepa K599 pueden deberse a la baja virulencia reportada para esta cepa (Chabaud *et al.* 2006), induciendo un número reducido de raíces con escasa pilosidad; contrariamente, en otro trabajo esta cepa fue considerada como hipervirulenta, capaz de infectar a diferentes especies de plantas (Veena & Taylor 2007). Por lo mismo, factores como la susceptibilidad de la especie vegetal (Chaudhuri *et al.* 2005), la virulencia de la cepa bacteriana (Chaudhuri *et al.* 2005; Dhakulkar *et al.* 2005) y el tipo de explante deben ser considerados en las transformaciones mediante *A. rhizogenes*.

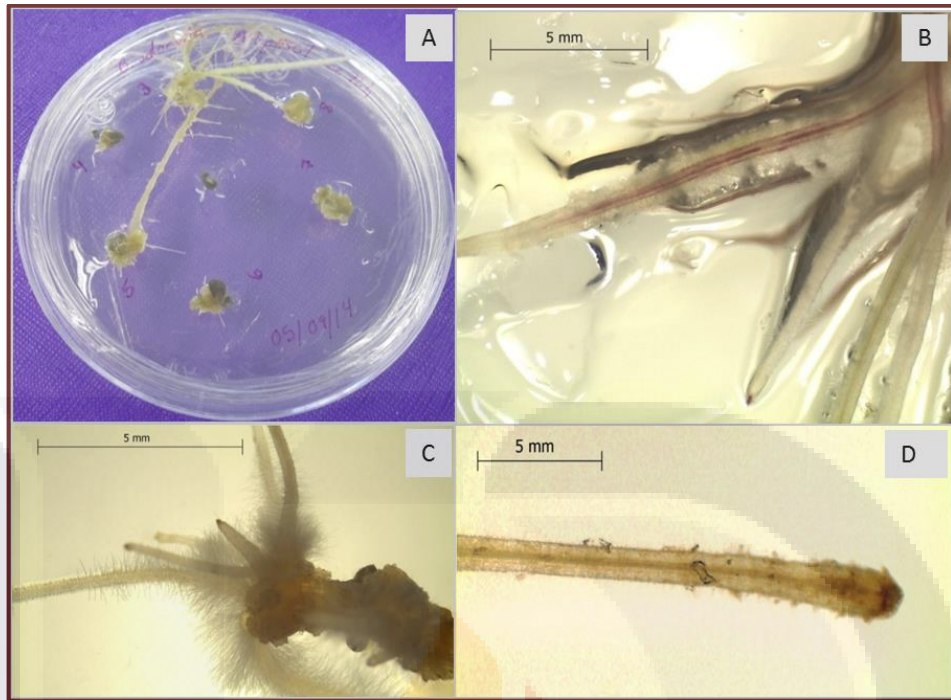


Figura 41. Raíces presuntamente transformadas de *Bidens odorata* generadas mediante la cepa A4/pESC4. A) Raíces obtenidas a los 21 días de inducción en explantes de hoja en cocultivo de 72 h; B) raíces a las 6 semanas de inducción; C) pilosidad presente en raíz presuntamente transformada; y D) raíz crecida en control negativo. Las imágenes A y B son raíces obtenidas de la densidad bacteriana  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , y C, de la densidad bacteriana  $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

Mediante la prueba histoquímica del producto de la  $\beta$ -glucuronidasa (prueba de GUS) fue posible comprobar visualmente la transformación de las raíces generadas a partir de la infección con A4/pESC4 (Figura 42), así como la posible influencia de la densidad bacteriana sobre el número de raíces transformadas. De los explantes con crecimiento de raíces, el 94 % resultó positivo en la densidad de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , a diferencia del 49 % de los cultivos de raíces obtenidos de la inducción con la densidad de  $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (**Tabla 9**).





Figura 42. Expresión fenotípica del producto de la  $\beta$ -glucuronidasa en raíces pilosas de *Bidens odorata* a partir de la infección con A4/pESC4. Resultados obtenidos a las 4 semanas de infección.

**Tabla 9.** Ensayo histoquímico para la detección del producto de la  $\beta$ -glucuronidasa en cultivos de raíces crecidas de *Bidens odorata* a partir de la infección con A4/pESC4.

<i>Densidad bacteriana (UFC <math>\cdot</math> mL<sup>-1</sup>)</i>					
<i>10<sup>7</sup></i>			<i>10<sup>9</sup></i>		
<i>Cultivo</i>	<i>n</i>	<i>GUS positivo (%)</i>	<i>Cultivo</i>	<i>n</i>	<i>GUS positivo (%)</i>
1	3	66	1	3	100
2	2	100	2	3	33
3	2	100	3	3	67
4	4	50	4	3	33
5	3	100	5	3	33
6	2	50	6	2	50
8	7	100	8	3	33
9	4	50	9	3	33
10	4	100	10	3	100
11	3	100	14	3	33
12	3	100	17	6	33
13	3	66	21	6	17
14	2	100	24	3	33
15	2	100	25	3	33
16	3	33	28	4	50
17	2	50	37	3	67

Se muestran los porcentajes GUS positivos de cada cultivo de raíces.  
 $n = 52$  ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) y  $n = 109$  ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>).

También se llevó a cabo la comprobación de la transformación de estas raíces mediante de la amplificación por PCR de los genes *rolB* (780 pb), *gus* (1200 pb) y *nptII* (517 pb). Los cultivos 10, 13 y 4 amplificaron para los fragmentos correspondientes a los genes *rolB*, *gus* y *nptII* (Figura 43, A, B, C); sin embargo, el cultivo 6 no amplificó para el gen *gus* (Figura 43, B) a pesar de

que la prueba histoquímica resultó positiva para este último. Este cultivo presentó, además de la prueba histoquímica de la  $\beta$ -glucuronidasa positiva, el fenotipo de raíz pilosa.

Como es sabido, los genes *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*) que se encuentran en el fragmento T<sub>L</sub>-DNA de *A. rhizogenes* de tipo agropina, en este caso, A4/pESC4, son necesarios para el desarrollo de la enfermedad de raíz pilosa (Pavlova *et al.* 2014). En nuestro trabajo, los cuatro cultivos sometidos a PCR amplificaron el fragmento correspondiente al gen *rolB*, lo que explica el fenotipo mencionado; el gen *nptII* proporciona resistencia a la kanamicina y también está presente en estos cultivos. En cuanto al gen *gus*, éste se amplificó solo en tres cultivos de raíces; sin embargo, el hecho de que el fragmento correspondiente al gen *nptII* esté presente, indica la inserción del plásmido pESC4 en el genoma de la planta, además *B. odorata* a la densidad menor, generó en su mayoría raíces transformadas, como lo demostró la prueba de GUS, mientras que a la otra densidad, alrededor del 50 % resultó negativa y con un nulo crecimiento, lo que hace pensar que las raíces originadas de estos explantes no estaban transformadas o presentaron inestabilidad en la inserción de genes involucrados en la generación y/o el mantenimiento dentro del genoma vegetal. Se verificó la eliminación de la bacteria mediante la amplificación del fragmento de 450 pb correspondiente al gen *virD1* (Figura 43, D), presentándose solo en el control positivo, lo que indica la ausencia de bacteria en los cultivos.

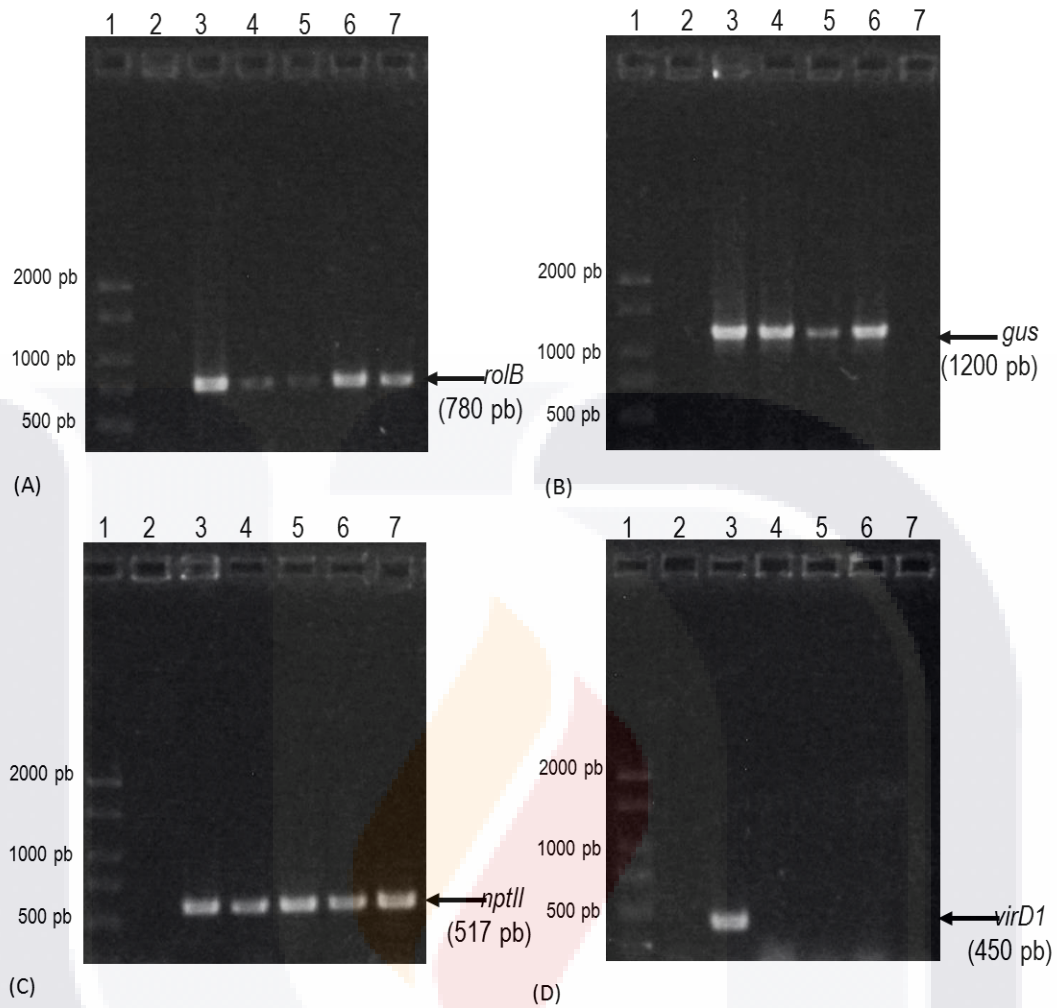


Figura 43. Amplificación por PCR del gen *rolB*, *gus*, *nptII* y *virD1* usando ADN de raíces transformadas de *Bidens odorata* crecidas mediante A4/pESC4. (A) Amplificación del fragmento de 780 b del gen *rolB*; (B) amplificación del fragmento de 1200 pb del gen *gus*; (C) amplificación del fragmento de 517 pb del gen *nptII*; (D) amplificación del fragmento de 450 pb del gen *virD1*. 1: marcador de peso molecular; 2: ADN de raíces no transformadas de *Bidens odorata* (control negativo); 3: ADN de raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophoroides* (control positivo); 4: cultivo 10; 5: cultivo 13; 6: cultivo 4; y 7: cultivo 6.

Referente a la densidad bacteriana óptima, es importante determinar ésta para cada especie vegetal y tipo de explante, ya que no solo determina la capacidad de infección y la subsecuente inserción de los genes responsables del fenotipo dentro del cromosoma vegetal, sino que, además, un exceso puede generar dificultades al momento de su eliminación y dar origen a la muerte celular, como

se presentó en el presente trabajo. En el caso de las raíces crecidas con la densidad bacteriana de  $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  y aunadas a las que permanecieron inicialmente en medio semisólido, la bacteria inductora permaneció en el medio de cultivo y en la superficie de las raíces, manifestándose como una turbidez en el medio y una capa blanquesina en las raíces, lo que dio origen al necrosamiento y la subsecuente muerte celular (Figura 44); mientras que los cultivos de raíces obtenidos a partir de la densidad bacteriana de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  quedaron libres de la cepa entre la 4ª y 6ª semana de crecimiento, realizando subcultivos con medio MS líquido fresco adicionado con cefotaxima cada 6 días. En el tiempo en que se desarrolló el proyecto, se contó con un número considerable de estas raíces creciendo en agitación constante a 80 rpm, en medio MS líquido sin RCV ni antibióticos (Figura 45).

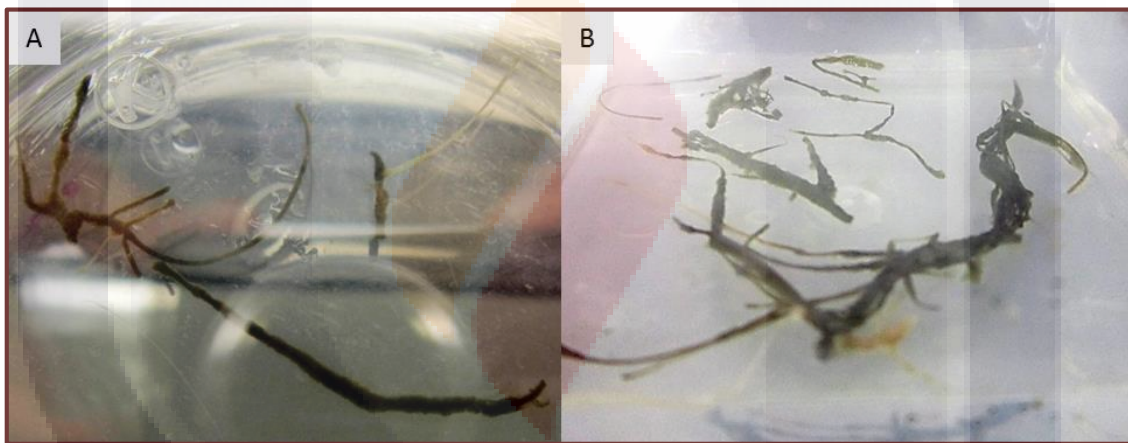


Figura 44. Necrosamiento de raíces crecidas a partir de la infección con A4/pESC4. A) Raíces en medio MS líquido (densidad bacteriana  $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), y B) raíces en medio MS semisólido (densidad bacteriana  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ).

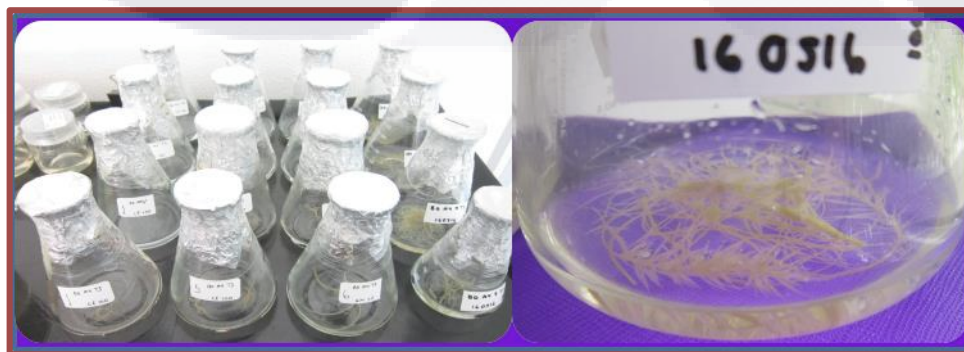


Figura 45. Cultivos de raíces transformadas.

Por otro lado, las raíces crecidas a partir de la cepa ARqua1 mostraron un desarrollo aparentemente estable inicialmente, con crecimiento plagiotrópico. Éstas se caracterizaron por presentar zonas curvadas a lo largo de las mismas (Figura 46, A), con notable pilosidad en la parte baja de la raíz y al final de ella. El color osciló entre blanco, para las raíces jóvenes, y verde y amarillo, para las más envejecidas (Figura 46, B, C). Debido a la constante presencia bacteriana, los subcultivos con medio MS líquido fresco con cefotaxima se hicieron cada tercer día. Al paso del tiempo, las raíces necrosaron y murieron. En una segunda transformación con esta misma bacteria, las raíces no mostraron un crecimiento constante, por lo que no se generaron líneas estables a partir de éstas.

