



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS DE LA ACUMULACIÓN DE ALCALOIDES EN
Argemone mexicana L. EN CONDICIONES DE ESTRÉS
BIÓTICO

Tesis que presenta

Elia Abadesa Hernández Hernández

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2022



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Elia Abadesa Hernández Hernández titulado **ANÁLISIS DE LA ACUMULACIÓN DE ALCALOIDES EN *Argemone mexicana* L. EN CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO**, fue realizado en la unidad de Bioquímica y Biología Molecular, bajo la línea de investigación en metabolismo secundario e ingeniería metabólica, en el laboratorio 25 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota y como co-director de tesis Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 08 de septiembre de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Elia Abadesa Hernández Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la **Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**, y forma parte del proyecto titulado **LOCALIZACIÓN DE LOS SITIOS DE SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE LOS ALCALOIDES BENCILISOQUINOLINICOS EN *Argemone mexicana* L (CHICALOTE)**, financiado por CONACYT (CB-2016-0285887), bajo la dirección del **Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota** y del **Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez**.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis al Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota y al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por sus consejos, su disposición, paciencia y, sobre todo, por el conocimiento compartido y la confianza depositada para formar parte de sus grupos de trabajo.

Al Dr. Gregorio Godoy Hernández (UBBMP, CICY) y al Dr. Gumersindo Mirón López (Facultad de Química, UADY) por su participación en el comité tutorial y de revisión de tesis.

A la M. C. Miriam Monforte González por el acompañamiento brindado durante la realización de este proyecto, su amistad y toda la asistencia técnica brindada.

A la Dra. Rosa María Galaz y al Dr. Armando Muñoz Sánchez por la asistencia técnica.

Al M. C. Radamés Álvarez Zapata, por la asesoría en el análisis de los resultados.

Al Dr. Ignacio Islas Flores, por su apoyo como Coordinador Académico de Posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY) por la formación brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada 2020-000013-01NACF-09406, así como al financiamiento obtenido del proyecto CONACYT CB-2016-0285887.

DEDICATORIAS

A mis padres Rosario y Fidencio por el apoyo que me han brindado a lo largo de estos años y por creer siempre en mí.

A mis hermanos especialmente a Fidencio por sus consejos, orientaciones, sus palabras de aliento y por todo su apoyo, a Francisca, Reyna, Ma. Del Rosario y Gonzalo por apoyarme y animarme siempre.

A mis sobrinos por el cariño y apoyo mostrado, a Blanquita, Nadia, Xanath, Arturo, Kike, Itza y Leo.

A mis amigos que se han vuelto familia y que fueron partícipes en esta etapa de mi vida, especialmente al Biólogo Enrique Guerrero Betancourt por el apoyo incondicional brindado, juntos emprendimos este viaje compartiendo experiencias únicas, gracias por las enseñanzas brindadas, recuerdos que atesoraré, donde moran las cosas que he amado...

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. Los alcaloides en las plantas medicinales.....	4
1.2. Alcaloides bencilisoquinolínicos.	7
1.3. El género <i>Argemone</i>	8
1.3.1. <i>Argemone mexicana</i> L.....	9
1.3.2. Composición fitoquímica de <i>A. mexicana</i> L.....	10
1.3.3. Usos etnofarmacológicos de <i>A. mexicana</i> L.	11
1.3.4. Aplicaciones farmacológicas de <i>A. mexicana</i> L.	12
1.3.5. Patógenos que afectan a <i>A. mexicana</i> L.....	12
1. 4. Interacción planta-patógeno.	13
1. 5. Cultivos <i>in vitro</i>	19
1. 5.1. Uso de inductores para la producción de metabolitos secundarios.....	21
1. 5.1.1. Clasificación de los inductores.....	23
1. 5.1.2. Inductores como estimuladores biológicos de respuestas de defensa en plantas....	26
1.5.2. Inducción de la biosíntesis de alcaloides en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	27
RECAPITULACIÓN	29
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVO GENERAL	31

OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
CAPÍTULO II	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1. Material biológico	33
2.1.1 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	33
2.1.2. Tratamientos de inducción en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	33
2.1.3. Plantas sanas e infectadas de <i>A. mexicana</i> L.	35
2.2. Extracción y análisis de alcaloides.	36
2.2.1. Extracción por maceración.	36
2.2.2. Separación por cromatografía en capa fina.	37
2.2.3. Análisis cuantitativo de Sa, Be y Que.	37
2.4. Programas estadísticos.	38
CAPÍTULO III	39
RESULTADOS.....	39
3.1. Modelo de estudio 1. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	39
3.1.1. Obtención de la línea celular de AMME a partir de la línea AM1 de <i>A. mexicana</i> L. y respuesta morfológica.	39
3.1.1. Respuesta morfológica de los tratamientos de inducción de la línea AMME de <i>A.</i> <i>mexicana</i> L.	41
3.1.2. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) del perfil de alcaloides de los tratamientos de inducción de la línea AMME de <i>A. mexicana</i> L.	47

3.1.3. Análisis del contenido de Sa de los tratamientos de inducción de los cultivos <i>in vitro</i> de la línea AMME de <i>A. mexicana</i> L.....	52
3.2. Modelo de estudio 2. Análisis de plantas silvestres de <i>A. mexicana</i> L.....	54
3.2.1. Caracterización morfológica de las colectas de las planta silvestres de <i>A. mexicana</i> L.	54
3.2.2. Aislamiento de los patógenos identificados en las hojas de <i>A. mexicana</i> L.	56
3.2.3.1. Comparación de los perfiles de alcaloides de plantas silvestres de <i>A. mexicana</i> L. obtenidos por cromatografía en capa fina (CCF).	63
3.2.3.2. Análisis cuantitativo del contenido de alcaloides en plantas silvestres infectadas de <i>A. mexicana</i> L.	69
3.2.3.3. Análisis del contenido de Sa en plantas silvestres de <i>A. mexicana</i> L.....	70
3.2.3.4. Análisis del contenido de Be en plantas silvestres de <i>A. mexicana</i> L.....	72
3.2.3.5. Análisis del contenido de Que en plantas silvestres de <i>A. mexicana</i> L.	73
CAPÍTULO IV	75
DISCUSIÓN GENERAL	75
4.1. Discusión del análisis de alcaloides en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	75
4.2. Discusión del análisis de alcaloides en plantas infectadas de <i>A. mexicana</i> L.....	80
4.3. Discusión general.....	86
CAPÍTULO V	90
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	90
5.1. CONCLUSIONES	90
5.1.1. Conclusiones referentes a los cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	90
5.1.2. Conclusiones referentes a las plantas silvestres de <i>A. mexicana</i> L.	90

5.1.3. Conclusiones generales.	91
5. 2. PERSPECTIVAS.....	92
BIBLIOGRAFIA.....	93
ANEXOS.....	100
6.1. Aspecto de los cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	100
6.2. Parámetros de la correlación lineal de los estándares de alcaloides.....	101
6.3. Análisis por CCF del contenido de Sa de callos en medio líquido de <i>A. mexicana</i> L.	101
6.4. Análisis cuantitativo del contenido de Sa en plantas colectadas en población infectada, asintomática y sana de <i>A. mexicana</i> L.	104
6.4.1. Análisis estadístico del contenido de Sa en plantas infectadas de <i>A. mexicana</i> L.	108
6.5. Análisis cuantitativo del contenido de Be en plantas colectadas en población infectada, asintomática y sana de <i>A. mexicana</i> L.	112
6.5.1. Análisis estadístico del contenido de Be en plantas infectadas de <i>A. mexicana</i> L.	118
6.6. Análisis cuantitativo del contenido de Que en plantas colectadas en población infectada, asintomática y sana de <i>A. mexicana</i> L.	121
6.1.6.1. Análisis estadístico del contenido de Que en plantas infectadas de <i>A. mexicana</i> L.	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Algunos alcaloides mencionados en el Cuadro 1.1 7

Figura 1.2. Estructuras de la bencilisoquinolina, la morfina y la Be. 8

Figura 1.3. Diversidad estructural de alcaloides bencilisoquinolínicos..... 9

Figura 1.4. Litografía (A) y fotografía (B) de una planta de *A. mexicana* L 11

Figura 1.5. Alcaloides encontrados en la planta entera de *A. mexicana* L..... 15