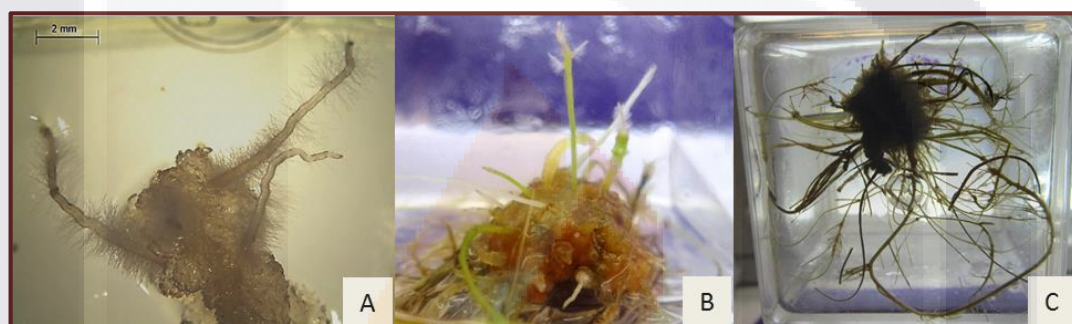


Figura 46. Cultivos de raíces presuntamente transformadas de *Bidens odorata* a partir de la inducción con la cepa Arqua1. A) Cultivo de raíces generado del co-cultivo bacteriano de 48 h de explante de hoja (medio sólido); B y C) cultivo de raíces generado del co-cultivo bacteriano de 72 h de explante de tallo, con 2 y 4 semanas en condiciones de agitación, respectivamente.

Con la cepa K599 se desarrollaron raíces con poca pilosidad mayormente en la base de éstas (Figura 47), con tonos amarillentos las surgidas del explante H (Figura 47, A), y grisáceos las de los explantes de RI, casi similares a los controles negativos (Figura 47, B, C). En relación con el número de raíces que se generaron a partir de un mismo explante, hubo mucha variación. Con la densidad bacteriana de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , de los cuatro explantes de H que generaron raíces, dos presentaron 10 y 11 raíces, mientras que los otros dos solo tuvieron una raíz. En la densidad bacteriana, de  $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , las raíces oscilaron entre 1 y 3 por explante. Desafortunadamente las raíces de esta inducción no elongaron y murieron. Se hizo una segunda transformación, con resultados negativos. Por lo que se presume que las raíces obtenidas inicialmente no eran transformadas.

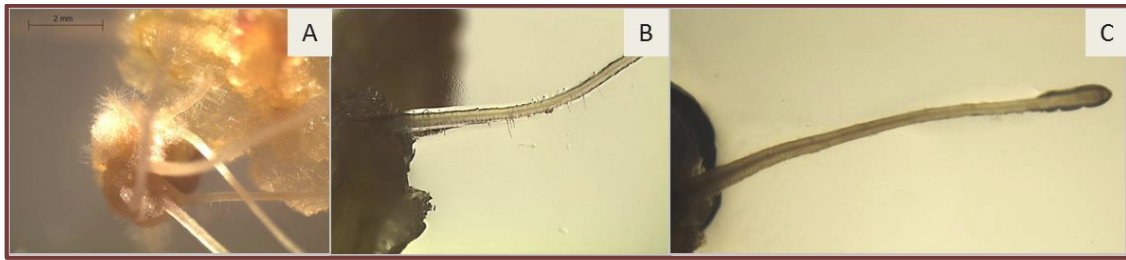


Figura 47. Transformación de *Bidens odorata* mediante la cepa K599 en co-cultivo de 48 h. Fotos tomadas a los 21 días de inducción. A) Raíces crecidas en explante de hoja; B) raíz crecida en explante de tallo con escasa pilosidad; y C) raíz crecida en control negativo.

***Chenopodium album***. En la densidad bacteriana de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, se observaron diferencias en la cepa bacteriana y en el tipo de explante (**Tabla 10**). El análisis de los resultados mostró que es mejor usar la cepa A4/pESC4 a la concentración de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, ya que hay una generación de raíces de hasta 3.6 veces más que con las otras cepas bacterianas. Con relación al tipo de explante, el uso de tallo aumentó la probabilidad de tener raíces en 3.8 veces.

**Tabla 10.** Raíces presuntamente transformadas de *Chenopodium album* inducidas mediante cepas de *Agrobacterium rhizogenes*.

		Densidad bacteriana $10^7$ UFC mL <sup>-1</sup>	% Inducción de raíces pilosas	n	Densidad bacteriana $10^9$ UFC mL <sup>-1</sup>	% Inducción de raíces pilosas	n
<b>Cepa bacteriana</b>	<b>A4 pESC4</b>	3.14 ± 0.4*	25	100	0.0	0	80
	<b>K599</b>	0.01 ± 0.0	1	100	0.16 ± 0.1	5	80
	<b>ARqua1</b>	0.01 ± 0.0	1	80	0.14 ± 0.1	4	80
<b>Tipo de explante</b>	<b>Tallo</b>	0.60 ± 0.1*	35	130	0.20 ± 0.1	13	120
	<b>Hoja</b>	0.01 ± 0.0	1	130	0.0	0	120
<b>Tiempo de cocultivo bacteriano (h)</b>	<b>48</b>	0.38 ± 0.1	18	130	0.15 ± 0.1*	8	120
	<b>72</b>	0.0	12	130	0.05 ± 0.0	3	120

Se muestra la media ± EE. n=Tamaño de muestra. Asteriscos indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos en una misma densidad bacteriana.

El tiempo de cocultivo bacteriano no tuvo influencia en la generación de raíces, por lo que el tiempo de 48 h puede considerarse óptimo para el desarrollo de raíces. En la densidad bacteriana de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, solo se observaron diferencias

en el tiempo de cocultivo bacteriano, siendo el óptimo también de 48 h, con una relación de 2:1 raíces con respecto a 72 h de cocultivo bacteriano.

Las raíces crecidas en el explante de hoja provenientes de la inducción con A4/pESC4 en la densidad de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, presentaron un color blanco, con abundante pilosidad (Figura 48, A). Por otro lado, las raíces de los tallos tenían un color casi transparente, con pilosidad escasa y de menor grosor (Figura 48, B), las cuales fueron cultivadas desde el inicio en medio MS líquido, también con cefotaxima, a la misma concentración. Desafortunadamente, su cultivo no se logró, ya que no elongaron ni produjeron nuevas raíces (Figura 48, D).

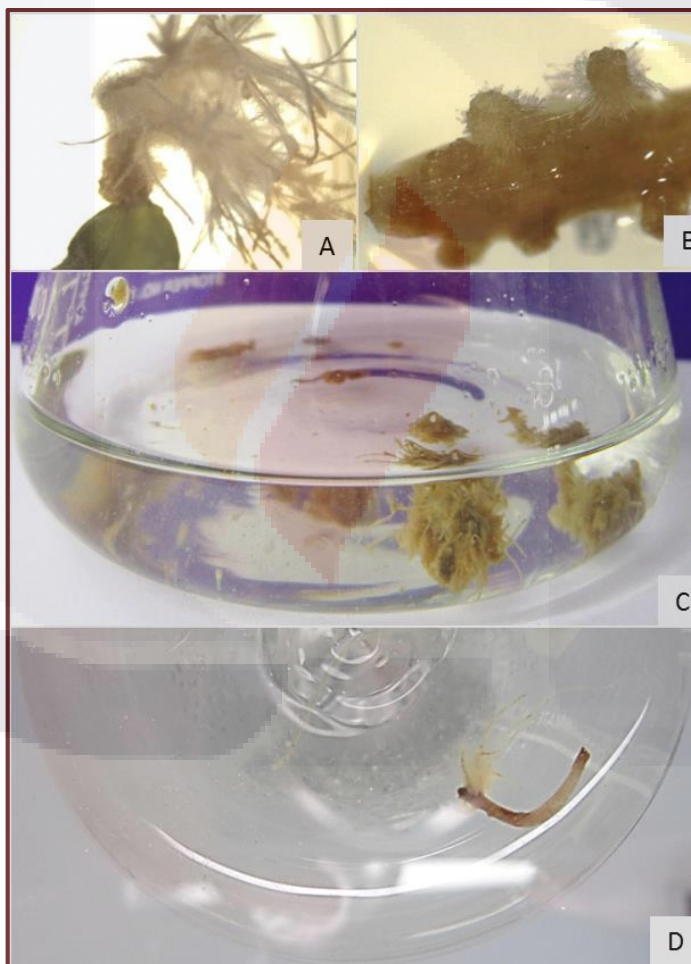


Figura 48. Raíces presuntamente transformadas de *Chenopodium album* generadas mediante la cepa *A. rhizogenes* A4/pESC4 con la densidad bacteriana de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. A) Raíces de explante de hoja a las 7 semanas de cultivo; B) raíces de explante de tallo obtenidas a los 21 días de inducción; C) raíces del explante de hoja a los 7 meses de cultivo; y D) raíces de explante de tallo a 1 semana de cultivo.

Las raíces provenientes del explante de hoja se cultivaron en un inicio en medio MS semisólido con cefotaxima (250 mg L<sup>-1</sup>) hasta la eliminación de la bacteria. Posteriormente, el cultivo permaneció en medio MS líquido sin antibióticos, en agitación con fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad. Desafortunadamente, al cabo de unos meses, dejó de crecer, quedando con fenotipo de tejido calloso (Figura 48, C).

La comprobación de la transformación proveniente de la infección con esta cepa se llevó a cabo solo en las raíces provenientes del explante de hoja, debido a la falta de material. Tanto la detección del producto de la β-glucuronidasa como la amplificación del gen *ro/B* fueron positivos (Figura 49, A, B).

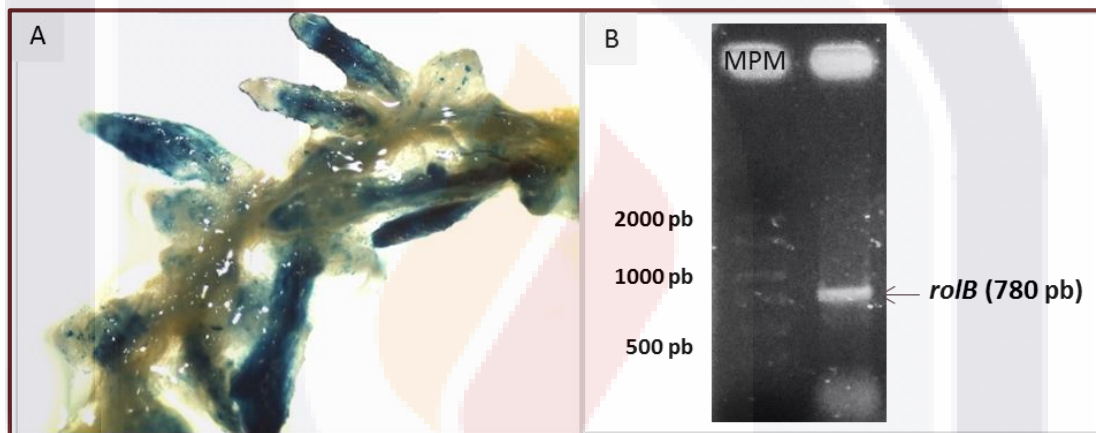


Figura 49. Expresión fenotípica del producto de la β-glucuronidasa y amplificación del gen *ro/B* en raíces presuntamente transformadas de *Chenopodium album* con la cepa A4/pESC4. Resultados obtenidos a las 4 semanas de infección. MPM: Marcador de Peso Molecular (SIGMA 038K6012).

El fenotipo de las raíces generadas de las otras dos bacterias mostró similitud con respecto a las obtenidas con A4/pESC4 en el explante de hoja. Con ARqua1, las raíces fueron de color blanco amarillento y las de la cepa K599, fueron blancas. En ambas transformaciones se observó una abundante pilosidad (Figura 50).

Estas raíces se estuvieron subcultivando en medio MS líquido con cefotaxima (250 mg L<sup>-1</sup>), pero no elongaron ni desarrollaron nuevas raíces, por lo que no se establecieron cultivos de las mismas.



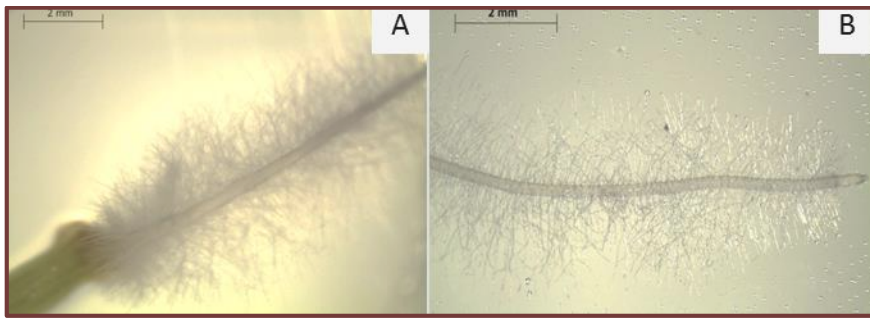


Figura 50. Raíces presuntamente transformadas de *Chenopodium album* generadas mediante cepas de *Agrobacterium rhizogenes*. A) Raíces obtenidas a los 21 días de inducción en explantes de tallo con la cepa ARqua1; B) raíces obtenidas a los 21 días de inducción en explante de tallo con la cepa K599.

***Chenopodium graveolens*.** Esta especie no generó raíces con ninguna de las cepas bacterianas. Los controles negativos se mantuvieron también sin raíces.

***Cucurbita foetidissima*.** La especie *C. foetidissima* desarrolló muy pocas raíces con las tres cepas bacterianas. La inducción con la cepa A4/pESC4 en la densidad de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , no generó diferencias entre las variables analizadas (**Tabla 11**) en el número promedio de raíces generadas por explante. Sin embargo, la respuesta en cuanto al número de explantes que respondieron con la generación de raíces fue mayor con dicha cepa. En contraste, en la densidad de  $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  se encontraron diferencias entre las diferentes cepas bacterianas, siendo la de mayor promedio en el número de raíces la correspondiente a la cepa A4/pESC4, así como entre los tiempos de cocultivo bacteriano, viéndose favorecido el crecimiento de raíces al usar 72 h como tiempo de incubación bacteriana (**Tabla 11**). En esta última densidad, el porcentaje de inducción fue muy baja. Los explantes empleados como control, esto es, sin cocultivo bacteriano, mostraron un crecimiento radicular con una longitud menor a 5 mm en el 50 % de los mismos, solo en los medios de MS adicionados con cefotaxima ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ) y kanamicina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Las raíces generadas a partir de la inducción con A4/pESC4 se mostraron gruesas, blancas y con escasa a nula pilosidad (Figura 51, A, B)

**Tabla 11.** Raíces presuntamente transformadas de *Cucurbita foetidissima* inducidas mediante cepas de *Agrobacterium rhizogenes*.

		Densidad bacteriana $10^7$ UFC·mL <sup>-1</sup>	% Inducción de raíces pilosas	n	Densidad bacteriana $10^9$ UFC·mL <sup>-1</sup>	% Inducción de raíces pilosas	n
Cepa bacteriana	A4 pESC4	0.41 ± 0.1	24	80	0.16 ± 0.1*	8	80
	K599	0.0	0	80	0.01 ± 0.0	1	80
	ARqua1	0.0	0	80	0.01 ± 0.0	1	80
Tipo de explante	Tallo	0.19 ± 0.1	13	120	0.09 ± 0.1	0	120
	Hoja	0.08 ± 0.1	3	120	0.3 ± 0.0	0	120
Tiempo de cultivo bacteriano (h)	48	0.08 ± 0.0	8	120	0.01 ± 0.0	1	120
	72	0.19 ± 0.1	8	120	0.12 ± 0.1*	1	120

Se muestra la media ± EE. Asteriscos indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos en una misma densidad bacteriana.

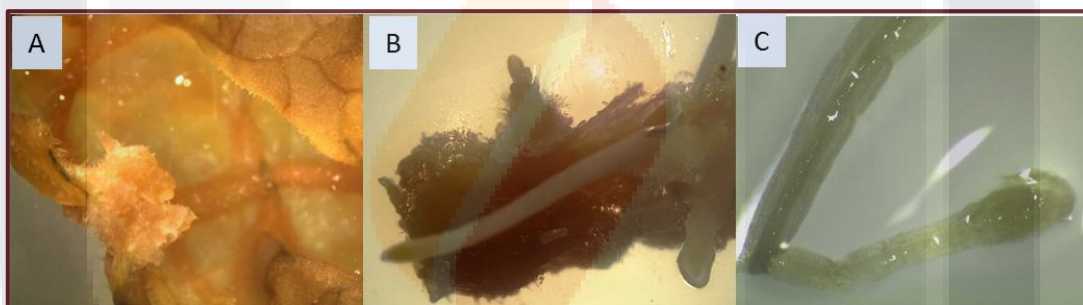


Figura 51. Raíces presuntamente transformadas de *Cucurbita foetidissima* generadas mediante la cepa A4/pESC4. Raíces obtenidas a los 21 días de inducción. A) Callosidad con escasa pilosidad en explante de hoja, no se desarrollaron raíces; B) raíces obtenidas en explante de tallo; y C) prueba histoquímica para la detección del producto del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) a las 12 semanas, con resultado negativo.

Las raíces provenientes de la menor densidad bacteriana crecieron hasta alcanzar una longitud promedio de 80 mm en 12 semanas. En este tiempo, ya se tenía el 32% de raíces provenientes del cocultivo de 72 h y el 12% de raíces del cocultivo de 48 h, provenientes de la densidad de  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. A las mismas 12 semanas se realizó la prueba histoquímica para la detección de la  $\beta$ -glucuronidasa, dando un resultado negativo. Al cabo de este tiempo, éstas dejaron de crecer y murieron (Figura 51, C).

Conforme el paso del tiempo, las raíces obtenidas a partir de las cepas K599 y ARqua1, en ambas densidades bacterianas, y las provenientes de la cepa A4/pESC4 de la densidad de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, se mantuvieron en medio MS líquido, bajo condiciones de agitación y fotoperiodo. Sin embargo, no elongaron ni desarrollaron raíces nuevas (Figura 52). Las raíces crecidas de la inducción con ARqua1 se observaron más delgadas que las otras, sin pilosidad aparente.



Figura 52. Transformación inducida a explantes de *Cucurbita foetidissima* mediante cepas de *Agrobacterium rhizogenes* a la densidad bacteriana de  $10^9$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Observaciones hechas el día 21 de inducción. A) Raíces crecidas a partir de la inducción con la cepa A4/pESC4; B) raíz obtenida de la inducción con la cepa ARqua1; y C) raíz crecida de la inducción con la cepa K599.

***Eysenhardtia polystachya***. La inducción a transformación de esta especie arrojó resultados negativos con las tres cepas bacterianas, en ambas densidades. La transformación se hizo en un principio haciendo pequeños cortes en los explantes. Después de observar la delicadeza de los tejidos, los explantes fueron inducidos mediante punciones en los tejidos con jeringa para insulina estéril. Con respecto a los explantes, se observó oxidación en los sitios de corte y de punción. Los explantes utilizados como control negativo tampoco mostraron crecimiento de raíces.

***Jatropha dioica***. Esta especie no generó raíces con ninguna de las cepas bacterianas. Los controles negativos se mantuvieron también sin raíces.

***Lepidium virginicum***. En el caso de esta especie, los tejidos también presentaron problemas en su manipulación, por lo que la inducción a transformación se llevó a cabo de la misma manera que la especie *E. polystachya*. Los resultados positivos solo se presentaron con la cepa A4/pESC4 (6.3 % de inducción de raíces). Sin embargo, no se obtuvieron cultivos de estas raíces. La prueba hisotquímica de GUS generó resultados negativos. Con

respecto a los explantes empleados como controles negativos, éstos no generaron raíces.

### **7.5. Establecimiento de cultivos de raíces transformadas y cuantificación de biomasa**

Como se comentó en apartados anteriores, *B. odorata* fue la única especie vegetal capaz de generar raíces transformadas, con crecimiento estable, por lo que dichas raíces fueron sometidas a pruebas de crecimiento en medio líquido para determinar las condiciones óptimas para establecer su cultivo.

Las raíces originadas de la infección con ARqua1 no generaron una mayor biomasa ( $p > 0.05$ ). Las raíces provenientes de la cepa K599 alcanzaron su mayor acumulación de biomasa a los 7 días de cultivo, con un FGI de  $1.51 \pm 0.1$  ( $p < 0.05$ ), sin alteraciones significativas en el mismo durante las siguientes semanas (Figura 53). Por otro lado, las raíces crecidas de la cepa A4/pESC4 alcanzaron su mayor acumulación de biomasa a las 3 semanas, con FGIs que oscilaron entre 4.2 y 5.2, esto es, de cuatro a cinco veces el inóculo inicial y muy superior al alcanzado con la cepa K599 (Figura 53).

En otras raíces provenientes de A4/pESC4 se registraron FGIs desde 0.7 hasta 3.8 para el mismo día creciendo bajo las mismas condiciones. En relación con lo anterior, ya han sido reportados comportamientos diferentes entre líneas de raíces provenientes de una misma especie de planta (Dhakulkar *et al.* 2005; Murthy *et al.* 2008), por lo que la elección de la línea es importante para la obtención de cantidades de biomasa importantes.

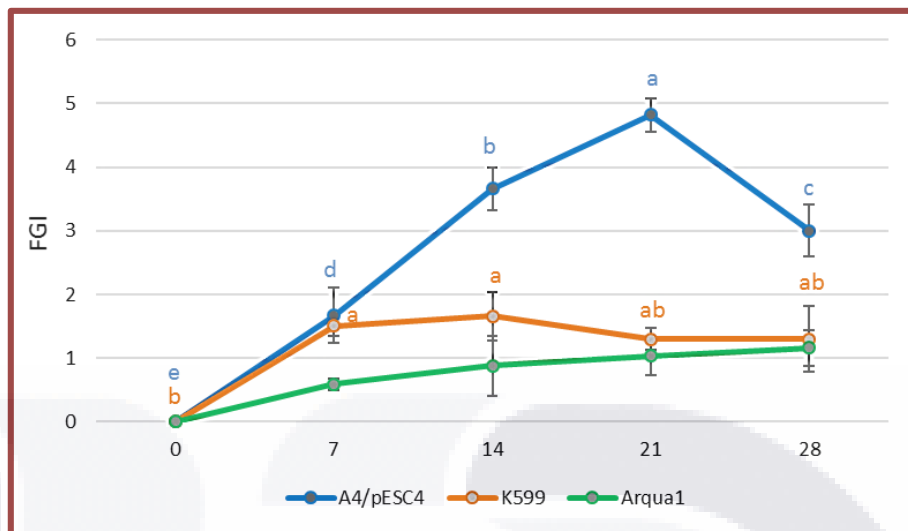


Figura 53. Cinéticas de crecimiento de raíces transformadas de *Bidens odorata* provenientes de diferentes cepas bacterianas. Se muestra la media  $\pm$  EE (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias de una misma cepa bacteriana (Tukey,  $p < 0.05$ ). Condiciones: agitación constante (80 rpm) y fotoperiodo 16 h luz/8 h oscuridad. FGI = (Peso fresco final de biomasa - Peso fresco inicial del inóculo) / peso fresco inicial del inóculo.

Por otro lado, el cambio de medio de cultivo MS fresco en intervalos más cortos de tiempo, genera un desarrollo constante de biomasa, como se observó en líneas de raíces donde se llegó a FGIs de casi 20 (Figura 54).

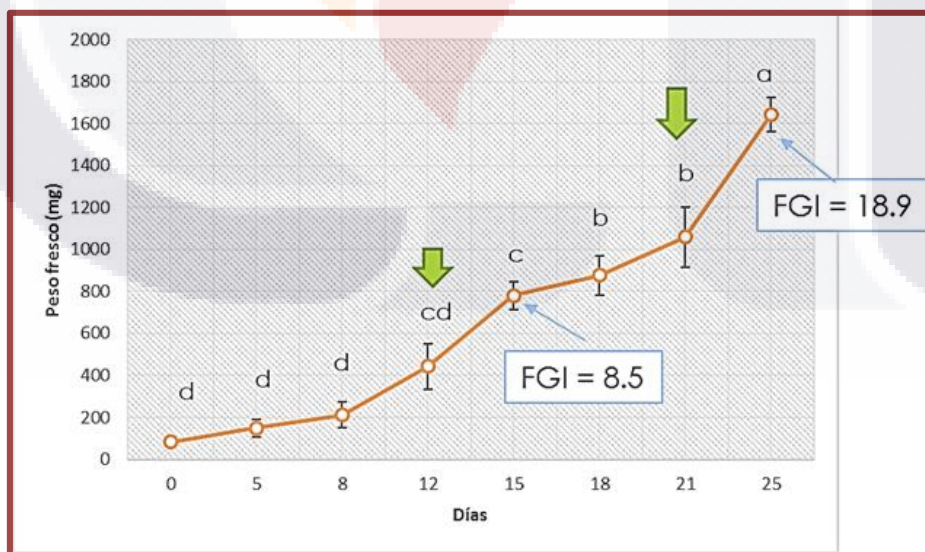


Figura 54. Cinética de crecimiento de raíces transformadas de *B. odorata* con A4/pESC4, con cambios de cultivo fresco. Condiciones de cultivo: medio MS líquido sin RCV, 80 rpm. Se muestra la media  $\pm$  EE (n = 3). Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ). FGI = (Peso fresco final de biomasa - Peso fresco inicial del inóculo) / peso fresco inicial del inóculo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Las raíces crecidas de la infección con ARqua1 y K599 ya no crecieron y murieron, a diferencia de las derivadas de A4/pESC4 que permanecieron creciendo, por lo que se deduce que la inserción de alguno o algunos de los genes no se llevó a cabo correctamente. Cada cuatro semanas se cosecharon raíces de los cultivos. Estas raíces se secaron a una temperatura de 24 °C durante 5 días, y posteriormente, fueron almacenadas a -20°C para análisis posteriores.

En relación con la evaluación del medio óptimo para el crecimiento radicular, el medio MS fue mejor a los 21 días de cultivo. El uso de los medios MS $\frac{1}{2}$  y B5 originó una acumulación menor (Figura 55). En cuanto a la acumulación de biomasa, el medio MS fue superior con respecto a los medios MS $\frac{1}{2}$  y B5, alcanzando su mayor acumulación de biomasa al día 21. En cambio, los otros medios obtuvieron su mayor acumulación al día 14, aunque en menor cantidad. Es sabido, que la concentración de sacarosa empleada en el medio de cultivo influye en el crecimiento de las raíces transformadas, e incluso el empleo de concentraciones de sacarosa mayores de 30 mg L $^{-1}$  puede favorecer una mayor acumulación de biomasa en cultivos de raíces (Murthy *et al.* 2008). Por ello, el medio MS con 30 g L $^{-1}$  de sacarosa, indujo la mayor acumulación de biomasa, mientras que el medio MS $\frac{1}{2}$  (15 mg L $^{-1}$ ), condujo a aproximadamente la mitad de lo obtenido con MS en el día 21.

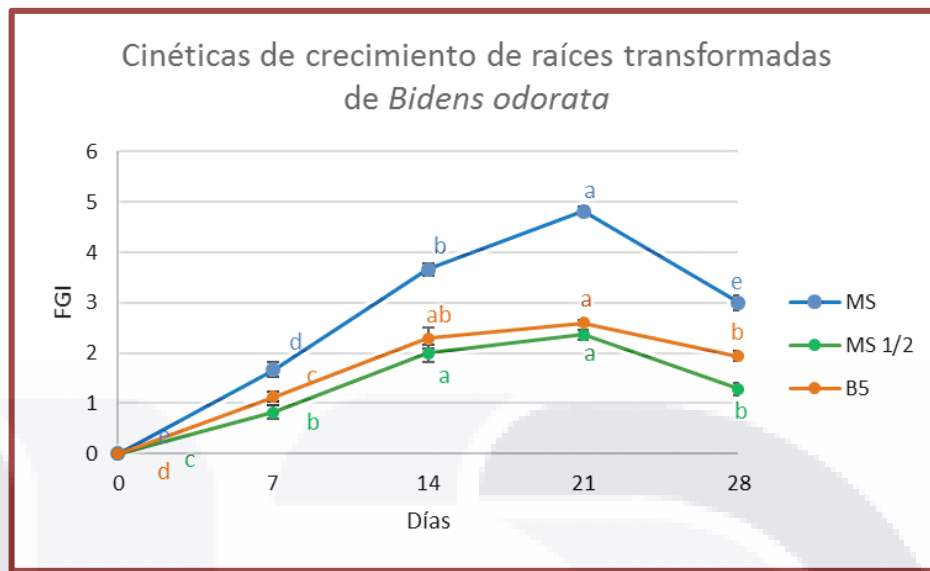


Figura 55. Cinéticas de crecimiento de raíces transformadas de *Bidens odorata* provenientes de la inducción con A4/pESC4 en diferentes medios de cultivo. Se muestra la media  $\pm$  EE (n=8). Inóculo: 500 mg peso fresco en 15 mL MS líquido. FGI = (Peso fresco final de biomasa - Peso fresco inicial del inóculo) / peso fresco inicial del inóculo.

### 7.6. Análisis fitoquímico preliminar de raíces transformadas

El estudio fitoquímico reveló la capacidad que tienen las raíces transformadas de *B. odorata* de sintetizar metabolitos que se encuentran tanto en raíz como en la parte aérea de la planta. Se sabe que las raíces pilosas pueden sintetizar, almacenar y secretar compuestos de la misma raíz y de la planta, así como compuestos nuevos, en cantidades comparables o mayores a las plantas intactas (Roychowdhury *et al.* 2013). En las **Tablas 12 y 13** se muestran los distintos patrones de manchas observadas para cada uno de lo fitoquímicos determinados como % Rf.

**Tabla 12.** Factor de retención en porcentaje (% Rf) de fitoquímicos en extractos de raíces transformadas, de raíces no transformadas y de la planta completa de *Bidens odorata* por TLC.

Fitoquímico	Mancha	Luz UV, 254 nm			Luz UV, 365 nm			Luz visible			Identificación por color
		HR	R	WP	HR	R	WP	HR	R	WP	
<i>Aceites esenciales</i>	1	11.0±0.0	8.0±0.0	8.7±2.1	7.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	8.0±0.0	AF (vis)
	2	16.0±1.7	14.3±0.6	15.7±1.2	14.0±0.0	14.3±0.6	15.0±0.0	14.3±0.6	15.0±0.0	15.0±0.0	RJ (vis)
	3	-	19.0±0.0	20.7±1.5	24.0±0.0	18.7±0.6	23.3±3.8	24.0±0.0	18.7±0.6	23.3±3.8	AF (vis)
	4	25.3±0.6	27.0±0.0	29.0±1.7	31.0±0.0	27.0±0.0	31.7±2.3	31.0±0.0	27.0±0.0	31.7±2.3	
	5	-	-	34.7±3.8	-	-	-	-	38.0±0.0	-	
	6	36.7±2.1	39.0±0.0	45.7±3.5	-	-	-	-	44.0±0.0	47.0±3.0	
	7	-	-	55.7±5.5	50.0±5.2	49.0±3.5	54.3±3.5	50.0±5.2	49.0±3.5	54.3±3.5	CF (vis)
	8	56.3±2.5	55.3±1.2	63.0±6.0	53.3±4.0	52.0±1.7	60.7±4.5	53.3±4.0	52.0±1.7	60.7±4.5	
	9	-	78.0±0.0	80.0±1.7	69.0±2.7	67.7±0.6	74.0±4.6	69.0±2.7	67.7±0.6	74.0±4.6	
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	83.0±1.7	AF (vis)
<i>Alcaloides</i>	1	-	-	20.7±2.3	-	-	16.5±3.5	-	-	-	VL (365)
	2	25.0±0.0	26.0±1.7	31.0±0.0	19.0±0.0	22.0±0.0	22.7±1.2	19.0±0.0	19.0±0.0	21.0±0.0	AF (365), CF (vis)
	3	50.0±0.0	48.0±1.7	46.0±2.7	-	39.0±0.0	-	-	-	-	AV (365)
	4	-	-	58.0±0.0	-	61.0±0.0	-	-	-	-	AZ (365)
	5	60.3±0.6	61.0±0.0	63.7±1.2	-	74.0±0.0	76.3±4.6	-	-	-	VL (365)
	6	-	90.0±0.0	90.0±0.0	-	92.0±0.0	93.7±0.6	-	-	-	
<i>Derivados del antraceno</i>	1	-	-	14.7±0.6	-	9.7±0.6	11.0±0.0	-	9.3±1.2	8.0±0.0	
	2	-	-	-	-	-	21.7±0.6	-	-	19.0±0.0	
	3	28.0±0.0	29.3±1.2	-	32.0±0.0	32.0±0.0	33.3±0.6	31.3±0.6	32.0±1.0	32.3±0.6	
	4	53.0±0.0	-	58.0±0.0	-	44.0±0.0	-	-	-	46.0±0.0	AM (365, vis)
	5	64.0±0.0	67.0±0.0	67.7±0.6	-	51.0±0.0	50.7±0.6	-	50.0±0.0	-	
	6	-	-	72.0±0.0	-	-	58.0±0.0	-	-	58.0±0.0	
	7	-	-	14.7±0.6	-	-	80.3±1.2	-	-	79.0±0.0	
<i>Flavonoides</i>	1	-	-	14.7±0.6	17.0±0.0	-	-	-	-	-	
	2	28.0±0.0	29.3±1.2	-	43.0±0.0	-	-	-	-	-	
	3	53.0±0.0	-	58.0±0.0	69.0±0.0	66.0±1.0	67.7±1.2	-	-	-	AFL (365)
	4	64.0±0.0	67.0±0.0	67.7±0.6	-	72.7±1.2	-	-	-	-	
	5	-	-	72.0±0.0	-	-	78.0±0.0	-	-	-	
6	94.0±0.0	94.0±0.0	92.0±0.6	93.0±0.0	93.0±0.0	90.0±0.0	-	-	-	VFL (365)	
<i>Glicósidos de diterpenos dulces y esteroides</i>	1	-	-	-	16.3±1.2	17.7±0.6	18.7±0.6	-	-	-	CF (vis)