Figura 1.6. Metabolitos secundarios presentes en el látex y el aceite de la semilla de *A. mexicana* L..... 16

Figura 1.7. Metabolitos secundarios presentes en las hojas de *A. mexicana* L. 17

Figura 1.8. Algunos de los alcaloides presentes en las raíces de *A. mexicana* L 18

Figura 1.9. Estructura del ácido 12-oxo-fitodienoico..... 19

Figura 1.10. Modelo de cambios en el metabolismo de los carbohidratos en respuesta a la infección por patógenos biotróficos virulentos 22

Figura 1.11. Modo de acción del jasmonato en el proceso de inducción del metabolismo secundario 28

Figura 1.12. Estrategia experimental para el análisis del contenido de alcaloides en *A. mexicana* L. en dos modelos de estudio. 32

Figura 2.1. Esquema de los tratamientos de inducción aplicados. 34

Figura 2.2. Esquema de la colecta de muestras de las plantas analizadas. 36

Figura 3.1. Aspecto de los callos en proceso de aclimatación en el medio líquido a las 24 (A), 48 (B), 72 (C) y 96 (D) hrs. después de iniciar el cultivo..... 40

Figura 3.2. Aspecto de los callos de *A. mexicana* L. después de 168 hrs. (7 días) en medio líquido. 40

Figura 3.3. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 72 hrs. de exposición a una concentración de 100 y 200 μ M de MeJA por 72 hrs.....42

Figura 3.4. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 72 hrs. de exposición a una concentración de 100 y 200 mg/L de EL por 72 hrs42

Figura 3.5. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 96 hrs. de exposición a MeJA a 100 y 200 μ M por 96 hrs.43

Figura 3.6. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 96 hrs. de exposición a EL a 100 y 200 mg/L por 96 hrs.43

Figura 3.7. Aspecto de las cosechas de callos de la inducción individual.....44

Figura 3.8: Aspecto de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. expuestas a inducción secuencial combinada con MeJA 200 μ M y EL 200 mg/L44

Figura 3.9: Aspecto de las cosechas de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. a inducción secuencial con MeJA y EL.45

Figura 3.10: Aspecto de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. expuestas a inducción simultánea a 200 μ M de MeJA y 200 mg/L de EL.45

Figura 3.11: Aspecto de las cosechadas de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. expuestas a inducción simultánea a 200 μ M de MeJA y 200 mg/L de EL.46

Figura 3.12: Detección de Sa, en la línea AMME expuesta a los inductores individuales.....48

Figura 3.13: Detección de Be, en la línea AMME expuesta a los inductores individuales.....49

Figura 3.14. Detección de Sa y Que en la línea AMME expuesta a la inducción secuencial.50

Figura 3.15: Detección de Sa y Que en la línea AMME expuesta a la inducción simultánea.....51

Figura 3.16. Contenido de Sa en los tratamientos de inducción individual de suspensiones celulares de la línea AMME de *A. mexicana* L.53

Figura 3.17: Contenido de Sa en los tratamientos de inducción secuencial de suspensiones celulares de la línea AM1 de *A. mexicana* L.....53

Figura 3.18: Contenido de Sa en los tratamientos de inducción simultánea de suspensiones celulares de la línea AM1 de <i>A. mexicana</i> L.....	54
Figura 3.19. Aspecto de las plantas de <i>A. mexicana</i> L., sanas (A) e infectadas (B) utilizadas en este trabajo.	55
Figura 3.20. Órganos de <i>A. mexicana</i> L. colectados de las poblaciones de plantas (infectadas, asintomáticas y sanas).....	56
Figura 3.21: Presencia de síntomas, como manchas foliares, necrosis y amarillamiento ocasionados por patógenos en hojas de <i>A. mexicana</i> L.....	57
Figura 3.22: Cultivos de los hongos aislados de hojas de <i>A. mexicana</i> L.....	58
Figura 3.23. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema 1 (n-butanol: agua: hidróxido de amonio (8:1:1)) de plantas infectadas de <i>A. mexicana</i> L.	59
Figura 3.24. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema 2 (ciclohexano:etanol (94:6)) de plantas infectadas de <i>A. mexicana</i> L.....	60
Figura 3.25. Combinación de los perfiles cromatográficos obtenidos con los sistemas 1 (panel inferior) y 2 (panel superior) de plantas infectadas de <i>A. mexicana</i> L.....	61
Figura 3.26: Combinación de los perfiles cromatográficos obtenidos con los sistemas 1 (panel inferior) y 2 (panel superior) de plantas asintomáticas de <i>A. mexicana</i> L.	62
Figura 3.27: Combinación de los perfiles cromatográficos obtenidos con los sistemas 1 (panel inferior) y 2 (panel superior) el de plantas sanas de <i>A. mexicana</i> L.....	63
Figura 3.28. Perfil cromatográfico bajo luz UV (330 nm). Sa: sanguinarina, Be: Berberina, Que: Queleritrina. R7: Muestra	64
Figura 3.29: Separación cromatográfica de extractos de hoja infectada (H3-3) en el sistema:n-butanol:agua:hidróxido de amonio (8:1:1).	65
Figura 3.30: Separación cromatográfica de extractos de hoja infectada (H2-3) en el sistema:ciclohexano:etanol (94:6)	65

Figura 3.31. Alcaloides detectados en las hojas de <i>A. mexicana</i> L. colectadas en las poblaciones infectada (círculo naranja), asintomática (círculo azul) y sana (círculo verde).....	68
Figura 3.32. Alcaloides detectados en los tallos de <i>A. mexicana</i> L. colectados en las poblaciones infectada (círculo naranja), asintomática (círculo azul) y sana (círculo verde).....	69
Figura 3.33. Alcaloides detectados en las raíces de <i>A. mexicana</i> L. colectadas en las poblaciones infectada (círculo naranja), asintomática (círculo azul) y sana (círculo verde).....	69
Figura 4.1. Alcaloides encontrados en las plantas analizadas de <i>A. mexicana</i> L.	82
Figura 4.2. Contenido de alcaloides en raíces, tallos y hojas de plantas de <i>A. mexicana</i> L.....	83
Figura 4.3: Vista esquemática de las rutas biosintéticas de Be y Sa.	88
Figura 4.4. Modelo de resistencia sistémica en plantas.	89
Figura 4.5. Niveles de alcaloides encontrados en las hojas analizadas de <i>A. mexicana</i> L.	89
Figura. A.1. Aspecto de callos (A) y suspensiones celulares (B) de la línea AM1 de <i>A. mexicana</i> L.....	100
Figura A.2. Aspecto de la extracción de alcaloides a partir de los cultivos <i>in vitro</i> de la línea AMME <i>A. mexicana</i> L.	100
Figura A.3. Curvas de calibración para Sa (A), Que (B) y Be (C).	102
Figura A.4. Detección de Be (A) y Sa (B) durante la obtención de la línea de suspensiones celulares de AMME a partir de callos.	103
Figura A.5: Contenido de Sa en los callos en medio líquido de la línea AMME de <i>A. mexicana</i> L.. ..	104
Figura A.6: Contenido de Sa en hojas de <i>A. mexicana</i> L. colectadas en población infectada, asintomática y sana..	104
Figura A.7: Contenido de Sa en tallo basal de <i>A. mexicana</i> L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.	105

Figura A.8: Contenido de Sa en tallo medio de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. 105

Figura A.9: Contenido de Sa en tallo apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. 106

Figura A.10: Contenido de Sa en tallos de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. 106

Figura A.11: Contenido de Sa en raíz de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. 107

Figura A.12: Contenido de Sa en raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.. 107

Figura A.13: Contenido de Sa en raíces de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.. 108

Figura A.14: Contenido de Be en hojas de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.. 112

Figura A.15: Contenido de Be en tallo basal de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.. 113

Figura A.16: Contenido de Be en tallo medio de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. 113

Figura A.17: Contenido de Be en tallo apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.. 114

Figura A.18: Contenido de Be en tallo basal, medio y apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. 115

Figura A.19: Contenido de Be en raíz de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. 116

Figura A.20: Contenido de Be en raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.. 117

Figura A.21: Contenido de Be en raíz y raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.117

Figura A.22: Contenido de Que en hojas de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.121

Figura A.23: Contenido de Que en tallo basal de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.122

Figura A.24: Contenido de Que en tallo medio de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.122