**Tabla 12.** Continuación.

Fitoquímico	Mancha	Luz UV, 254 nm			Luz UV, 365 nm			Luz visible			Identificación por color
		RT	R	PC	RT	R	PC	RT	R	PC	
<i>Saponinas</i>					46.0±0.0	49.0±0.0	49.0±0.0	43.7±0.6	46.0±0.0	46.0±0.0	VL (365), CF (vis),
					57.3±0.6	56.0±0.0	56.0±0.0	54.0±1.7	54.7±1.2	56.0±0.0	VL (365), RJ (vis)
					-	69.0±0.0	-	-	68.0±0.0	-	VFL (365), AM (vis)
					-	75.7±0.6	-	-	75.0±0.0	-	VL (365), RJ (vis)
					-	84.3±1.2	85.0±0.0	-	81.3±0.6	-	VL (365), RJ (vis)
					90.0±0.0	93.0±0.0	92.7±0.6	-	92.0±0.0	88.0±0.0	VL (365), AZ-VL (vis)
					30.7±1.5	29.0±0.0	-	-	-	13.7±0.6	-
<i>Triterpenos</i>	1	30.7±1.5	29.0±0.0	-	-	-	-	-	-	-	AFL (365)
	2	52.7±1.5	-	52.3±1.2	54.7±1.2	-	50.7±0.6	18.7±0.6	18.0±0.0	-	
	3	-	-	60.7±0.6	65.7±2.1	64.0±0.0	60.7±0.6	31.0±2.0	26.7±1.2	28.0±0.0	
	4	64.3±0.6	64.0±0.0	67.0±1.7	-	-	67.7±0.6	-	-	60.3±0.6	AZ-VL (vis)
	5	74.7±0.6	74.0±0.0	78.7±0.6	76.0±1.7	78.0±0.0	77.3±1.2	69.7±1.2	67.7±0.6	67.0±0.0	
	6	-	81.3±0.6	-	-	-	-	-	76.0±0.0	77.3±1.2	RJ-VL (vis)
	7	93.0±0.0	91.7±1.5	88.0±1.7	92.3±0.6	91.3±1.2	88.7±0.58	-	-	85.0±1.7	AFL (365)

Se muestra la media ± DE (n = 3). RT: Extracto de raíces transformadas; R: Extracto de raíces no transformadas; y PC: Extracto de planta completa no transformad. Identificación de fitoquímicos por color de acuerdo a Wagne y Blatt (1996). AF: Azul fuerte; AFL: Azul fluorescente; AM: Amarillo; AV: Azul verde; AZ: Azul; CF: Café; RJ: Rojo; VFL: Verde fluorescente; VL: Violeta.

**Tabla 13.** Factor de retención en porcentaje (% Rf) de fitoquímicos en extractos de raíces transformadas, de raíces no transformadas, y de regiones internodales y hojas de plantas no transformadas de *Bidens odorata* por TLC.

Fitoquímico	Mancha	Luz UV, 254 nm			Luz UV, 365 nm			Luz visible			Identificación por color	
		RT	T	H	RT	R	H	RT	R	T		H
<i>Aceites esenciales</i>	1	3.7±0.3	2.5±0.0	-	-	-	-	4.2±0.3	4.0±0.0	3.8±0.3	4.0±0.0	AF (vis)
	2	5.3±0.6	4.5±0.0	3.8±0.3	4.0±0.0	-	-	-	5.2±0.3	-	-	AM <sub>1</sub> , VL (vis)
	3	9.2±0.8	7.3±0.3	7.0±0.0	-	-	-	-	7.0±0.0	7.5±0.0	7.2±0.3	AO (vis)
	4	9.3±0.3	-	9.7±0.6	9.8±0.3	-	-	8.3±0.6	9.0±0.0	-	10.0±0.5	MO <sub>1</sub> , AF (vis)
	5	14.2±0.8	12.8±0.3	12.5±0.0	12.0±0.0	-	-	14.5±0.5	13.3±0.3	13.2±0.3	14.2±0.3	AF (vis)
	6	-	-	18.0±0.0	19.0±0.0	-	-	-	19.0±0.0	18.0±0.0	19.2±0.3	MO <sub>2</sub> , AF (vis)
	7	24.8±2.5	21.3±0.3	21.5±0.0	22.0±0.5	-	-	-	22.2±0.3	22.8±0.3	23.0±0.5	AF (vis)
	8	26.3±1.5	24.0±0.5	23.7±0.3	24.5±0.5	-	-	-	-	25.3±0.3	25.0±0.5	MO (vis)
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	30.8±0.3	30.3±0.6	VL (vis)
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	33.7±0.3	33.0±0.0	VL (vis)
<i>Alcaloides</i>	1	-	4.7±0.3	-	-	-	-	-	5.0±0.0*	5.5±0.0*	-	*Dragendorff; CF
	2	-	7.2±0.3	7.0±0.0	-	-	-	5.0±0.0**	5.5±0.0**	5.5±0.0**	-	**Iodoplatinato; NA
	3	-	-	8.8±0.3	-	11.5±0.0	11.2±0.3	-	-	-	-	AB (365)
	4	-	-	15.0±0.0	-	14.5±0.5	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	18.2±0.3	-	-	19.0±0.0	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	21.7±0.3	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	24.0±0.5	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	29.0±0.0	-	-	-	-	-
<i>Derivados del antraceno</i>	9	-	-	32.3±0.3	-	34.5±0.0	34.5±0.0	-	-	-	-	-
	1	2.8±0.3	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.5	2.3±0.3	2.8±0.3	2.8±0.3	2.8±0.3	2.5±0.5	2.5±0.5	VO (365), AM (vis)
	2	5.5±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	5.2±0.3	5.7±0.3	5.7±0.3	5.7±0.3	4.8±0.8	4.8±0.8	AF (365), AM (vis)
	3	11.3±0.3	11.3±0.3	9.5±0.0	10.0±0.0	11.2±0.3	11.0±0.5	11.0±0.5	9.2±0.3	9.8±0.3	9.8±0.3	AF (365), AM (vis)
	4	-	-	11.5±0.0	12.5±0.0	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	14.8±0.3	-	-	-	-	-	14.3±0.6	-	-
	6	-	-	16.7±0.3	-	17.3±0.6	-	16.8±0.3	17.0±0.0	17.2±0.3	17.2±0.3	VL (365), AM (vis)
<i>Flavonoides</i>	7	-	-	20.3±0.6	-	20.3±0.6	-	-	20.0±0.0	20.7±0.8	20.7±0.8	VF (365), AM (vis)
	1	-	-	-	-	4.2±0.3	-	-	-	-	-	AVF (365)
	2	11.8±0.3	-	-	-	9.0±0.0	9.0±0.0	8.2±0.3	-	-	-	VL, AF (365)
	3	-	12.5±0.7	-	-	12.0±0.0	13.0±0.0	-	-	-	-	AVF (365)
	4	18.0±0.5	18.0±0.0	19.5±0.0	19.7±0.6	18.7±0.6	17.7±0.6	17.3±0.6	17.3±0.6	17.3±0.6	17.3±0.6	CF (365)
	5	-	-	24.0±0.5	-	-	-	20.5±0.0	-	-	-	AO, AVF, CF (365)
	6	-	23.0±0.0	-	-	24.7±0.6	24.0±0.0	24.7±0.3	24.7±0.3	24.7±0.3	24.7±0.3	AVF, AO (365)
	7	29.7±0.6	29.0±0.0	28.5±0.5	28.0±0.0	-	27.8±0.3	27.8±0.3	27.2±0.3	27.2±0.3	27.2±0.3	AVF, AO (365)
	8	-	-	-	31.3±0.3	-	-	30.0±0.0	29.8±0.3	29.8±0.3	29.8±0.3	AC, VL (365)
	9	33.3±0.3	32.7±0.3	32.5±0.0	32.8±0.3	32.5±0.5	31.7±0.3	31.3±0.3	31.7±0.3	31.7±0.3	31.7±0.3	AVF (365)
10	34.5±0.7	-	-	34.8±0.3	34.5±0.0	34.2±0.3	33.0±0.0	33.2±0.3	33.2±0.3	33.2±0.3	AB, VL (365)	

Continuación Tabla 13.

Fitoquímico	Mancha	Luz UV, 254 nm			Luz UV, 365 nm			Luz visible			Identificación por color
		RT	H	T	RT	H	T	RT	H	T	
	1	5.0±0.0	7.3±0.6	4.0±1.0	4.0±1.0	-	-	5.8±0.0	7.0±0.0	-	AC (vis), GR-VL (vis)
	2	9.2±0.3	-	7.3±0.3	7.8±0.3	-	-	11.3±0.3	11.5±0.0	-	AC (365)
	3	13.8±1.3	-	-	6.2±0.3	-	-	-	-	-	AC (365)
	4	17.3±0.8	-	-	14.8±0.3	-	-	-	-	-	AC (365)
<i>Glicósidos de diterpenos dulces y esterídes</i>	5	17.3±0.8	16.5±0.5	-	16.3±0.6	-	-	-	-	19.5±0.7	-
	6	-	-	-	18.0±0.0	-	17.7±0.3	-	-	-	-
	7	24.2±0.8	22.3±0.4	22.0±0.0	22.7±0.3	-	21.3±0.6	-	-	-	AC (365)
	8	26.2±0.8	-	-	24.3±0.4	-	25.0±0.0	-	-	27.2±0.3	28.2±0.8
	9	-	28.7±0.3	-	28.5±0.5	27.7±0.3	28.2±0.8	-	29.0±0.0	30.0±0.0	30.0±0.5
	10	32.5±0.5	31.5±0.5	30.2±0.3	30.3±0.4	30.7±0.6	29.5±0.0	31.8±0.3	31.3±0.3	30.5±0.0	31.5±0.5
<i>Sapninas</i>	1	-	-	-	24.5±0.5	-	25.0±0.0	-	-	31.7±0.3	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27.0±0.0
	3	-	32.5±0.5	32.0±0.0	-	29.8±0.3	-	-	-	-	31.8±0.3
	1	-	-	-	5.7±0.3	6.0±0.0	-	5.0±0.0	-	-	4.0±0.0
	2	-	-	-	10.0±0.0	9.2±0.8	-	9.2±0.3	-	-	9.5±0.0
	3	-	-	-	-	-	-	13.5±0.0	-	-	-
	4	16.0±0.0	-	-	15.5±0.0	16.2±0.3	17.0±0.0	-	-	-	16.3±0.4
<i>Triterpenos</i>	5	-	19.0±0.0	20.8±0.3	-	19.5±0.0	20.7±0.6	-	18.3±0.3	19.2±0.3	-
	6	21.5±0.7	23.0±0.0	-	23.5±0.5	23.0±0.0	23.2±0.3	23.7±0.6	23.0±0.5	22.8±0.3	-
	7	-	25.0±0.0	26.5±0.5	-	25.0±0.0	-	27.2±0.3	-	-	26.5±0.9
	8	-	28.0±0.0	-	29.8±0.3	29.0±0.0	28.3±0.6	29.5±0.0	30.3±0.6	-	27.5±0.7
	9	-	31.5±0.0	31.8±0.3	31.8±0.3	-	31.8±0.3	32.5±0.5	32.7±0.6	-	32.0±0.5

Se muestra la media ± DE (n = 3). RT: Extracto de raíces transformadas; R: Extracto de raíces no transformadas; T: Extracto de región intermodal de planta no transformada; y H: Extracto de hojas de planta no transformada. Identificación de fitoquímicos por color de acuerdo a Wagne y Bladt (1996). AB: Azul brillante, AC: Azul claro, AF: Azul fuerte, AFL: Azul fluorescente, AM: Amarillo, AO: Azul oscuro, AVF: Azul-verde fluorescente, CF: Café, GR: Gris, MO: Morado, NA: Naranja, RB: Rojo brillante, RJ: Rojo, VL: Violeta, VO: Verde oscuro.

### 7.6.1. Aceites esenciales

El uso del sistema formado por hexano ( $k=2.0$ ) y acetato de etilo ( $k=6.0$ ) como fase móvil, proporcionó una buena separación e identificación de las sustancias oleosas presentes en todas las muestras analizadas. En la identificación y comparación de aceites esenciales tomando en cuenta plantas completas crecidas *in vitro*, se observaron cinco manchas oscuras para RT (1, 2, 4, 6 y 8), siete para R (1-4, 6, 8-9) y 9 para PC (1-9) bajo luz UV a 254 nm (Figura 56, A). Bajo la luz visible, se pudo constatar la amplia gama de estos compuestos con la aparición de manchas de diferente color: azul fuerte (1 y 3), rojo (2) y café (4 y 8) en los tres extractos, y uno azul fuerte en PC (10) (Figura 56, B). Los extractos de PC resultaron con manchas azules que no se encontraron en los otros dos extractos, y manchas rojas, presentes en los extractos de R y PC.

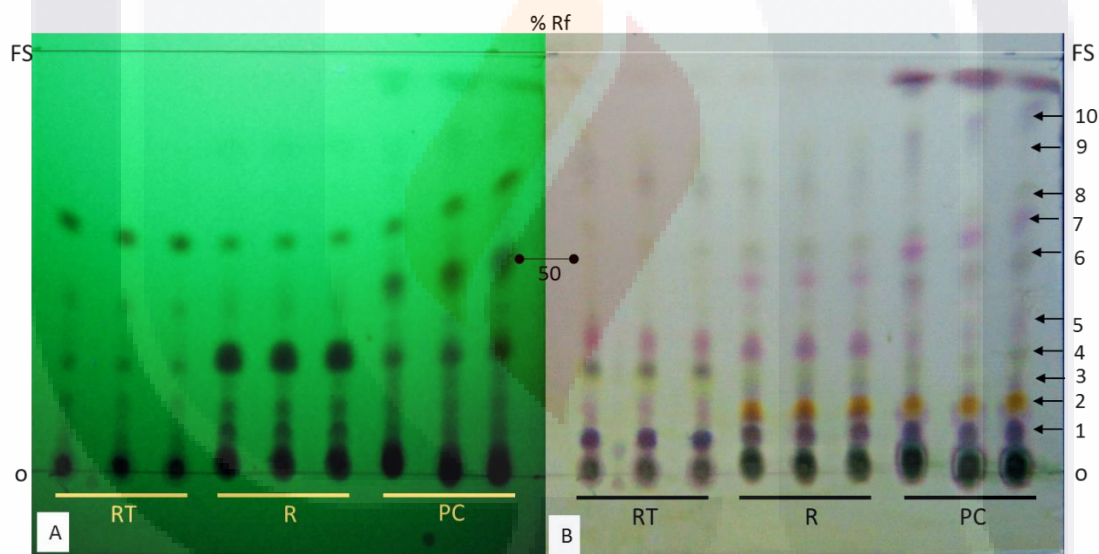


Figura 56. TLC para la detección de aceites esenciales en extractos hexánicos de *Bidens odorata*.  $n = 3$ . A) Visualización bajo luz UV a 254nm; y B) Revelado con reactivo de anisaldehído bajo luz visible. RT: raíz transformada; R: raíz no transformada; PC: planta completa (tallo y hoja) de planta crecida *in vitro*; o: Origen; FS: frente del solvente. Flechas indican la posible presencia de aceites esenciales.

En el análisis de estos aceites mediante su comparación con plantas crecidas *ex vitro*, el patrón de manchas tanto bajo luz UV a 254 nm (Figura 57, A) como en la región visible, se conservó, con la diferencia en algunas intensidades y tonalidades que presentaron los extractos (Figura 57, B). Las manchas 3 se observaron violetas, a comparación del rojo visto anteriormente en R y PC; las

manchas 5 se observaron azules; y las correspondientes a las 9 y 10, se observaron de color azul y violeta intenso, respectivamente.