Figura A.25: Contenido de Que en tallo apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana..123

Figura A.26: Contenido de Que en tallos (basal, medio y apical) de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.124

Figura A.27: Contenido de Que en raíz de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.125

Figura A.28: Contenido de Que en raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.126

Figura A.29: Contenido de Que en raíz y raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana..126

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Alcaloides representativos de algunas familias botánicas..... 6

Cuadro 1.2. Clasificación de los inductores de acuerdo con su naturaleza.24

Cuadro 1.3. Algunos inductores abióticos y bióticos utilizados para la producción de metabolitos secundarios (alcaloides) de plantas en cultivos vegetales.24

Cuadro 3.1. Crecimiento acumulado (g PF) en la línea AMME durante los tratamientos de inducción.....46

Cuadro 3.2. Productos separados en los tejidos provenientes de poblaciones de plantas infectadas (PI), asintomáticas (PA) y sanas (PS) de *A. mexicana* L.....66

Cuadro 3.3. Contenidos de Sa en diferentes órganos de plantas de *A. mexicana* L. colectadas en poblaciones infectadas, asintomáticas y sanas.70

Cuadro 3.4. Contenido de Be en diferentes órganos de plantas *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana.72

Cuadro 3.5: Contenido de Que en diferentes órganos de plantas de *A. mexicana* L. colectadas en poblaciones infectadas, asintomáticas y sanas74

Cuadro A.1. Parámetros de correlación lineal para los alcaloides analizados en este trabajo..101

Cuadro A.2. Contenido de Sa en callos en medio líquido de la línea AMME de *A. mexicana* L. Experimento de daño mecánico en la línea celular.103

Cuadro A.3. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Sa en hojas de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.....108

Cuadro A.4. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Sa en hojas entre cada población.....109

Cuadro A.5. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Sa en tallos de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.....109

Cuadro A.6. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Sa en tallos entre cada población.....	110
Cuadro A.7. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Sa en raíces de <i>A. mexicana</i> L. de las diferentes poblaciones.....	110
Cuadro A.8. Prueba de Kruskal-Wallis, niveles de Sa en raíces.	111
Cuadro A.9. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Sa en raíces entre cada población.....	111
Cuadro A.10. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Be en hojas de <i>A. mexicana</i> L. de las diferentes poblaciones.....	118
Cuadro A.11. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Be en hojas entre cada población.....	118
Cuadro A.12. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Be en tallos de <i>A. mexicana</i> L. de las diferentes poblaciones.....	119
Cuadro A.13. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Be en tallos entre cada población.....	119
Cuadro A.14. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Be en raíces de <i>A. mexicana</i> L. de las diferentes poblaciones.....	120
Cuadro A.15. Prueba de Kruskal-Wallis. Niveles de Be en raíces por población.....	120
Cuadro A.16. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Be en raíces entre cada población.....	121
Cuadro A.17. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Que en hojas de <i>A. mexicana</i> L. de las diferentes poblaciones.....	127
Cuadro A.18. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Que en hojas entre cada población.....	127
Cuadro A.19. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Que en tallos de <i>A. mexicana</i> L. de las diferentes poblaciones.....	128

Cuadro A.20. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Que en tallos entre cada población.....128

Cuadro A.21. Prueba de Kruskal-Wallis. Niveles de Que en raíces por población.129

Cuadro A.22. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Que en raíces de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.....129

Cuadro A.23. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Que en hojas entre cada población.....130

LISTADO DE ABREVIATURAS

MeJA:	Jasmonato de metilo
EL:	Extracto de levadura
Fo:	<i>Fusarium oxysporum</i>
AS:	Ácido salicílico
AAS:	Ácido acetilsalicílico
Be:	Berberina
Sa:	Sanguinarina
Que:	Quelitrina
mg/g PS:	Miligramos por gramo de peso seco
mg/g PF:	Miligramos por gramo de peso fresco
<i>A. mexicana</i> :	<i>Argemone mexicana</i>
ABI's:	Alcaloides bencilisoquinolínicos
cm:	Centímetros
m:	Metro
mm:	Milímetro
VIH:	Virus de la inmunodeficiencia humana
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos
ETI:	Inmunidad activada por efectores
HMCs:	Células madre haustoriales
PR:	Proteínas relacionadas con la patogénesis
UV:	Radiación ultravioleta
Ag+:	Plata
JA:	Ácido jasmónico
KCl:	Cloruro de potasio
NADPH:	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
PL:	Fosfolipasa
TF:	Factores de transcripción
μM:	Micromolar
cm ² :	Centímetro cuadrado
Hrs:	Horas

mg/L:	Miligramos por litro
OCDA:	Vía del octadecanoico
DIECA:	Ácido dietilditiocarbámico
CCF:	Cromatografía en capa fina
MS:	Murashige y Skoog
BAP:	6-bencilaminopurina
ANA:	Ácido 1-naftalenacético
g/L:	Gramos por litro
W:	Vatio o Watts
°C:	Grados centígrados
rpm:	Revoluciones por minuto
mL:	Mililitro
nm:	Nanómetro
Rf:	Factor de retardo
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
LDD:	Límite de detección
LDC:	Límite de cuantificación
RSA:	Respuesta sistémica adquirida
RSI:	Respuesta sistémica inducida
ET:	Etileno
GSH:	Formas de azufre orgánico en la fracción soluble de las plantas
GSL:	Glucósidos vegetales que contienen nitrógeno y azufre

RESUMEN

Argemone mexicana L. (Papaveraceae), es una planta productora de alcaloides bencilisoquinolínicos sanguinarina y berberina que corresponden a los tipos benzofenantridina y protoberberina, respectivamente. Cultivos *in vitro* de esta planta responden a la adición de inductores del metabolismo secundario desencadenando vías de señalización que resultan en un aumento de la síntesis de los alcaloides de un grupo, interfiriendo en la producción de otros. El objetivo de este trabajo fue comparar los cambios inducidos en la acumulación de alcaloides en *A. mexicana* como parte de una respuesta de defensa. Se propuso el uso de dos modelos de estudio; cultivos *in vitro* en condiciones de inducción y plantas con síntomas de infección fúngica identificadas en campo. Los cultivos *in vitro* fueron expuestos a jasmonato de metilo y extracto de levadura siguiendo esquemas de aplicación individual de cada agente en dos dosis, así como en combinaciones simultáneas de jasmonato de metilo antecediendo a extracto de levadura por 24 hrs. Los perfiles cromatográficos por capa fina no mostraron variaciones notorias, aunque en la inducción secuencial y simultánea se incrementó la acumulación de sanguinarina, sugiriendo el efecto sinérgico de los agentes. No se observó la acumulación de berberina en ninguna condición. Por otro lado, se analizaron los contenidos de estos alcaloides en hojas, tallos y raíces de plantas infectadas y se compararon con los de plantas asintomáticas, tomadas de la misma población infectada, y plantas sanas de una población distante. Se lograron detectar 15 compuestos alcaloidales por TLC, entre ellos berberina, sanguinarina y queleritrina que se identificaron por comparación con estándares. Notablemente, la infección por hongos ocasionó la acumulación de sanguinarina en hojas (0.2026 mg/g PS), en las que normalmente no se presenta este alcaloide. La infección también ocasionó una disminución en la acumulación de berberina en comparación con las plantas sanas (0.1559 vs 0.6260 mg/g PS, respectivamente). Si bien se observaron cambios en los contenidos de alcaloides en tallos y raíces infectadas, estos no fueron tan marcados como en las hojas. Estos resultados sugieren una función protectora de la sanguinarina durante la infección por hongos.