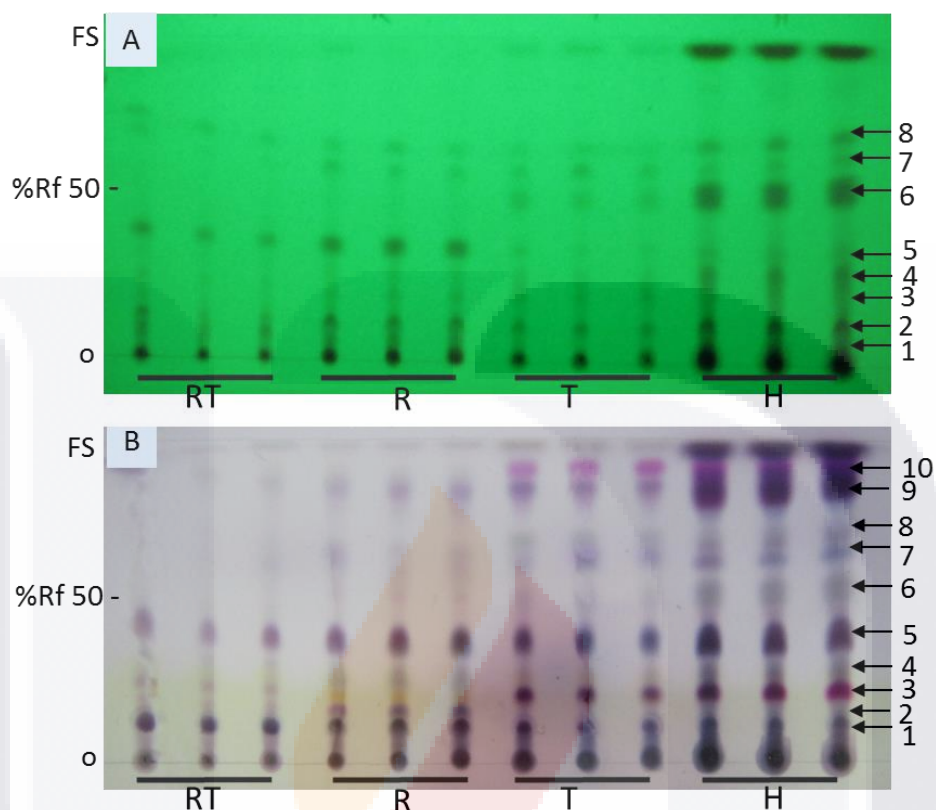


Figura 57. TLC para la detección de aceites esenciales en extractos hexánicos de *Bidens odorata*. n = 3. A) Visualización bajo luz UV a 254nm; y B) Revelado con reactivo de anisaldehído bajo luz visible. RT: Raíz transformada; R: raíz de planta no transformada; T: tallo de planta crecida *ex vitro*; H: hoja de planta crecida *ex vitro*; o: Origen; FS: frente del solvente. Flechas indican la posible presencia de aceites esenciales.

### 7.6.2. Alcaloides

En la prueba de alcaloides comparando con extractos de plantas cultivadas *in vitro*, bajo luz UV a 254nm se distinguieron tres manchas para RT, cuatro para R y seis para PC, dos de tono más oscuro (manchas 2 y 6) (Figura 58, A). Bajo luz UV a 365nm, se observó la mancha 2 para RT, las 2, 3, 4, 5 y 6 en R, y 1, 2, 5 y 6 en PC (Figura 58, B). Las manchas 2 y 5, correspondientes a las más oscuras a 254nm, se visualizaron de color amarillo fluorescente para la mancha 2, y de tono azul-verde las del número 5. Con el reactivo de iodoplatinato, solo se observaron las manchas identificadas bajo luz UV a 365nm de color amarillo,

pero esta vez naranja-café, color similar a los presentados por la feniletilamina (F, % Rf  $26.0 \pm 6.24$ ) y la hordenina (H, % Rf  $10.7 \pm 0.6$ ) (Figura 58, C). El reactivo de Dragendorff solo reveló la feniletilamina y la hordenina (Figura 58, D).

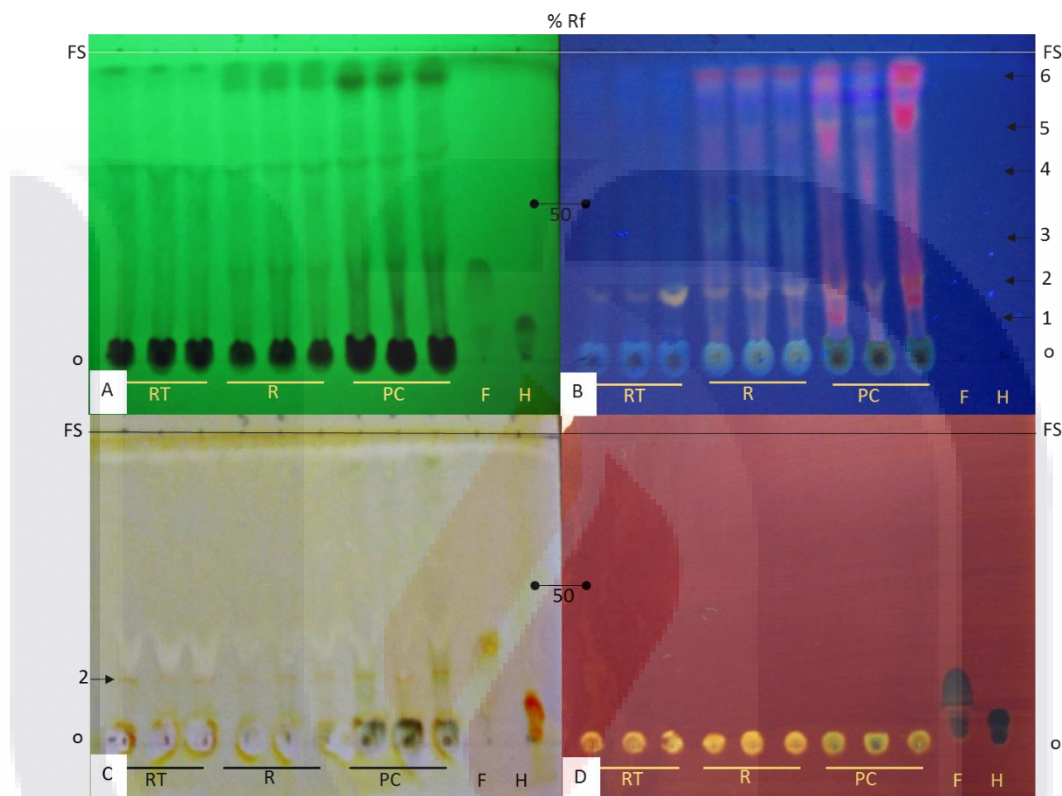


Figura 58. TLC para la detección de alcaloides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíz de planta no transformada; PC: planta completa (tallo y hoja) crecida *in vitro*, F: feniletilamina ( $100\mu\text{g mL}^{-1}$ ); H: hordenina ( $100\mu\text{g mL}^{-1}$ ); o: origen; y FS: frente del solvente. Flechas indican posible presencia de alcaloides. A) Detección bajo luz UV a 254nm; zonas oscuras; B) detección bajo luz UV a 365nm; zonas azules, azul-verde, violeta fluorescente, y amarillo fluorescente; C) detección bajo luz visible mediante el revelado con iodoplatinato; zonas rojas; y D) detección con el reactivo de Dragendorff; zonas oscuras.

En el caso de la comparación con las plantas cultivadas *ex vitro*, el patrón de manchas cambió notablemente en las placas visualizadas bajo luz UV a 254 y a 365nm, con respecto a las plantas crecidas *in vitro*. Se identificaron 2 manchas en UV a 254nm (Figura 59, A) en los extractos R (1 y 2), dos en T (2 y 4), y 4 en H (3, 4, 5 y 9). Los extractos de RT no mostraron manchas oscuras definidas. Bajo luz UV a 365nm, se visualizaron manchas azul fluorescente (línea 4) en los

extractos de R; con el mismo color, pero con menor intensidad, zonas 3 en T; y los que mostraron una mayor cantidad de posibles compuestos de tipo alcaloide, fueron los extractos de H (zonas 4 al 9) (Figura 59, B). El revelado con iodoplatinato, mostró zonas rojas muy finas en los extractos de R, T, e incluso en los de R, los cuales no habían podido ser percibidos anteriormente (línea 1) (Figura 59, C). El tercer extracto de T no mostró la zona roja. Además, pese a todas las zonas que se habían observado mediante las dos longitudes de onda anteriores, los extractos de H no mostraron zonas rojas. En cuanto a la tinción con el reactivo de Dragendorff, éste ayudó a la observación de las mismas manchas de la línea 1, pero en menor medida (Figura 59, D). Los reactivos feniletilamina y hordenina fueron visualizados mediante todos los medios, excepto bajo luz UV a 365nm.

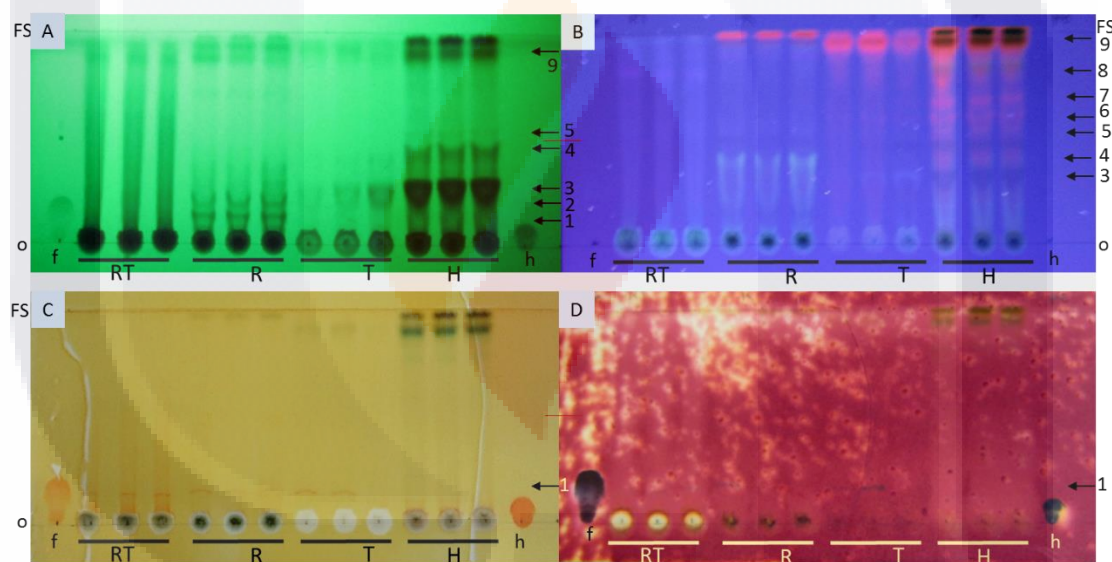


Figura 59. TLC para la detección de alcaloides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíces de planta sin transformar; PC: tallo de planta crecida *ex vitro*, H: hoja de planta crecida *ex vitro*; f: feniletilamina (100µg mL<sup>-1</sup>); h: hordenina (100µg mL<sup>-1</sup>); o: origen; y FS: frente del solvente. Flechas indican posible presencia de alcaloides. Línea roja, %Rf 50. A) Detección bajo luz UV a 254nm; zonas oscuras; B) detección bajo luz UV a 365nm; zonas azules, azul-verdes, violetas fluorescentes, y amarillo fluorescente; C) detección bajo luz visible mediante el revelado con iodoplatinato; zonas rojas; y D) detección con el reactivo de Dragendorff; zonas oscuras.

### 7.6.3. Derivados del antraceno

En la identificación de derivados del antraceno utilizando como comparación platas crecidas *in vitro*, se visualizaron manchas amarillas tanto en luz UV a 254 como a 365nm: una mancha 3 en RT, manchas 1, 3 y 5 en R, y manchas 1-7 en PC, indicando la presencia de antronas y antranoles (Figura 60, A y B). Las manchas rojas que se observan al final de la placa con luz UV a 365nm, probablemente se deba a clorofilas presentes en el extracto, visualizadas en el rango de luz visible de color verde.

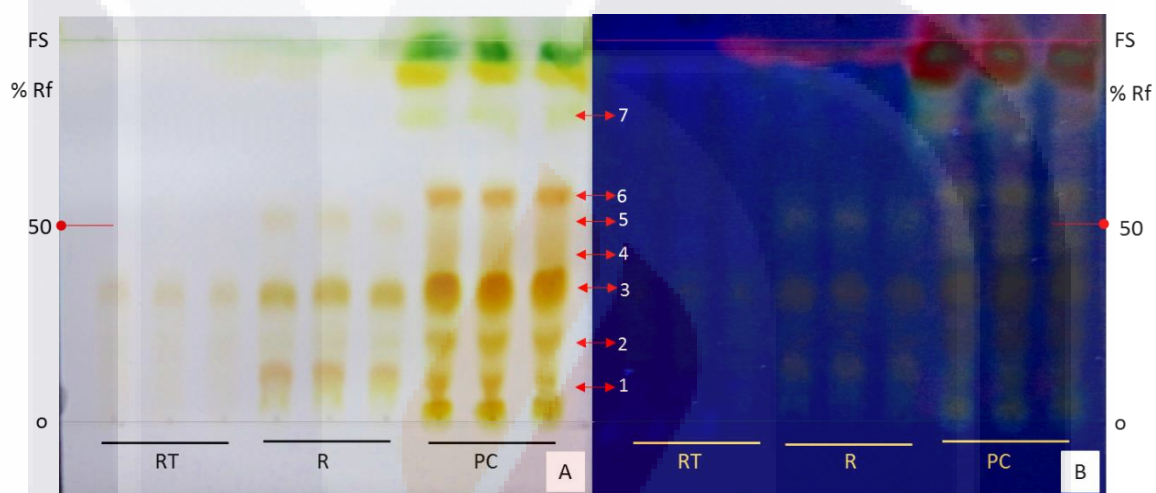


Figura 60. TLC para la detección de derivados del antraceno en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: Raíces de planta sin transformar; PC: Planta completa crecida *in vitro*; o: origen; y FS: frente del solvente. Flechas indican posible presencia de derivados del antraceno. A) Detección bajo luz visible; y B) detección bajo luz UV a 365nm. Ambas placas fueron reveladas mediante la reacción de Bornträger. Antraquinonas se observan como zonas rojas, en el visible y bajo luz UV a 365nm; y las antronas y antranoles, como zonas amarillas en el visible y amarillas fluorescentes en el UV a 365nm.

En el caso de comparar los extractos con plantas crecidas *ex vitro*, el revelado y observación con luz visible, reveló en los extractos de RT más manchas amarillas (1, 2 y 4) que en el anterior análisis; para R, dos amarillas (2 y 4) y dos rojas (1 y 7); para T, la línea 1 roja, y las 7 y 8, aunque más tenues; y en H, se observaron las zonas correspondientes a las líneas 1, 6, 7 y 8 rojas, y las 2 y 4, amarillas (Figura 61, A). Al observar la placa en luz UV a 365nm, no se observaron manchas amarillas, solo las rojas distinguidas en el visible (Figura 61, B).



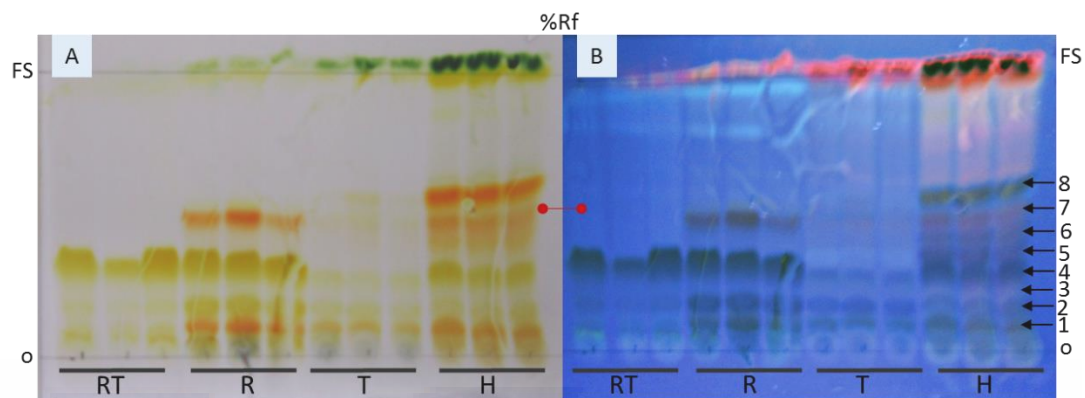


Figura 61. TLC para la detección de derivados del antraceno en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: Raíces de planta sin transformar; T: tallo de planta crecida *ex vitro*; H: hoja de planta crecida *ex vitro*; o: origen; y FS: frente del solvente. Flechas indican posible presencia de derivados del antraceno. A) Detección bajo luz visible; y B) detección bajo luz UV a 365nm. Ambas placas fueron reveladas mediante la reacción de Bornträger. Antraquinonas se observan como zonas rojas, en el visible y bajo luz UV a 365nm; y las antronas y antranoles, como zonas amarillas en el visible y amarillas fluorescentes en el UV a 365nm.

#### 7.6.4. Flavonoides

En la prueba de los flavonoides, empleando para la comparación planta crecida *in vitro*, los extractos exhibieron la posible presencia de flavonoides de tipo cumarina bajo la luz UV a 254nm, mediante la visualización de manchas oscuras, mediante el revelado de las manchas 4 y 6 en los extractos de PC que coincidieron con las observadas en R y RT (Figura 62, A). Se identificó la mancha 2 en RT y en R, mas no en PC, y la 3 tanto en RT como en PC. Bajo luz UV a 365nm la diferenciación fue mejor, ya que las manchas 4 de PC presentaron color azul oscuro; las manchas 1, 2, 3 y 6, azul fluorescente, indicando la posible presencia de flavonoides que contienen ácidos fenolcarboxílicos; y las manchas 5 de PC amarillo oscuro (Figura 62, B). La quercetina presentó dos manchas azul fluorescente con %Rf de  $88.5 \pm 0.7$  y  $74.0 \pm 4.0$ .

En el análisis empleando plantas crecidas *ex vitro*, prácticamente se mantiene el mismo patrón de manchas oscuras visualizadas bajo luz UV a 254nm en el análisis con plantas crecidas *in vitro*. Se identificaron 4 manchas en RT (2, 5, 7 y 8); 5 en R (3, 5, 6 7 y 9); 4 en T (3, 5, 7 y 9); y 7 en H (1, 5, 6 - 10) (Figura 63, A). En el caso de la luz UV a 365nm, las manchas de color azul intenso se

observaron en los extractos de R (3 y 6), ligeramente en T (3) y en H (7). En cuanto a manchas de color azul-verde fluorescentes, se identificaron 2 en RT (4 y 6), 4 en R y T (2, 4, 7 y 9), y 4 en H (1, 2, 4 y 9) (Figura 63, B).

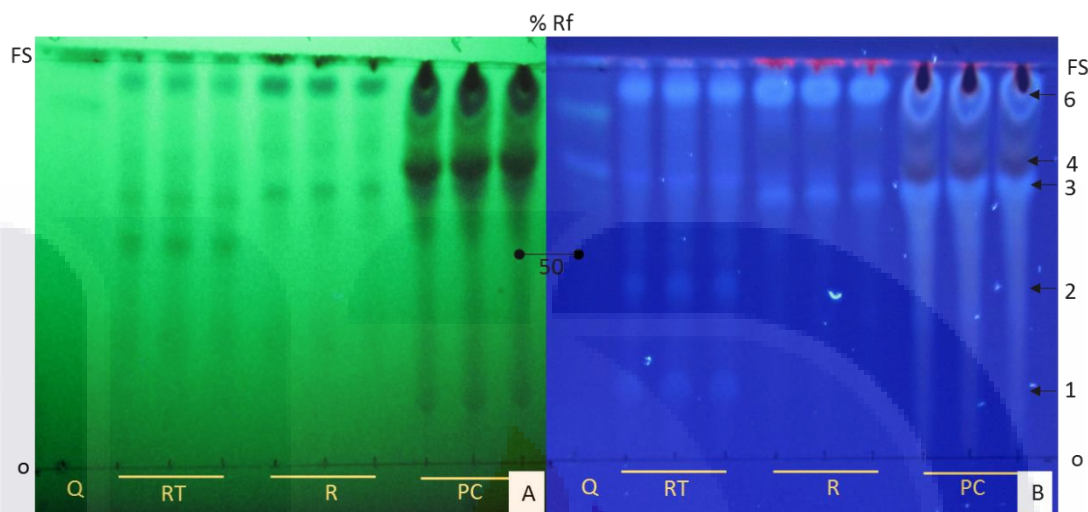


Figura 62. TLC para la detección de flavonoides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíces de planta sin transformar; PC: planta completa (tallo y hoja) crecida *in vitro*, Q: quercetina; o: Origen; y FS: frente del solvente. Flechas numeradas indican posible presencia de flavonoides. A) Detección bajo luz UV a 254nm; zonas oscuras; B) detección bajo luz UV a 365nm, varios colores dependiendo del tipo de flavonoide.

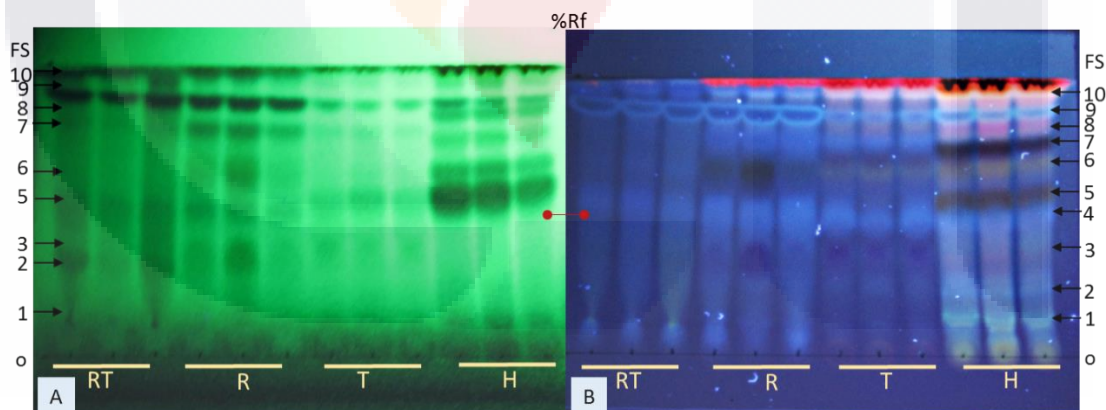


Figura 63. TLC para la detección de flavonoides en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíces de planta sin transformar; T: tallo de planta crecida *ex vitro*; H: hoja de planta crecida *ex vitro*; o: Origen; y FS: frente del solvente. Flechas numeradas indican posible presencia de flavonoides. A) Detección bajo luz UV a 254nm; zonas oscuras; B) detección bajo luz UV a 365nm, varios colores dependiendo del tipo de flavonoide.

### 7.6.5. Glicósidos de terpenos dulces (glicósidos de diterpeno y triterpeno) y esteroides

La prueba para la detección de glicósidos de diterpenos dulces y esteroides comparando con planta cultivada *in vitro*, mostró solo una mancha de color café en los tres tipos de extractos (línea 1), indicando de esta manera la presencia de este tipo de compuestos (Figura 64).

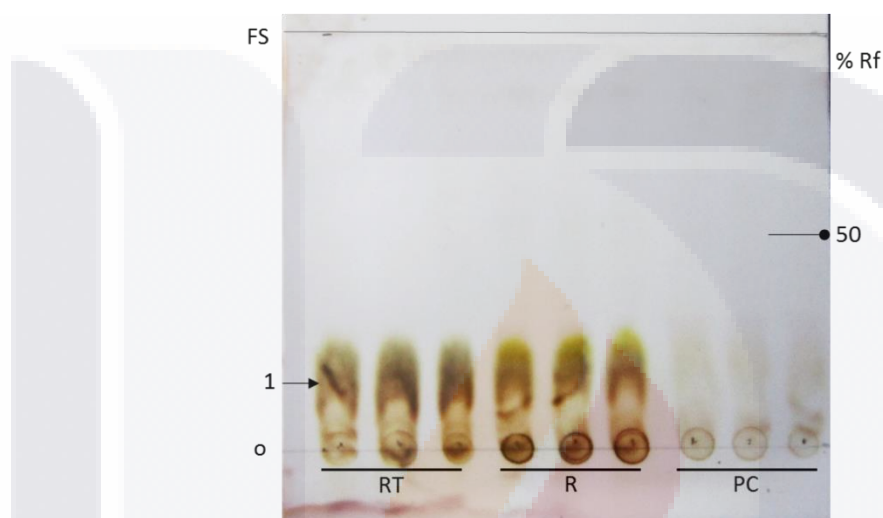


Figura 64. TLC para la detección de glicósidos de diterpenos, triterpenos y esteroides en extractos acuosos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíces de planta sin transformar; PC: planta completa (tallo y hoja) crecida *in vitro*; o: origen; y FS: frente del solvente. Flecha indica la posible presencia de los compuestos buscados. Detección bajo luz visible mediante el revelado con el reactivo de Liebermann-Burchard a temperatura de 100 °C; zonas de color café, azul-violeta o rojo-violeta.

La comparación con planta crecida *ex vitro*, se hizo mediante la visualización con luz UV a 254nm, y con el revelado usando el reactivo de Liebermann-Burchard a 365nm y en luz visible. En el caso de la luz UV a 254nm, se identificaron varias manchas oscuras, con mayor cantidad en los extractos de RT (zonas 1, 2, 3, 5, 7 y 8) y H (zonas 1, 2, 5, 7-10) (Figura 65, A). Al observar la placa en luz visible, algunas manchas se diferenciaron mejor por medio de su coloración, mientras que otras se observaron tenues. En el caso de RT, las manchas de la zona 1 se presentaron de color café oscuro, coincidiendo en el color con las de R a la misma altura, pero con menor intensidad (Figura 65, B). Además, se visualizó en RT la mancha 2, que coincide con los extractos de R y H, todos en color gris-violeta. Las manchas 8 y 9 de los extractos de T y H, mostraron

también coloración gris-violeta; y todas las manchas 10 se observaron café. Bajo luz UV a 365nm, se observaron varias manchas de color azul. RT presentó, en un color azul muy intenso, la mancha 1 y de azul claro 7-10 (Figura 65, C). En el caso de R, la mancha 1 se observó amarilla, y las demás en azul y azul-verde, con una mejor definición de la mancha 4. En el caso de T, se observaron menos manchas, siendo las 5, 8-10 las de mejor definición. E en el caso de H, se observaron varios compuestos, en general, en tonos azules (2, 4, 6, 7-10).

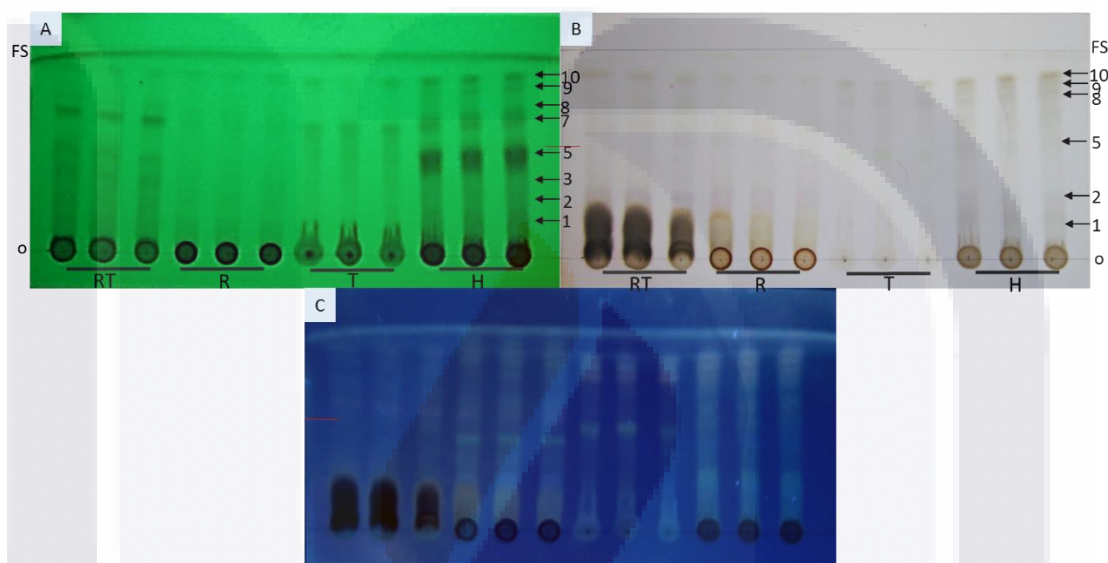


Figura 65. TLC para la detección de glicósidos de diterpenos, triterpenos y esteroides en extractos acuosos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíces de planta sin transformar; T: tallo de planta crecida *ex vitro*; H: hoja de planta crecida *ex vitro*; o: origen; y FS: frente del solvente. Flecha indica la posible presencia de los compuestos buscados. Detección bajo luz visible mediante el revelado con el reactivo de Liebermann-Burchard a temperatura de 100 °C; zonas de color café, azul-violeta o rojo-violeta.

### 7.6.6. Saponinas

Empleando plantas cultivadas *in vitro*, las saponinas se detectaron por la aparición de las manchas 1 y 2 de color café en los extractos de RT bajo luz visible, encontradas también en los otros extractos (Figura 66, A). Los extractos de R mostraron una mayor cantidad de manchas de color café, rojo, amarillo y azul-violeta (zonas 1-6), y en los extractos de PC se observaron solo tres manchas (1, 2 y 6) de color café y azul-violeta. La placa bajo luz UV a 365nm mostró el mismo patrón que en luz visible más una de color violeta (zona 5) en

PC (Figura 66, B). Se observó en R la mancha 4 de color verde fluorescente, no detectada en ningún otro extracto.

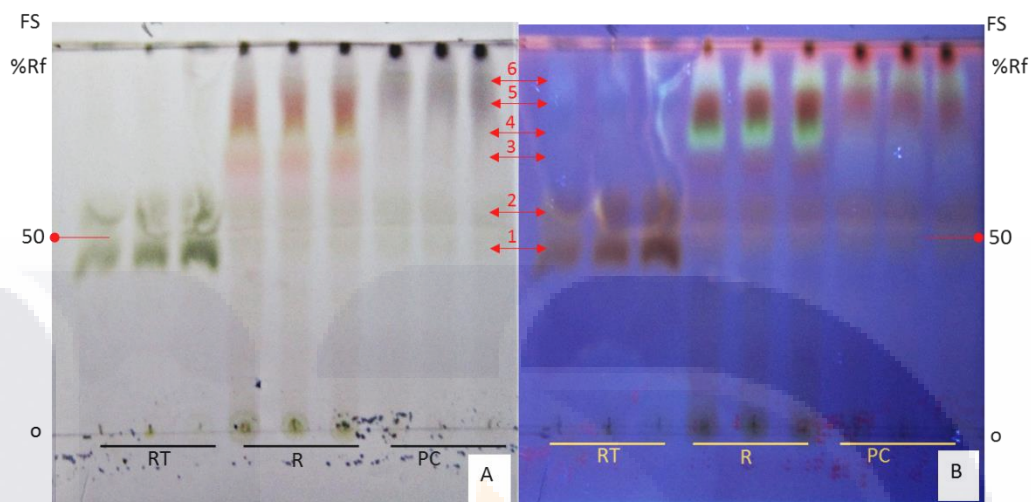


Figura 66. TLC para la detección de saponinas en extractos etanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: Raíces de planta sin transformar; PC: Planta completa crecida *in vitro*; o: Origen; y FS: Frente del solvente. Flechas indican posible presencia de saponinas. A) Detección bajo luz visible mediante el revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico, a temperatura de 100 °C; zonas de color azul-violeta, rojas, amarillas y cafés. B) Detección bajo luz UV a 365nm; zonas de color azul, violeta y verde fluorescente.

En el caso de la comparación con plantas cultivadas *ex vitro*, solo se detectaron tres posibles compuestos de tipo saponina. En RT, se observaron manchas de color azul que no habían sido detectadas anteriormente (zona 3); en R, se visualizaron dos manchas: una amarilla (2) y otra roja (3). En el caso de T no se detectó ningún compuesto; y finalmente, en H se detectaron también manchas azules (3), probablemente del mismo tipo que las detectadas en RT (Figura 67, A). Bajo luz UV a 365nm, no hubo una buena definición de colores entre las manchas detectadas. En el caso de RT se observó la misma mancha 3; en R, las zonas observadas en el visible se vieron como una misma mancha y, aparte, se diferenció otra (1); en T no se definieron manchas; y en H, se distinguieron dos: 1 y 3, donde la 1 en el visible no fue percibida (Figura 67, B).

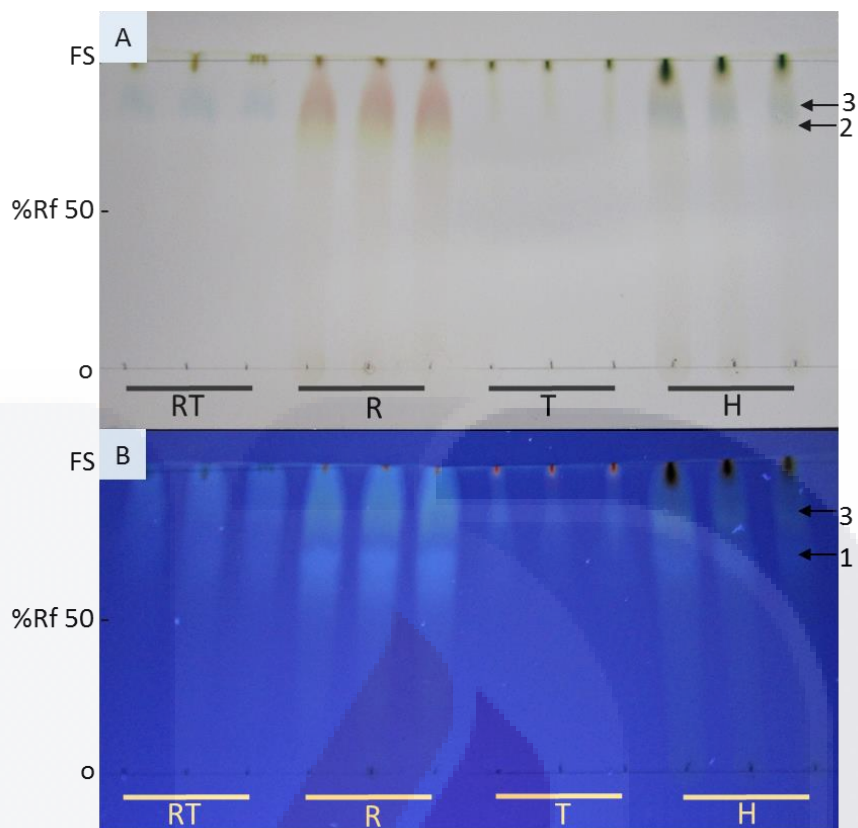


Figura 67. TLC para la detección de saponinas en extractos etanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíces de planta sin transformar; T: tallo de planta crecida *ex vitro*; H: hoja de planta crecida *ex vitro*; o: origen; y FS: frente del solvente. Flechas indican posible presencia de saponinas. A) Detección bajo luz visible mediante el revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico, a temperatura de 100 °C; zonas de color azul-violeta, rojas, amarillas y cafés. B) Detección bajo luz UV a 365nm; zonas de color azul, violeta y verde fluorescente.