ABSTRACT

Argemone mexicana L. (Papaveraceae), produces benzyloquinoline alkaloids from the benzophenanthridine and protoberberine groups, including sanguinarine and berberine, respectively. *In vitro* cultures respond to the addition of elicitors of secondary metabolism modifying the patterns of alkaloid accumulation which results in both increase of some species and decreasing of others. Hence, the main objective of this project was to compare changes in alkaloid accumulation as part of defensive response in this plant. Two experimental models were employed; *in vitro* cultures exposed to elicitors of secondary metabolism and plants displaying symptoms of fungal infection, collected from fields. *In vitro* cultures were exposed to methyl jasmonate and yeast extracts following different schemes; either individually in two different doses, simultaneously combined or with methyl jasmonate preceding yeast extracts for 24 hrs. TLC profiles did not show important variations although sanguinarine accumulation was increased after the sequential and simultaneous exposure to elicitors, suggesting a synergetic effect. Berberine accumulation was not detected under any treatment. In addition, alkaloid accumulation was analyzed in leaves, stems and roots of infected plants and compared to asymptomatic individuals, taken from the same fungi infested population, and healthy plants, from a different population. Up to 15 alkaloidal compounds were detected by TLC with berberine, sanguinarine and chelerytrine identified among them by comparison to standards. Noteworthy, fungal infection resulted in sanguinarine accumulation in leaves (0.2026 mg/g DW), which usually do not present this alkaloid. Infection also resulted in berberine decreasing in leaves, in comparison to those from healthy plants (0.1559 vs 0.6260 mg/g DW, respectively). Although alkaloid profiles also were modified in stems and roots, these were not as prominent as in leaves. These results suggest a protective function of sanguinarine during fungal infection.

INTRODUCCIÓN

Las plantas están expuestas a diferentes riesgos por las condiciones del medio ambiente que las rodea. Estos factores de riesgo se agrupan en dos grandes categorías. Aquellos que se deben a condiciones fisicoquímicas del ambiente como temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes o iluminación; y aquellas ocasionados por otros organismos vivos como microorganismos y herbívoros. En ambos casos, la respuesta defensiva de las plantas puede incluir la producción de metabolitos secundarios (Canchignia-Martínez *et al.*, 2015). Las plantas sintetizan una amplia gama de metabolitos secundarios, algunos de estos productos se producen en respuesta al estrés ambiental, como el ataque de insectos, herbívoros y patógenos, las heridas y la radiación ultravioleta, por lo que actúan como un mecanismo de defensa. Estos metabolitos secundarios son ampliamente utilizados en la industria, sin embargo, las plantas los sintetizan en muy bajas concentraciones, por lo que el cultivo de células vegetales ha surgido como una alternativa para la obtención de metabolitos de interés, una de las ventajas es que es posible controlar las condiciones de cultivo, alcanzando un mayor rendimiento (De Matos *et al.*, 2014; Arias *et al.*, 2009; Facchini, P. 2001).

En este trabajo, se pretende analizar los cambios inducidos en la acumulación de alcaloides en respuesta al estrés biótico en *A. mexicana* (Papaveraceae), una planta que produce alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's); principalmente berberina (Be) y sanguinarina (Sa). Para lograr este objetivo, se utilizarán dos modelos de estudio: por un lado cultivos *in vitro* serán expuestos a inductores del metabolismo secundario como son el jasmonato de metilo (MeJA) y extracto de levadura (EL). Como segundo modelo se analizarán plantas de campo afectadas por una infección fúngica. Dado que tanto Be como Sa tienen propiedades antimicrobianas, se espera que durante el proceso de infección/inducción ocurran cambios en la acumulación de dichos alcaloides y que estos cambios se relacionen con la distribución tisular que ambos alcaloides presentan (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). La exposición a estos inductores desencadena vías de señalización en respuesta a estímulos ambientales que inciden en la síntesis de alcaloides (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012). Por ello, en este estudio se plantea comparar la respuesta de cultivos *in vitro* a diferentes condiciones de inducción que incluyen la aplicación de EL y MeJA en tres esquemas diferentes; cada uno de manera individual; en una combinación simultánea y en otra secuencial en la que primero serán expuestos a MeJA y después de un periodo de tiempo a EL. Por otro lado, debido a la falta de estudios acerca de la interacción planta-patógeno en *A. mexicana*, se propone utilizar plantas silvestres de *A. mexicana*

provenientes de poblaciones infectadas, asintomáticas y sanas para analizar de qué manera el proceso de infección influye en la distribución tisular de los alcaloides presentes.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

Las plantas tienen la capacidad para sintetizar diferentes moléculas orgánicas también conocidas como metabolitos secundarios. Las plantas son la fuente principal de muchos metabolitos secundarios, no son fundamentales para la supervivencia de la célula/organismo, pero son muy importantes en la interacción de la célula (organismo) con su entorno. Confieren ventajas adaptativas contra condiciones adversas tanto bióticas (bacterias, hongos, nematodos, insectos o pastoreo de animales) como abióticas (temperatura y humedad, sombra, lesiones o presencia de metales pesados). Por ejemplo, los carotenoides y flavonoides también están involucrados en la pigmentación celular en flores y semillas, atraen polinizadores y dispersores de semillas. Por lo tanto, están involucrados en la reproducción de la planta (Pagare *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios o especializados son productos de bajo peso molecular que presentan una distribución taxonómica limitada, a menudo difieren entre individuos de la misma población de plantas con respecto a su cantidad y tipos. Normalmente los sitios de biosíntesis están compartimentados a nivel celular o subcelular. Sin embargo, éstos pueden transportarse a largas distancias y acumularse desde los sitios de síntesis (Pagare *et al.*, 2015; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Estos metabolitos bioactivos son importantes en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos; se ha reportado que más del 40% de los medicamentos actualmente en el mercado son productos naturales o están inspirados en sus estructuras químicas (Newman y Cragg, 2020). Además de ser utilizadas como drogas vegetales, tienen una gran importancia económica ya que también son utilizados para la obtención de saborizantes, fragancias, insecticidas y colorantes (Pagare *et al.*, 2015). Si bien no son exclusivos de las plantas, éstas producen una enorme diversidad de metabolitos secundarios que se agrupan en diferentes clases como terpenos, fenoles, policétidos y alcaloides (Kabera *et al.*, 2014; Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

Entre algunas de las funciones que tienen estos metabolitos secundarios, tenemos a los terpenos que están involucrados en la defensa como toxinas y disuasivos de la alimentación para un grupo amplio de insectos y mamíferos (herbívoros); los fenoles son importantes en el sistema de defensa de las plantas contra plagas y enfermedades, incluidos los nematodos parásitos de las raíces, también por ejemplo, la síntesis de flavonoides (fenol) es una estrategia eficaz contra las

especies reactivas de oxígeno (ROS); entre los metabolitos secundarios que contienen azufre encontramos a las formas de azufre orgánico en la fracción soluble de las plantas (GSH), a los glucósidos vegetales que contienen nitrógeno y azufre (GSL), fitoalexinas, tioninas, defensinas y la alinina que están relacionadas directa o indirectamente en la defensa de las plantas contra patógenos microbianos. El GSH interviene en la regulación del crecimiento y desarrollo y como antioxidante celular. Los GSL son producidos por las plantas superiores para aumentar la resistencia contra los depredadores, competidores y parásitos, sus productos de descomposición incluyen sustancias volátiles defensivas que exhiben efectos tóxicos o repelentes. Y finalmente tenemos al grupo de metabolitos secundarios que contienen nitrógeno: incluyen alcaloides, glucósidos cianogénicos y aminoácidos no proteicos (Pagare *et al.*, 2015; Leustek, T., 2002).

1.1. LOS ALCALOIDES EN LAS PLANTAS MEDICINALES.

El término alcaloide, propuesto por Meissner en 1819, se debe a las propiedades alcalinas de estos compuestos. Los alcaloides son productos nitrogenados, de naturaleza alcalina y con actividad tóxica contra organismos diferentes a los que los producen. Se acepta que cumplen funciones de defensa química en las plantas que los acumulan. Además, muchas plantas medicinales deben sus propiedades, precisamente a la presencia de alcaloides en sus tejidos. Los alcaloides se encuentran en aproximadamente el 20% de las especies de plantas vasculares, con mayor frecuencia en las dicotiledóneas herbáceas mientras que son poco comunes en las monocotiledóneas y gimnospermas (Bribi, 2018; Pagare *et al.*, 2015; O'Connor, 2010).