### 7.6.7. Triterpenos

En el caso de los triterpenos empleando como comparación plantas cultivadas *in vitro*, bajo luz UV a 254nm, los extractos exhibieron cinco manchas para cada uno de ellos. En el extracto de RT apareció la mancha 2 que también se observó en PC, mientras que la mancha 6 solo se encontró en R (Figura 68, A). Con la luz UV a 365nm, ya no se observó la mancha 1 visualizada a 254nm, sin embargo, en los extractos de RT se observaron manchas azul fluorescente bien definidas (3) que no se observaron en luz a 254nm (Figura 68, B). Usando el reactivo de anisaldehído-ácido sulfúrico hubo una mejor definición de las manchas correspondientes a triterpenos. En los extractos de RT se observaron

manchas de color azul-violeta, que se encontraron también en los extractos de R y PC, además de otra mancha correspondiente a la mancha 4, del mismo color, pero solo en PC. Los extractos de R y PC mostraron mancha de color rojo-violeta (6) (Figura 68, C).

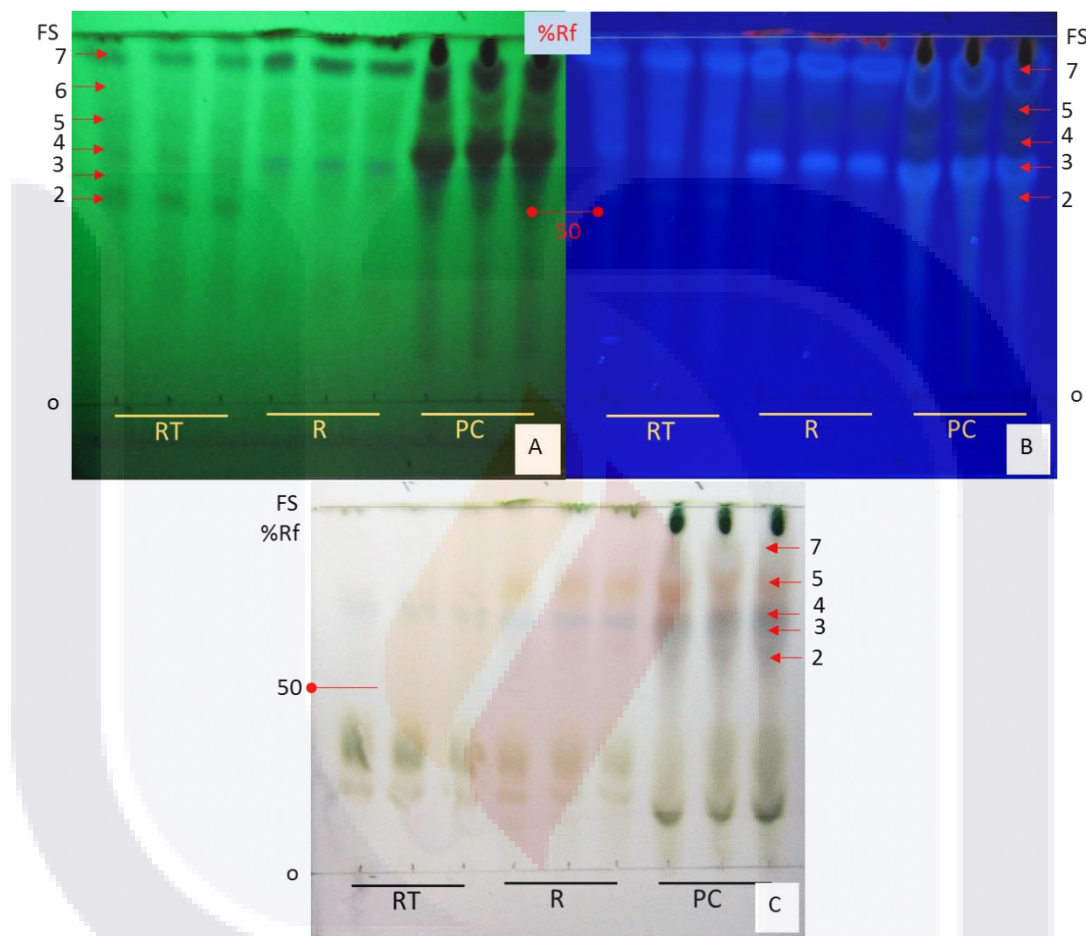


Figura 68. TLC para la detección de triterpenos en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: raíces de planta sin transformar; PC: planta completa crecida *in vitro*; o: origen; y FS: frente del solvente. Flechas indican posible presencia de saponinas. A) Detección bajo luz UV a 254nm; zonas oscuras; B) Detección bajo luz UV a 365nm; zonas de color azul fluorescente, isoflavonas y derivados; y C) Detección bajo luz visible mediante el revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico, a temperatura de 100 °C; zonas azul y rojo-violetas.

En el caso de la identificación de triterpenos comparando con plantas *ex vitro*, la observación con luz UV a 254nm, reveló manchas, aunque no muy bien definidas, en los cuatro tipos de extractos. En el caso de RT se observaron 2, en R 5, en T 4 y en H 4 (Figura 69, A). Al revelar la placa y observarla bajo luz UV

a 365nm, se diferenciaron las manchas identificadas anteriormente con diferentes coloraciones. Se observaron manchas de color azul fluorescentes, las cuales presuntamente podrían ser isoflavonas o derivados de ellas en RT, R y T (zona 6), y en H (zonas 2-4 y 6) (Figura 69, B). Además, se observaron manchas azul oscuro (5) en R y T, y manchas en tonos violetas en H (5, 8 y 9). Al analizar la placa bajo la luz visible, se observaron manchas muy interesantes: en R se observó la mancha 6 de color azul, indicando la posible presencia de las isoflavonas, coincidiendo con el extracto de R, aunque más tenue (Figura 69, C). Estas manchas no son visibles en los otros dos extractos. Se observaron también manchas violetas (5) en R y T, manchas amarillas en T (8) y en H (8 y 9); y otras más en tonos cafés.

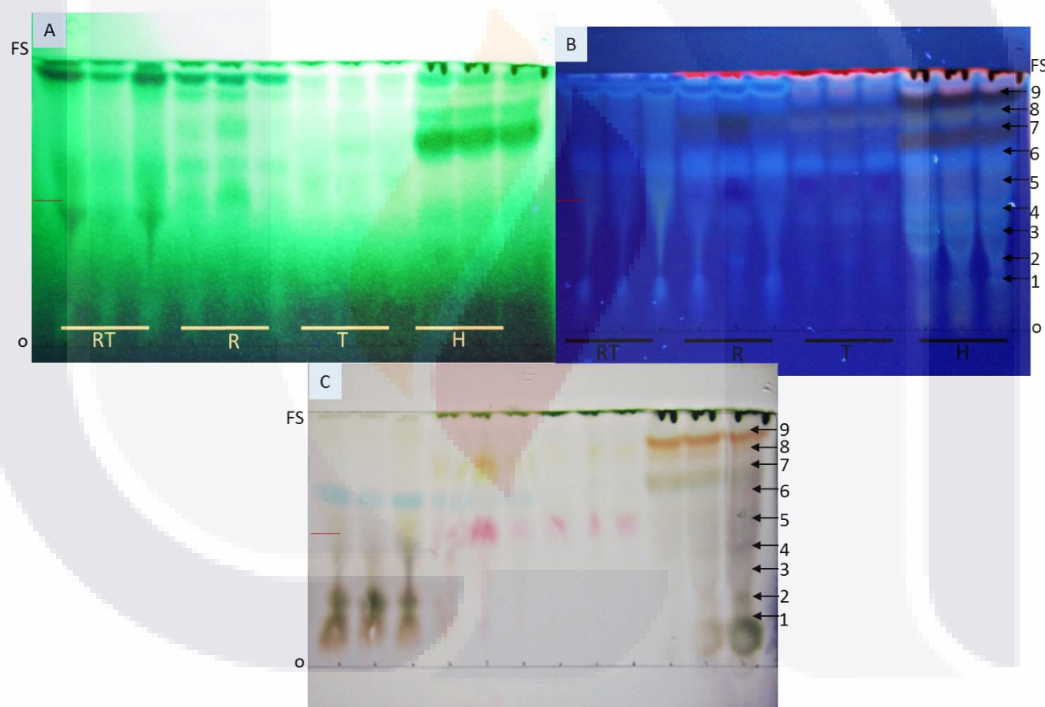


Figura 69. TLC para la detección de triterpenos en extractos metanólicos de *Bidens odorata*. n = 3. RT: Raíces transformadas; R: Raíces de planta sin transformar; PC: Planta completa crecida *in vitro*; o: Origen; y FS: Frente del solvente. Flechas indican posible presencia de saponinas. A) Detección bajo luz UV a 254nm; zonas oscuras; B) Detección bajo luz UV a 365nm; zonas de color azul fluorescente, isoflavonas y derivados; y C) Detección bajo luz visible mediante el revelado con anisaldehído-ácido sulfúrico, a temperatura de 100 °C; zonas azul y rojo-violeta.



La amplia gama de fitoquímicos detectados en los diferentes extractos, tiene una gran relevancia, ya que se tienen reportes del género *Bidens* de varias actividades biológicas debido a fitoquímicos encontrados, como glicósidos de poliacetileno, auronas, glicósidos de aurona, derivados del ácido p-cumárico, flavonoides y glicósidos de flavonoides, sesquiterpenos, glicósidos de fenilpropanoides y diterpenos (Zahara *et al.* 2015). Además, en otros estudios, en extractos acuosos de *B. odorata* se reportó la presencia de alcaloides, saponinas, taninos y azúcares reductores (Astudillo-Vázquez *et al.* 2008), así como de triterpenos y flavonoides (Andrade Cetto & Heinrich 2005; Astudillo-Vázquez *et al.* 2008); y de ácidos oleico, palmítico, linoleico y esteárico (Zavala Mendoza *et al.* 2013). Varios fitoquímicos aislados de diversas plantas medicinales alrededor de todo el mundo han exhibido un gran potencial medicinal. Compuestos derivados de terpenoides, como las antraquinonas de *Rumex hymansepalus* y triterpenoides de *Amphipteryngium adstringens*, han mostrado actividad antimicrobacteriana (Bisht *et al.* 2006); a este tipo de compuestos también se les atribuyen efectos antibacterianos (Palombo 2006). Los esteroides de plantas como *Ajuga remota* y *Physalis angulata* han mostrado actividad antimicrobacteriana (Bisht *et al.* 2006); los alcaloides tienen reportes de actividad antimicrobacteriana (Bisht *et al.* 2006) y antimicrobiana (Palombo 2006), por lo que plantas con estos fitoquímicos pueden ser usados en el tratamiento contra enfermedades del género *Mycobacterium* y en la diarrea. Reportes indican que también los aceites esenciales tienen una alta actividad antioxidante, como los ya reportados para el género *Bidens* (Zahara *et al.* 2015), efecto antidiarreico, como el aceite esencial de *Satureja hortensis* (antiespasmódico con un alto contenido en compuestos fenólicos), y efecto antibacteriano (Palombo 2006). Los flavonoides también han sido identificados como compuestos activos contra la diarrea causada por protozoarios (Palombo 2006). El número mayor de compuestos se observó en el perfil de aceites esenciales, donde del total de posibles aceites esenciales, entre 4 y 7 se presentaron en los extractos de RT, lo que implica la actividad antioxidante que pueden presentar estos extractos.

## 8. CONCLUSIONES

- Se establecieron protocolos exitosos para la micropropagación a partir de yemas axilares para las especies *Bidens odorata*, *Chenopodium album*, *Chenopodium graveolens*, *Cucurbita foetidissima*, *Eysenhardtia polystachya* y *Lepidium virginicum*.
- La adición de BA en el medio para micropropagar a *B. odorata*, *C. album*, *C. foetidissima* y *E. polystachya*, fue el tratamiento más eficiente.
- *L. virginicum* fue la única especie en generar el promedio mayor de brotes por explante en el medio desprovisto de RCV.
- Los tratamientos de micropropagación empleados no fueron óptimos para micropropagar a *C. graveolens* y *J. dioica*, por lo que se necesitan hacer otras pruebas, ya sea modificando RCV o las concentraciones de los mismos.
- La especie *B. odorata* resultó ser altamente susceptible a la transformación genética mediante *A. rhizogenes*.
- Las cepas bacterianas A4/pESC4 y ARqua1 generaron el mayor número de raíces por explante de *B. odorata*, siendo la cepa A4/pESC4 la que desarrolló raíces capaces de crecer indefinidamente.
- La mayor cantidad de biomasa se obtuvo a las 3 semanas del subcultivo de las raíces, en medio MS líquido, con agitación constante de 80 rpm y fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.
- Cambios de medio MS fresco a intervalos más cortos, generan FGIs más elevados, de hasta 18.5.
- Destaca la gran variedad de fitoquímicos en raíces transformadas, así como en raíces no transformadas y en planta completa (regiones internodales y hojas), que probablemente le confieren las propiedades medicinales que se le atribuyen, sobre todo en el análisis de aceites esenciales.
- Las raíces transformadas de *B. odorata* pueden ser empleadas para la obtención de metabolitos de interés farmacológico, e incluso para fines terapéuticos.

- Los sistemas de producción *in vitro* de esta planta pueden ser considerados una opción viable para la obtención de fitoquímicos de interés farmacológico.



## 9. GLOSARIO

**Aquenio.** Fruto seco que contiene una sola semilla, cuya envoltura externa no está pegada a la misma.

**Auxina.** Regulador de crecimiento vegetal encargadas principalmente de la elongación celular.

**Axilar.** Ángulo superior que forma la unión de una rama u hoja con el eje de un tallo.

**Biomasa.** Cantidad total de materia viva presente en un espacio.

**Célula cortical.** Célula de la corteza vegetal.

**Citocinina.** Regulador de crecimiento vegetal que promueve la división y diferenciación celular.

**Densidad óptica.** Magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico para una longitud de onda determinada.

**Diurético.** Sustancia capaz de aumentar la secreción y excreción de orina.

**Dominancia apical.** Tendencia marcada a mostrar un mayor crecimiento del ápice (punta) de cada rama principal.

**Endonucleasa.** Son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster en diferentes regiones localizadas en el interior de una cadena polinucleotídica.

**Espasmolítico.** Sustancia que tiene la capacidad de aliviar o calmar los espasmos o convulsiones.

**Exógeno.** Del exterior, de la parte externa de una cosa.

**Explante.** Parte de un organismo vivo, como las células, los tejidos o los órganos, que son transferidos a un medio artificial para su cultivo.

**Fascículo.** Es un conjunto de hojas aciculares o de flores que forma un fajo.

**Fenotipo.** Son todos los rasgos particulares genéticamente heredados de cualquier organismo que lo hacen único e irrepetible en su clase.

**Hiperhidricidad.** Fenómeno fisiológico en el cultivo de tejidos vegetales caracterizado por una alta retención de agua a causa de condiciones adversas de los cultivos.

**Internudo.** Es la parte comprendida entre dos nudos de donde sale otra ramificación.

**Lignina.** Sustancia natural que forma parte de la pared celular de muchas células vegetales, que proporcionan dureza y resistencia a la célula.

**Micropropagación.** Conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

**Perianto.** Estructura floral formada por el cáliz y la corola, el cual protege a los órganos reproductores de la flor.

**Periplásmico.** Compartimento localizado entre la membrana externa celular y la citoplásmica.

**Plagiotrópico.** Crecimiento generalmente horizontal o paralelo al suelo.

**Plásmido.** Molécula circular de ADN extracromosómico que se replica de forma independiente al ADN cromosómico.

**Quimioatrayente.** Sustancias orgánicas o inorgánicas que poseen un efecto inductor de quimiotaxis en células móviles.

**Quimiotaxis.** Reacción de orientación de los organismos celulares libres como respuesta a un estímulo químico.

**Raíz pilosa.** Es aquella que surge a partir de la infección con *Agrobacterium rhizogenes*, y se caracteriza por tener una abundante vellosidad y crecimiento plagiotrópico.