Las plantas medicinales son un gran reservorio de metabolitos secundarios con actividad farmacológica y han sido empleadas desde la antigüedad para el tratamiento de diversos padecimientos. Los metabolitos secundarios son sintetizados por la planta en pequeñas cantidades y su formación depende en gran medida de la interacción de la planta con su entorno. La diversidad de las vías biosintéticas que existen en las plantas ha proporcionado una variedad de productos bioactivos de gran importancia para el desarrollo de nuevos fármacos en las industrias farmacéutica y química. Los estudios acerca de la composición de las plantas comenzaron en el siglo XIX, cuando Friedrich Wilhelm Serturmer, aisló la morfina en 1806 un producto puro que exhibía las mismas propiedades farmacológicas inductoras del sueño que el opio, el extracto crudo de la amapola (*Papaver somniferum* L). Con el aislamiento de este alcaloide se marcó el inicio de una nueva etapa para la investigación fitoquímica; posteriormente se aislaron otros alcaloides como la narcotina, la estricnina, la quinina y la cafeína de diferentes plantas (Newman y Cragg, 2020; Bribi, 2018; Petrovska, 2012; O'Connor, 2010). El Cuadro 1.1

enlista algunas plantas productoras de alcaloides con usos medicinales y la Figura 1.1 muestra algunas de las estructuras químicas de los alcaloides mencionados en el Cuadro 1.1.

Aun cuando las plantas fueron las primeras fuentes de alcaloides, los hongos, las bacterias, los insectos y los animales también producen una amplia gama de estos metabolitos secundarios (O'Connor, 2010). En su mayoría, los alcaloides son productos cristalinos bien definidos que reaccionan con ácidos para formar sales; en las plantas se encuentran en estado libre, como sales o como N-óxidos y, además de la presencia de nitrógeno, incluyen carbono, hidrógeno y oxígeno, aunque este último elemento no está presente en algunos alcaloides como la coniina de *Conium maculatum* y la nicotina de *Nicotiana tabacum*. Algunos alcaloides pueden ser líquidos, como la nicotina, y también coloreados, como la Be (amarilla) y las sales de Sa (rojo cobrizo). La clasificación de los alcaloides, de acuerdo con su estructura principal, se divide en alcaloides tipo pirrolidina, piridina, quinolina, isoquinolina, indol, quinazolina, esteroideos, y diterpenoides, entre otros. Cada grupo se puede subdividir, a su vez, en varios subgrupos (Bribi, 2018).

Los alcaloides juegan un papel ecológico importante. Generalmente son sintetizados como un mecanismo de defensa de las plantas, y por ello exhiben un potencial tóxico. Su consumo en altas concentraciones puede causar la muerte en algunos casos. El amplio espectro de actividad farmacológica que despliegan está muy bien representado por los alcaloides isoquinolínicos, entre los que destacan morfina y codeína, dos opiáceos analgésicos muy utilizados en la medicina, así como la Be, un antibiótico (O'Connor, 2010; Bribi, 2018).

Los alcaloides que se encuentran en las plantas superiores se distribuyen en algunas familias botánicas como Apocynaceae, Annonaceae, Amaryllidaceae, Berberidaceae, Boraginaceae, Gnetaceae, Liliaceae, Leguminosae, Lauraceae, Loganiaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Ranunculaceae y Solanaceae, entre otras. En el cuadro 1.1 se muestran algunos ejemplos de alcaloides aislados en diferentes especies (Talapra y Talapra, 2015).

Cuadro 1.1 Alcaloides representativos de algunas familias botánicas (Talpra y Talpra, 2015).

Familia	Especie	Alcaloides
Apocynaceae.	<i>Vinca rosea.</i> <i>Rauwolfia serpentina.</i>	Vincristina, vinblastina reserpina, serpentina, sarpagina.
Amaryllidaceae.	<i>Amaryllis belladona.</i>	Licorina.
Annonaceae.	<i>Annona reticulata.</i> <i>Annona squamosa.</i>	Reticulina, anonaina.
Berberidaceae.	<i>Berberis asiática.</i>	Be.
Boraginaceae.	<i>Echium plantagineum.</i>	Equimidina.
Ephedraceae.	<i>Ephedra sinica.</i>	Efedrina, pseudoefedrina.
Liliaceae.	<i>Colchicum agrippinum.</i>	Colchicina.
Loganiaceae.	<i>Strychnos nux-vomica.</i>	Estricnina.
Magnoliaceae.	<i>Michelia lanuginosa.</i>	Lanuginosina.
Menispermaceae.	<i>Cocculus laurifolius.</i>	Cocclaurina, laurifolina, trilobina.
Papaveraceae.	<i>Papaver somniferum.</i>	Morfina, papaverina.
Piperaceae.	<i>Piper nigrum.</i>	Piperina.
Ranunculaceae.	<i>Thalictrum foliolosum.</i>	Talictrina.
Rubiaceae.	<i>Cinchona officinalis.</i>	Quinina, quinidina, cinconidina, cinconina.
Solanaceae.	<i>Atropa belladona, Nicotiana tabacum.</i>	Atropina, nicotina.
Umbelliferae.	<i>Conium maculatum.</i>	Conina, conhidrina.

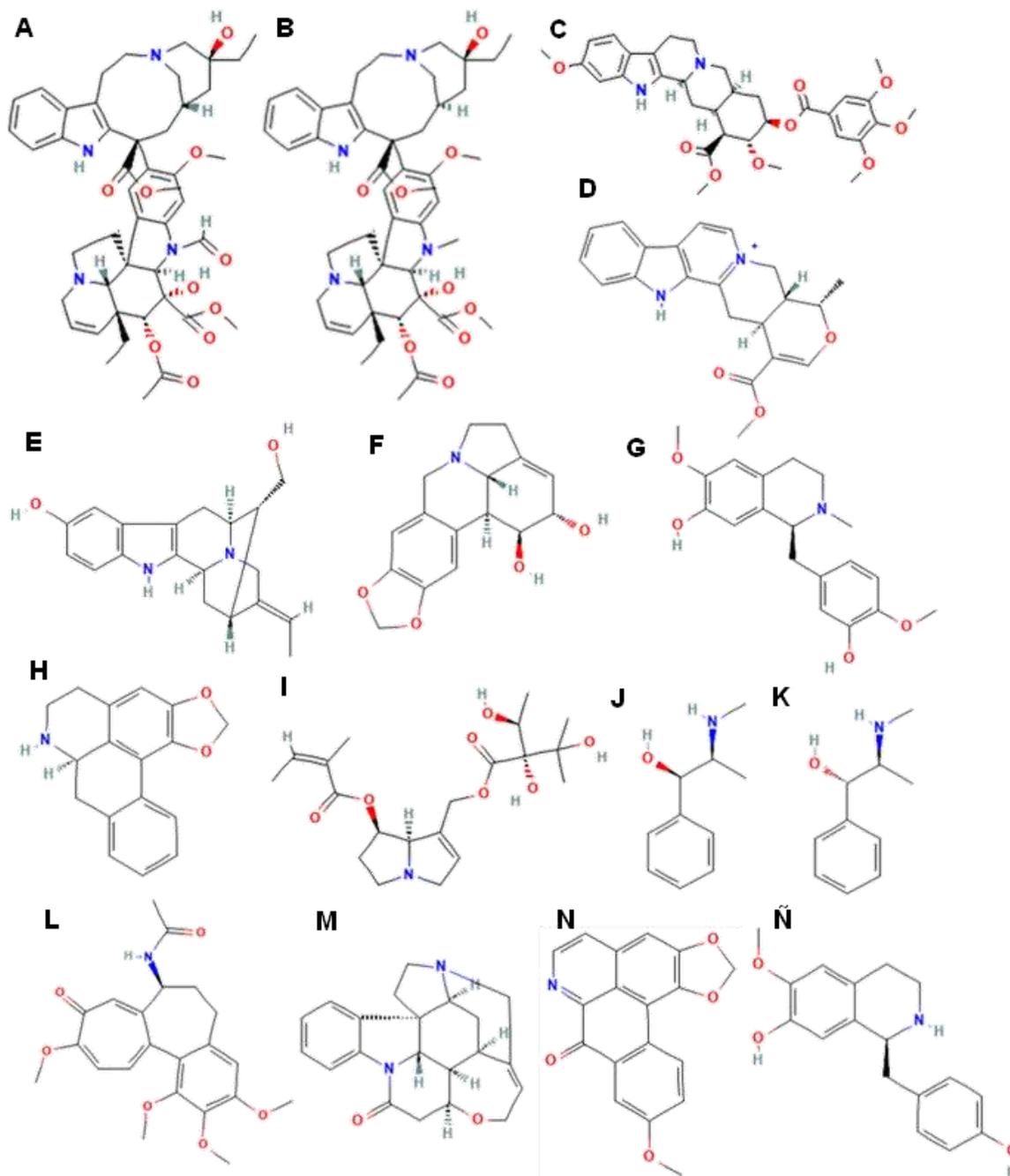


Figura 1.1. Algunos alcaloides mencionados en el Cuadro 1.1. A: vincristina, B: vinblastina, C: reserpina, D: serpentina, E: sarpagina, F: sicorina, G: reticulina, H: anonaina, I: equimidina, J: efedrina, K: pseudofedrina, L: colchicina, M: estricina, N: lanuginosina, Ñ: coclaurina.

1.2. ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS.

Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI's), como los analgésicos morfina y codeína, y los agentes antibacterianos Be, palmatina y magnoflorina, se sintetizan a partir de tirosina en las

ABI's en los diferentes tejidos de estas plantas es fundamental, ya que éstos le confieren sus propiedades medicinales, aunque cabe destacar que la naturaleza tóxica de *Argemone* spp. se debe precisamente a la presencia de estos alcaloides. Por ello, es necesario tomar en cuenta la parte de la planta a utilizar en las preparaciones medicinales, la vía de administración y las dosis recomendadas, para evitar efectos tóxicos en el tratamiento (Escobar-Chan, 2018; Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013).

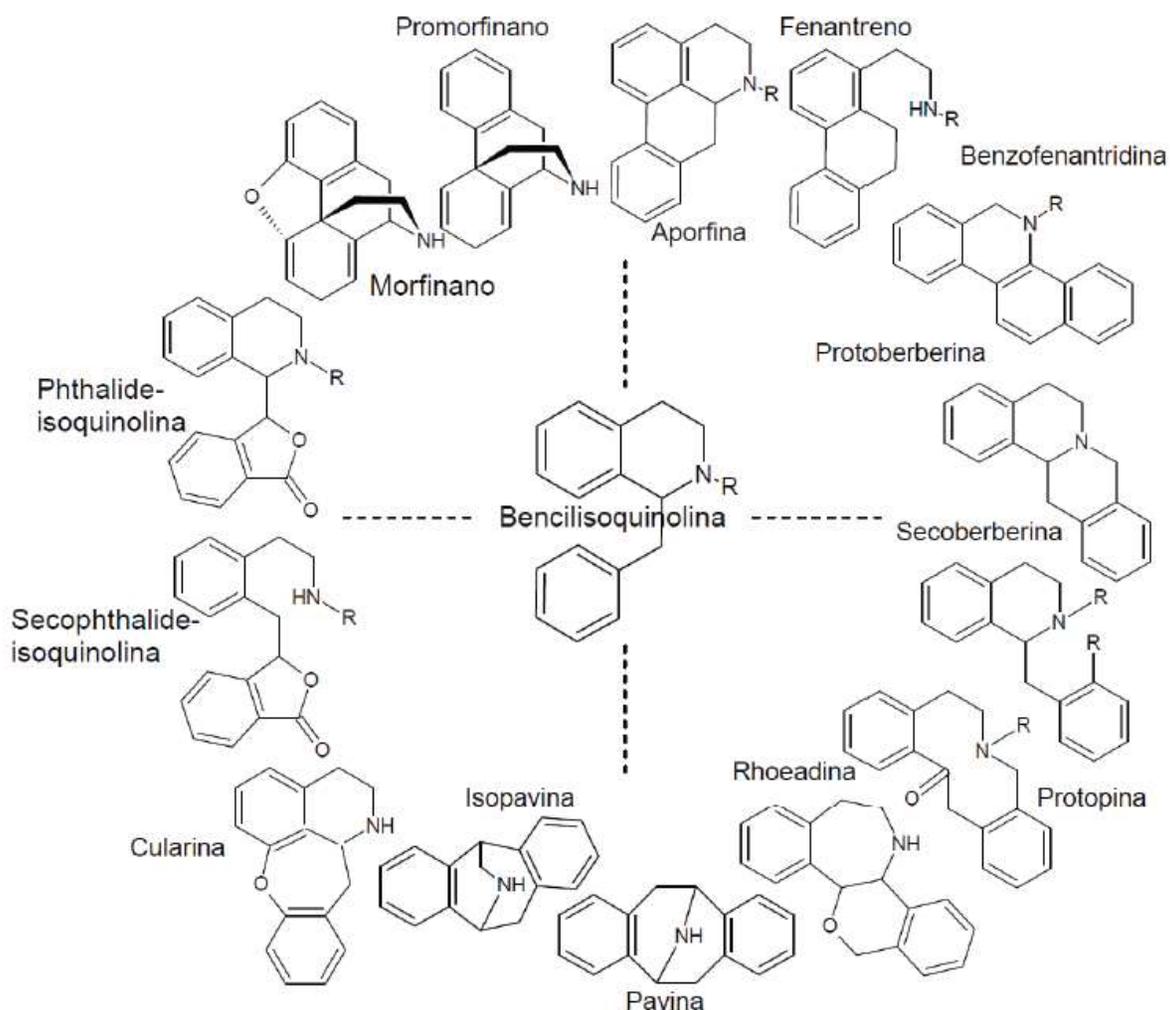


Figura 1.3. Diversidad estructural de alcaloides bencilisoquinolínicos (Tomado de: De la Cruz *et al.*, 2012).

1.3.1. *Argemone mexicana* L.

El género *Argemone* está constituido por 24 especies, entre las que se encuentra *A. mexicana* conocida comúnmente como amapola mexicana, amapola espinosa mexicana, cardo o cardo

santo, chicalote o ghamoya. Se distribuye en países tropicales y subtropicales, encontrándose en la región sureste de Estados Unidos y el norte de México, Sudamérica, las islas del Caribe, Australia, España, India y países de Asia sudoriental (Virsen *et al.*, 2019; Brahmachari *et al.*, 2013; Escobar-Chan, 2018). Es una planta anual, erecta y espinosa de aproximadamente 1 m de altura (Figura 1.4). Las hojas son generalmente de 5 a 11 cm de largo, las venas gris-blanquecinas se destacan en la superficie superior de la hoja que es verde azulada, ancha y glauca en la base, medio abrochando el tallo, prominentemente lobuladas, sinuosas y espinosas. Hojas y tallos exudan un látex amarillo brillante cuando la planta está lesionada. Las flores son grandes, completas, hipóginas, pediculadas, actinimórficas y hermafroditas. Son terminales, amarillas y sin olor. La corola es de color amarillo de 4 a 6 pétalos, los estambres son poliandrosos, imprecisa con anteras completas, introsas y amarillas, mide aproximadamente 6 cm de diámetro. El fruto es una cápsula espinosa, obovada o elíptica-oblonga; de unos 3 cm de longitud; las semillas son esféricas, brillantes, negro parduzco y sin hueso, muy abundantes, protegidas en una fina red de venas y de aproximadamente 1 mm de diámetro. La planta no tiene restricciones ambientales, debido a que puede crecer en suelos pobres en nitrógeno y presenta una alta tolerancia a la sequía y a la salinidad (Virsen *et al.*, 2019; Brahmachari *et al.*, 2013; Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013).

1.3.2. Composición fitoquímica de *A. mexicana* L.

A. mexicana produce una amplia gama de ABI's, que se derivan de la tirosina. Estos productos pueden ser altamente tóxicos, afectando el sistema nervioso central. No obstante, a su vez pueden mostrar valiosas propiedades médicas (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). *A. mexicana* destaca entre las demás especies por su capacidad de producir Sa y Be simultáneamente. Estos alcaloides se distribuyen tanto en las partes aéreas como en las subterráneas de la planta. En contraste, en especies del género *Argemone* que no producen Be, podemos encontrar otro tipo de alcaloides como la protoberberina, la coptisina, la cheilantifolina y la columbamina (Escobar-Chan, 2018).