**Región internodal.** Región comprendida entre dos nudos de la planta.

**Regulador de Crecimiento Vegetal (RCV).** Llamado también fitohormona. Molécula que se encuentra en cantidades pequeñas en los tejidos vegetales,

capaz de regular de forma predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas.

**Testa.** Capa más externa de la semilla.

**Virulencia.** Grado de la capacidad de un organismo de infectar y producir una enfermedad.



## 10. REFERENCIAS

- Acuña, A. U. & Amat Guerri, F. 2007: Early History of Solution Fluorescence: The Lignum nephriticum of Nicolás Monardes. *Springer Series on Fluorescence*. 4, 3-20.
- Alvarez, L. & Delgado, G. 1999: C- and O-Glycosyl-alpha-hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. *Phytochemistry* 50, 681-687.
- Andrade Cetto, A. & Heinrich, M. 2005: Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 325-348.
- Astudillo-Vázquez, A., Davalos Valle, H., De Jesús, L., Herrera, G. & Navarrete, A. 2008: Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. *Fitoterapia* 79.
- Balleza, J. J. & Enríquez, E. D. 2007: Inventario y uso de plantas medicinales en el estado de Zacatecas. In *Época*, N. (ed.): *XI Jornadas de Investigación*., pp. Revista Investigación Científica.
- Barba Avila, M. d. I. D., Hernández Duque, M. C. & De la Cerda Lemus, M. 2003: *Plantas útiles de la región semiárida de Aguascalientes*. 235 pp. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags.
- Bisht, D., Owais, M. & Venkatesan, K. 2006: Potential of Plant-Derived Products in the Treatment of Mycobacterial Infections. *Modern Phytomedicine*, 293-311 pp. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bonzani, N. E., Barboza, G. E., Bugatti, M. A. & Espinar, L. A. 2003: Morpho-histological studies in the aromatic species of *Chenopodium* from Argentina. *Fitoterapia* 74, 207-225.
- Calzada, F., Barbosa, E. & Cedillo-Rivera, R. 2003: Antiamoebic activity of benzyl glucosinolate from *Lepidium virginicum*. *Phytotherapy Research* 17, 618-619.
- Camargo, M. E. M., Berdeja, B. & Miranda, G. 2004: Diuretic effect of the aqueous extract of *Bidens odorata* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 363-366.
- Camilleri, C. & Jouanin, L. 1991: The TR-DNA región carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction tobacco plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 155-162.
- Chabaud, M., Boisson Dernier, A., Zhang, J., Taylor, C. G. & Yu, O., Barker, David G. 2006: *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation.: *Medicago truncatula Handbook*, 8 pp. The Samuel Roberts Noble Foundation.
- Chandra, S., Lata, H. & Varma, A. 2013: Biotechnology for Medicinal Plants. In Chandra, S., Lata, H. & Varma, A. (eds.): *Micropropagation and Improvement*. Springer.
- Chaudhuri, K., Ghosh, B., Tepfer, D. & Jha, S. 2005: Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. *Plant Cell Reports* 24, 25-35.
- CONABIO 2009: Catálogo taxonómico de especies de México. pp. CONABIO, Mexico City.
- Correa, C. M. 2002: Protección y promoción de la Medicina Tradicional: Consecuencias para la salud pública en los países en desarrollo. In (OMS), O. M. d. I. S. (ed.) Segunda ed., Switzerland.
- Deba, F., Xuan, T. D., Yasuda, M. & Tawata, S. 2007: Herbicidal and fungicidal activities and identification of potential phytotoxins from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff. *Weed Biology and Management* 7, 77-83.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2011: *Jatropha* Diterpenes: a Review. *Journal of the American Oil Chemists Society* 88, 301-322.
- DeVeaux, J. S. & Shultz, E. B. 1985: Development of buffalo gourd (*Cucurbita foetidissima*) as a semiaridland starch and oil crop. *Economic Botany* 39, 454-472.

- Dhakulkar, S., Ganapathi, T. R., Bhargava, S. & Bapat, V. A. 2005: Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science* 169, 812-818.
- Dominguez, X. A., Cano, G., Franco, R., Villarreal, A. M., Watson, W. H. & Zabel, V. 1980: Rioloatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. Sessiflora. *Phytochemistry* 19, 2478-2478.
- Dubois, M. A., Bauer, R., Cagiotti, R. & Wagner, H. 1988: Foetidissimoside A, a new 3,28-bidesmosidic triterpenoid saponin, and cucurbitacins from cucurbita foetidissima. *Phytochemistry* 27, 881-885.
- Eggl, U. 2002: Illustrated handbook of succulent plants: Dicotyledons. 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D. & Guo, Z. G. 1985: MEDICINAL-PLANTS IN THERAPY. *Bulletin of the World Health Organization* 63, 965-981.
- Gaidi, G., Marouf, A., Hanquet, B., Bauer, R., Correia, M., Chauffert, B. & Lacaille-Dubois, M. A. 2000: A new major triterpene saponin from the roots of Cucurbita foetidissima. *Journal of Natural Products* 63, 122-124.
- Girón Hernández, P. 2011: Consultorio de medicina tradicional de la UAZ: 25 años al servicio de la comunidad zacatecana. *Suplemento electrónico semanal de la Coordinación de Comunicación Social, UAZ*. UAZ, Zacatecas, Zac.
- González Elizondo, M., López Enríquez, I. L., González Elizondo, M. S. & Tena Flores, J. A. 2004: Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. Instituto Politécnico de Zacatecas, México, D. F.
- González Stuart, A. E. 2010: Use of medicinal plants in Monterrey, México. *Notulae Scientia Biologicae* 2, 7-11.
- González-Díaz, M. C., Pérez-Reyes, M. E. & Pérez-Molphe-Balch, E. 2006: *In vitro* analysis of susceptibility to *Agrobacterium rhizogenes* in 65 species of Mexican cacti. *Biología Plantarum* 50, 331-337.
- Hanan Alipi, A. M. & Mondragón Pichardo, J. 2009: *Malezas de México, Ficha -Cucurbita foetidissima* Hunk. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/cucurbitaceae/cucurbita-foetidissima/fichas/ficha.htm>. Date accessed: 11 marzo 2014.
- Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C. & Sticher, O. 1998: Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. *Social Science & Medicine* 47, 1859-1871.
- Illina, E. L., Logachov, A. A., Laplaze, L., Demchenko, N. P., Pawlowski, K. & Demchenko, K. N. 2012: Composite Cucurbita pepo plants with transgenic roots as a tool to study root development. *Annals of Botany* 110, 479-489.
- Itkin, M. & Aharoni, A. 2009: Bioengineering. In Osbourn, A. E. & Lanzotti, V. (eds.): *Plant-derived Natural Products*, 435-474 pp. Springer US.
- Jacob, A. & Malpathak, N. 2005: Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80, 247-257.
- Jiménez González, L., Álvarez Corral, M., Muñoz Dorado, M. & Rodríguez García, I. 2008: Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*. 7, 125-154.
- Jouanin, L., Tourneur, J., Tourneur, C. & Casse Delbart, F. 1986: Restriction maps and homologies of the three plasmids of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4. *Plasmid* 16, 124-134.
- Kerr, R. 2002: Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Organización Mundial de la Salud.



- Khoury, N. N., Dagher, S. & Sawaya, W. 1982: CHEMICAL AND PHYSICAL CHARACTERISTICS, FATTY-ACID COMPOSITION AND TOXICITY OF BUFFALO GOURD OIL, CUCURBITA-FOETIDISSIMA. *Journal of Food Technology* 17, 19-26.
- Korcan, S. E., Aksoy, O., Erdogmus, S. F., Cigerci, I. H. & Konuk, M. 2013: Evaluation of antibacterial, antioxidant and DNA protective capacity of *Chenopodium album*'s ethanolic leaf extract. *Chemosphere* 90, 374-379.
- Kunth 2012: *Plants for a future, Cucurbita foetidissima - Kunth*. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Cucurbita+foetidissima>. Date accessed: 11 marzo 2014.
- Laghari, A. H., Memon, S., Nelofar, A., Khan, K. M. & Yasmin, A. 2011: Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. *Food Chemistry* 126, 1850-1855.
- Lozoya, X. & Zolla, C. 1983: Medicina tradicional en México. *Seminario Taller Regional sobre Salud y Culturas Médicas Tradicionales en América Latina y el Caribe*, pp. Instituto Mexicano del Seguro Social, Washington, D. C.
- Makhzoum, A. B., Sharma, P., Bernards, M. A. & Trémouillaux Guiller, J. 2013: Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications. In Gang (ed.): *Phytochemicals, plant growth, and environmental, recent advances in phytochemistry.*, 95-142 pp. Springer Science+Business Media, New York.
- Mankin, S. L., Hill, D. S., Olhoft, P. M., Toren, E., R., W. A., Nea, L., Xing, L., Brown, J. A., Fu, H., Ireland, L., Jia, H., Hillebrand, H., Jones, T. & Song, H.-S. 2007: Disarming and sequencing of *Agrobacterium rhizogenes* strain K599 (NCPPB2659) plasmid pRi2659. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43, 521-535.
- Mata, R., Navarrete, A., Alvarez, L., Pereda-Miranda, R., Delgado, G. & de Vivarf, A. R. 1986: Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Phytochemistry* 26, 191-193.
- Melody, S. C. 1997: *Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual*. pp. Springer Berling Heidelberg.
- Mitic, N., Dmitrovic, S., Djordjevic, M., Zdravkovic-Korac, S., Nikolic, R., Raspor, M., Djordjevic, T., Maksimovic, V., Zivkovic, S., Krstic-Milosevic, D., Stanisic, M. & Ninkovic, S. 2012: Use of *Chenopodium murale* L. transgenic hairy root in vitro culture system as a new tool for allelopathic assays. *Journal of Plant Physiology* 169, 1203-1211.
- Mondragón Pichardo, J. 2009: *Ficha -Chenopodium graveolens Willd.* <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/chenopodium-graveolens/fichas/ficha.htm>. Date accessed: 26 de marzo 2014.
- Murthy, H. N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D. A., Davey, M. R., Power, J. B., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. 2008: Establishment of *Withania somnifera* Hairy Root Cultures for the Production of Withanolide A. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 975-981.
- Naturalista 2016: *Ficha - Cenizo (Chenopodium album)*. <http://www.naturalista.mx/taxa/58127-Chenopodium-album>. Date accessed: 05 de abril 2016.
- NatureServe 2014: *NatureServe Explorer: An online encyclopedia of life*. <http://explorer.natureserve.org/servlet/NatureServe?searchName=Jatropha+dioica>. Date accessed: 15 de abril 2014.
- Olivas Sánchez, M. P. 1999: *Plantas medicinales del estado de Chihuahua*. pp. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Oliveira, F. Q., Andrade-Neto, V., Krettli, A. U. & Brandao, M. G. L. 2004: New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 39-42.

- Osbourn, A. E., Lanzotti, V., Springob, K. & Kutchan, T. 2009: Introduction to the Different Classes of Natural Products. *Plant-derived Natural Products*, 3-50 pp. Springer US.
- Osuna, L., Tapia-Pérez, M. E., Figueroa, O., Jiménez-Ferrer, E., Garduño-Ramírez, M. L., González-Garza, M. T., Carranza-Rosales, P. & Cruz-Vega, D. E. 2006: Micropropagation of *Lepidium virginicum* (Brassicaceae), a plant with antiprotozoal activity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 42, 596-600.
- Osuna Torres, L., Tapia Pérez, M. E. & Aguilar Contreras, A. 2005: *Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico*. pp. Universitat de Barcelona, España.
- Palombo, E. A. 2006: Traditional Plants and Herbal Remedies Used in the Treatment of Diarrheal Disease: Mode of Action, Quality, Efficacy, and Safety Considerations. *Modern Phytomedicine*, 247-269 pp. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Palomeque Carlín, A., Tafoya, F., Alpuche Solís, A. G. & Pérea Molphe Balch, E. 2015: Effect of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six mexican cactus species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 51, 332-339.
- Pavlova, O. A., Matveyeva, T. V. & Lutova, L. A. 2014: *rol*-Genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 4, 137-145.
- Perdomo Roldán, f. & Mondragón Pichardo, J. 2009: *Ficha -Bidens odorata Cav., Aceitilla*. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/bidens-odorata/fichas/ficha.htm>. Date accessed: 24 de enero 2014.
- Perdomo Roldán, F., Mondragón Pichardo, J. & Vibrans, H. 2009: *Las malezas de México, Ficha -Lepidium virginicum L., Lentecilla*. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/brassicaceae/lepidium-virginicum/fichas/ficha.htm>. Date accessed: 07/marzo/2014 2014.
- Pérez Gutiérrez, R. M., Vargas Solís, R., García Dueñas, L. M. & Dávila Badillo, L. 2002: efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de *Eysenhardtia polystachya* sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario. *Boletín del Colegio mexicano de Urología*. 17, 134-139.
- Quandt, H. J., Pühler, A. & Broer, I. 1993: Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study or gene expression in indeterminate-type nodules. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study or gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interacciones* 6, 699-706.
- Rojas Alba, M. 2009: Tratado de Medicina Tradicional Mexicana. *Bases históricas, teoría y práctica clínico-terapéutica*. Tercera ed. TlahuiEdu A.C., Cuernavaca, Morelos, México.
- Roychowdhury, D., Majumder, A. & Jha, S. 2013: *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: Prospects and challenges. In Chandra, S., Lata, H. & Varma, A. (eds.): *Biotechnology for Medicinal Plants*., 462 pp. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sabandar, C. W., Ahmat, N., Jaafar, F. M. & Sahidin, I. 2013: Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* 85, 7-29.
- Scott, S. 2011: Measurement of microbial cells by optical density. *Journal of Validation Technology* 17, 46.
- Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X. & Lavire, C. 2013: Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of

- Agrobacterium* spp. using recA-based PCR. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 351-358.
- Sharma, D., Nandan Dey, Y., Sikarwar, I., Sijoria, R., Wanjari, M. M. & Jadhav, A. D. 2016: *In vitro* study of aqueous leaf extract of *Chenopodium album* for inhibition of calcium oxalate and brushite crystallization. *Egyptian Journal of Basic Applied Sciences*.
- Silva Belmares, Y., Rivas Morales, C., Viveros Valdez, E., De la Cruz Galicia, M. G. & Carranza Rosales, P. 2014: Antimicrobial and Cytotoxic Activities from *Jatropha dioica* roots. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 17, 748-750.
- Sprague Sargent, C. 1892: *The Silva of North America. A description of the trees which grow naturally in North America exclusive of Mexico*. pp. The Riverside Press, Cambridge., Boston and New York.
- Uddin, G., Rauf, A. & Akhtar, S. 2012: Studies on Chemical Constituents, Phytochemical Profile and Pharmacological Action of *Datura alba*. *Middle-East Journal of Medicinal Plants Research* 1, 14-18.
- Veena, V. & Taylor, C. G. 2007: *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43, 383-403.
- Wagner, H. & Bladt, S. 1996: *Plant Drug Analysis. A thin layer chromatography*. Second edition ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Wahby, I. 2007: Aproximaciones biotecnológicas tendentes a la mejora del cáñamo (*Cannabis sativa* L.): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. *Departamento de Fisiología Vegetal*. Universidad de Granada, Granada, España.
- Weigel, D. & Glazebrook, J. 2006: Transformation of *agrobacterium* using the freeze-thaw method. *CSH protocols*.
- Weir, B. 2013: *Agrobacterium or Rhizobium, which name to use?* <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/agrobacterium-or-rhizobium>. Date accessed: 12 de mayo 2014.
- Winans, S. C. 1992: 2-WAY CHEMICAL SIGNALING IN AGROBACTERIUM-PLANT INTERACTIONS. *Microbiological Reviews* 56, 12-31.
- Wong Paz, J. E., Castillo Inungaray, M. L., López López, L. I., Contreras Esquivel, J. C., Nevárez Moorillon, G. V. & Aguilar, C. N. 2010: *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes microbianos. *Acta Química Mexicana* 2.
- Zahara, K., Bibi, Y., Tabassum, S., Mudrikah, Tasneem, B., Haider, S., Araa, A. & Ajmal, M. 2015: A review on pharmacological properties of *Bidens biternata*: A potencial nutraceutical. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 5, 595-599.
- Zavala Mendoza, D., Alarcon Aguilar, F. J., Pérez Gutierrez, S., Escobar Villanueva, M. C. & Zavala Sanchez, M. A. 2013: Composition and Antidiarrheal Activity of *Bidens odorata* Cav. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7.
- Zhi-Bi, H. & Min, D. 2006: Hairy Root and Its Application in Plant Genetic Engineering. *Journal of Integrative Plant Biology* 48, 121-127.