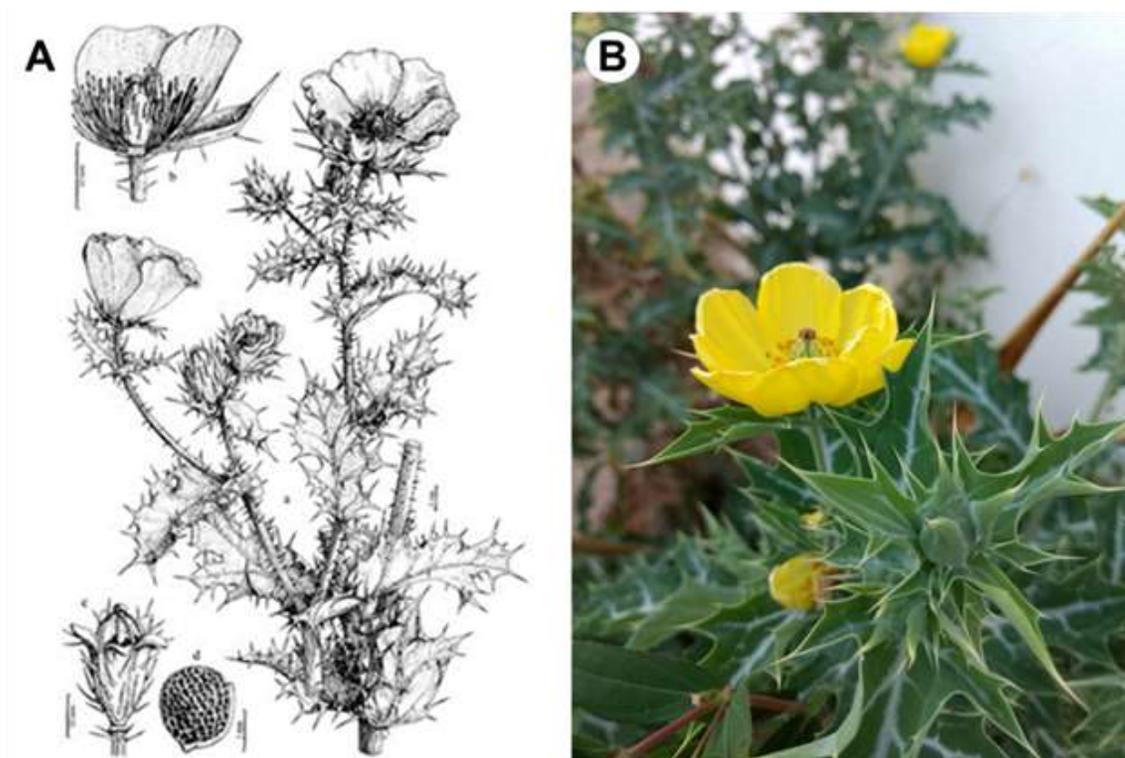


Figura 1.4. Litografía (A) y fotografía (B) de una planta de *A. mexicana* L. La litografía fue tomada de Castroviejo, 1986.

A continuación, se presentan algunos de los diversos metabolitos secundarios que se han reportado en diferentes órganos de la planta. En la planta entera se ha reportado la presencia de Be, Sa, Que, protopina, pancorina, argenaxina, angolina, arnottianamida, queliantifolina, allocryptopina, coptisina, jatrorrhizina, columbamina, oxiberberina, N-desmetiloxisanguinarina (Figura 1.5). Además, también se ha reportado que el látex contiene Be y que en el aceite de la semilla se encuentran los ácidos mirístico, palmítico, oleico y linoleico, así como el hidróxido de 2-dihidropalmitina, la Be, la protopina, y los ácidos ferúlico, tánico, cafeico, benzoico y cinámico (Figura 1.6). Los metabolitos secundarios presentes en las hojas incluyen protomexicina, mexitina, 8-metoxidihidrosanguinarina, 13-oxoprotopina, rutina, quercetina y eriodictiol (Figura 1.7 Singh *et al.*, 2012). También se ha reportado la presencia de alcaloides como Be, Que, Sa, protopina, coptisina, palmatina, magnoflorina y galantamina en raíces de *A. mexicana* (Figura 1.8) (Devanathan, K. 2020; Virsen *et al.*, 2019).

1.3.3. Usos etnofarmacológicos de *A. mexicana* L.

Esta planta es ampliamente utilizada en la medicina tradicional de diferentes partes del mundo para el tratamiento de diversos padecimientos. Por ejemplo, las semillas se usan como antídoto contra el veneno de serpientes, el aceite de las semillas se emplea como remedio para la

disentería, las úlceras, el asma y otras afecciones intestinales. En la India, el humo de las semillas se usa para aliviar el dolor de muelas y el extracto de las semillas frescas se emplea para el tratamiento de verrugas, llagas de herpes, infecciones de la piel, picazón y en el tratamiento de la hidropesía y la ictericia. Una mezcla del extracto de hojas y semillas se aplica para mantener la circulación sanguínea y el nivel de colesterol normal en el cuerpo. Las flores son expectorantes y se han utilizado en el tratamiento de la tos. El látex se usa para tratar problemas oculares que incluyen dolor, picazón y/ o contra la conjuntivitis y las cataratas. Los frutos molidos aplicados en emplastos en las orejas se usan para aliviar la sordera. La raíz se usa como cataplasma para aliviar el dolor de pulmón. En la medicina ayurvédica y unani *A. mexicana* se usa para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades que incluyen la malaria. No hay reportes acerca de los efectos psicoactivos de esta planta, pero las hojas se fuman en lugar de la marihuana y se usan para hacer un té o un cigarrillo. El látex es comercializado para combinarlo con diferentes hierbas, como por ejemplo, el tabaco que al ser fumado con éste adquiere un mayor efecto relajante (Virsen *et al.*, 2019; Brahmachari *et al.*, 2013).

1.3.4. Aplicaciones farmacológicas de *A. mexicana* L.

Se tienen reportes sobre las diversas actividades farmacológicas probadas de diversas partes de la planta, incluyendo efectos antimicrobianos, antidiabéticos, antioxidantes, antipalúdicos, hepatoprotectores, antihelmínticos, antiplasmodiales, anticancerígenos o citotóxicos, diuréticos y laxantes, antiestáticos, contra el VIH, molusquicidas, afrodisiacos, pesticidas y neurofarmacológicos (Virsen *et al.*, 2019; Brahmachari *et al.*, 2013; Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). También existen reportes que describen las aplicaciones etnofarmacológicas de la planta que han sido confirmadas validando su aplicación en la medicina tradicional, lo que convierte a *A. mexicana* en una gran fuente de producción y extracción de metabolitos de interés farmacológico.

1.3.5. Patógenos que afectan a *A. mexicana* L.

Aunque *A. mexicana* es conocida por la producción de alcaloides con propiedades antimicrobianas e insecticidas (Escobar-Chan, 2018; Hagel y Fachini, 2013; Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013), la planta presenta susceptibilidad a patógenos que pueden afectar su desarrollo. Los estudios que documentan especies patógenas en *A. mexicana* son muy escasos por lo que lo convierte en un área para explorar ya que la interacción planta patógeno es muy compleja.

Se ha reportado que el tizón bacteriano de la amapola, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *papavericola*, también afecta a *A. mexicana* y que esta planta es un hospedante de *Aspergillus niger*, que ocasiona la pudrición del collar; asimismo, la planta es susceptible al nematodo reniforme *Rotylenchulus reniformis*, que ataca las raíces y al gusano de la yema del tabaco *Helicoverpa assulta*, que ataca el tallo (Holm *et al.*, 1977). Es interesante notar que de las hojas de *A. mexicana* se han aislado 42 especies de hongos, siendo los más frecuentes *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Ulocladium atrum*, *U. botrytis*, *Phoma humicola*, *Aspergillus niger* y *Curvularia ellisii* (Abdel-Hafez, 1985).

1. 4. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO.

Los fitopatógenos incluyen hongos, bacterias, oomicetos, virus, viroides y nemátodos. Dado que cada uno despliega su propia estrategia de invasión, alimentación y reproducción en las plantas, existe una gran diversidad en estos procesos. Por ejemplo, los hongos de la roya (*Hemileia vastatrix*) y el mildiú polvoroso (*Erysiphe cichoracearum*) atraviesan dos capas del sistema inmunológico de las plantas; la inmunidad o reconocimiento, activado por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y la inmunidad activada por efectores (ETI), es el reconocimiento de los efectores de los hongos patogénicos, principalmente a través de las proteínas de resistencia secretadas por las plantas (Polonio *et al.*, 2020; Berger *et al.*, 2007a; Swann *et al.*, 2001).

La capacidad de respuesta inmune que poseen las plantas les permite detectar moléculas presentes en la superficie de patógenos que son percibidas por receptores especializados en la superficie de la célula vegetal. No obstante, los patógenos también han desarrollado estrategias para sobrepasar el sistema inmunológico de la planta, mediante la liberación de proteínas efectoras, que se unen con las PAMP y evitan que el patógeno sea detectado por la planta (Sánchez-Vallet. *et al.*, 2013).

De acuerdo con su ciclo de vida, los hongos fitopatógenos se clasifican en tres tipos los biotróficos, hemibiotróficos y necrotróficos. Los biotróficos, como los oídios (*Erysiphe polygoni*) y royas, necesitan tejido vivo para su crecimiento y reproducción; los hemibiotróficos como *Colletotrichum* spp., se caracterizan por una fase biotrófica, más o menos extendida, antes de cambiar al crecimiento necrotrófico y matar a su hospedero. Finalmente, los patógenos necrotróficos como *Alternaria* spp., matan el tejido del huésped al comienzo de la infección y se alimentan del tejido muerto; (Berger *et al.*, 2007b; Voegelé y Mendgen., 2003).

Los patógenos fúngicos biotróficos son parásitos obligados. Poseen haustorio, una estructura compleja con un papel clave en el establecimiento de enfermedades, con el cual establecen una estrecha relación con el hospedero y el cual está implicado en procesos esenciales, como la absorción de nutrientes, valiéndose de las proteínas efectoras (Polonio *et al.*, 2020; Martínez-Cruz y Rueda, 2017). El haustorio se forma a partir del micelio intracelular y se genera a partir de células madre haustoriales (HMCs), que se adhieren a la superficie de la célula vegetal, aunque todavía se desconoce la señal por la cual se forman las HMCs; Heat y Perumalla (1988) sugieren que la primer HMC formada está programada para morir, a menos que reciba una señal de sobrevivencia en el momento en que logra penetrar los tejidos vegetales. Hasta el día de hoy se desconocen varios aspectos de la biología haustorial, como el proceso de establecimiento en la célula huésped, la composición precisa, las estrategias que sigue para evitar el reconocimiento del huésped, la manera de absorber nutrientes de células huésped y las funciones específicas de los efectores secretados en las células de la planta huésped. Además, cabe mencionar que el haustorio no es exclusivo de biótrofos, ya que también se presenta en los oomicetos, que son hemibiotróficos. Los hongos biotróficos también secretan cantidades limitadas de enzimas líticas que les permite degradar la pectina presente en la pared celular. En general causan poco daño a la planta hospedante y tienen un rango estrecho de hospederos; inducen la muerte celular hipersensible en interacciones incompatibles y están controlados por genes de resistencia específicos. Algunos ejemplos incluyen el moho de la hoja del tomate (*Passalora fulva*), las royas (*Hemileia vastatrix*), el mildiú polvoroso (*Erysiphe cichoracearum*). Estos hongos estimulan las vías de defensa dependientes de salicilatos (Polonio *et al.*, 2020; Martínez y Ramírez, 2016; Oliver e Ipcho, 2004).

Por otro lado, los patógenos fúngicos necrótrofos, tienen un amplio rango de hospedadores y secretan abundantes enzimas que degradan la pared celular, por lo que incluso pueden bloquear los vasos del xilema y ocasionar estrés hídrico. En algunos casos, generan la pudrición en la planta ya que estas enzimas líticas permiten la penetración del patógeno y su expansión dentro de los tejidos vegetales, usando la pared celular como fuente de carbono. Además, producen toxinas y activan genes de resistencia cuantitativa en la planta hospedera, mediante vías de defensa dependientes de jasmonato y etileno. Como ejemplos está la mancha del trigo causada por *Septoria nodorum*, Syn. y *Stagonospora nodorum* (Martínez y Ramírez, 2016; Oliver e Ipcho, 2004; Thomma *et al.*, 2001).

La infección por fitopatógenos genera cambios en el metabolismo primario y secundario de las plantas susceptibles, afectando su crecimiento y desarrollo dependientes de sus estrategias de

defensa. Las plantas poseen mecanismos de defensa preformados (fitoanticipinas) o inducibles (fitoalexinas) para la mayoría de los microorganismos. La activación de estos mecanismos de defensa inicia con el reconocimiento de los microorganismos para dar lugar a la activación de las respuestas de defensa.

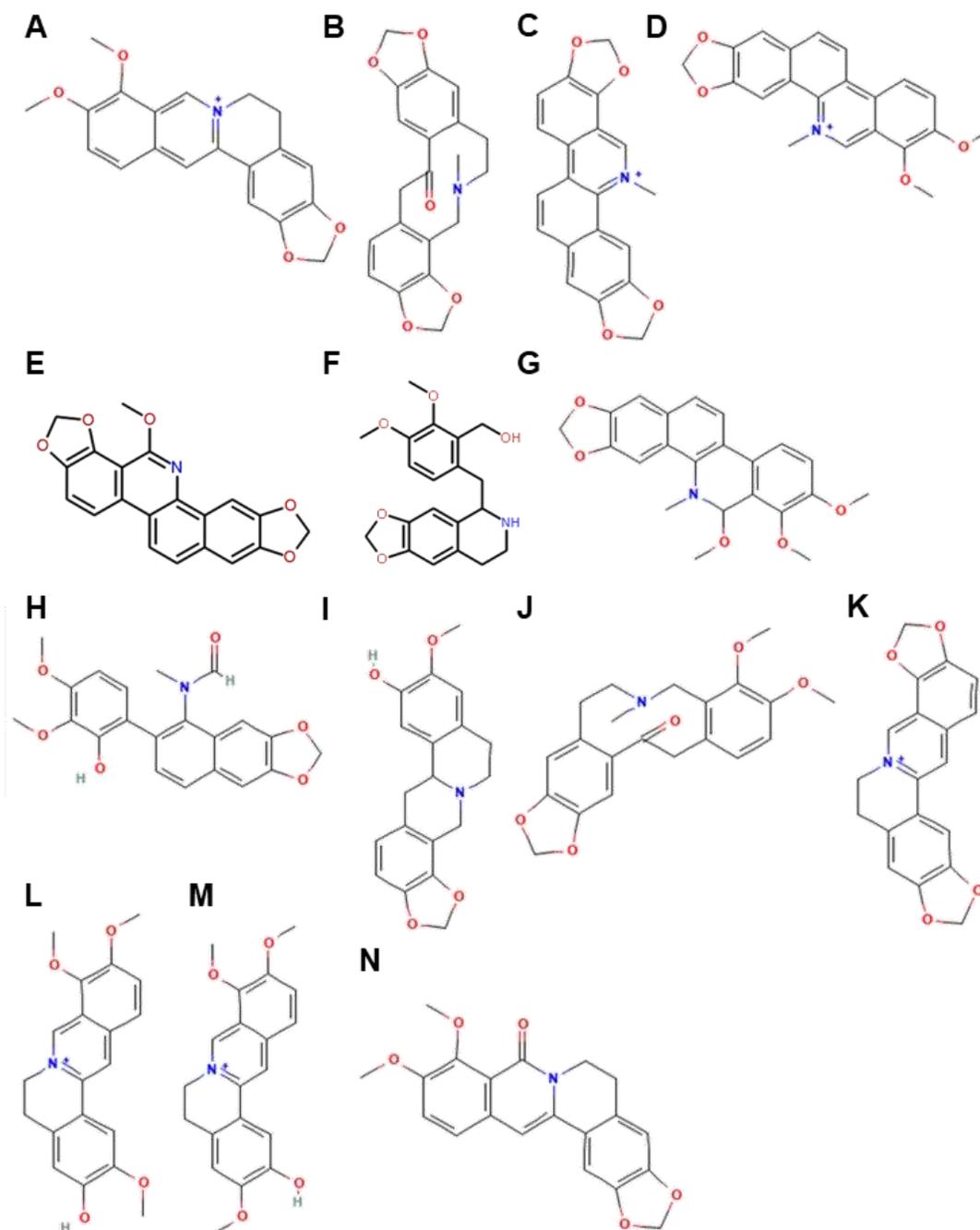


Figura 1.5. Alcaloides encontrados en la planta entera de *A. mexicana* L. A: Be, B: protopina, C: Sa, D: Que, E: pancorina, F: argenaxina, G: angolina, H: arnottianamida, I: queliantifolina, J: alocriptopina, K: coptisina, L: jatrorrizina, M: columbamina, N: oxiberberina.

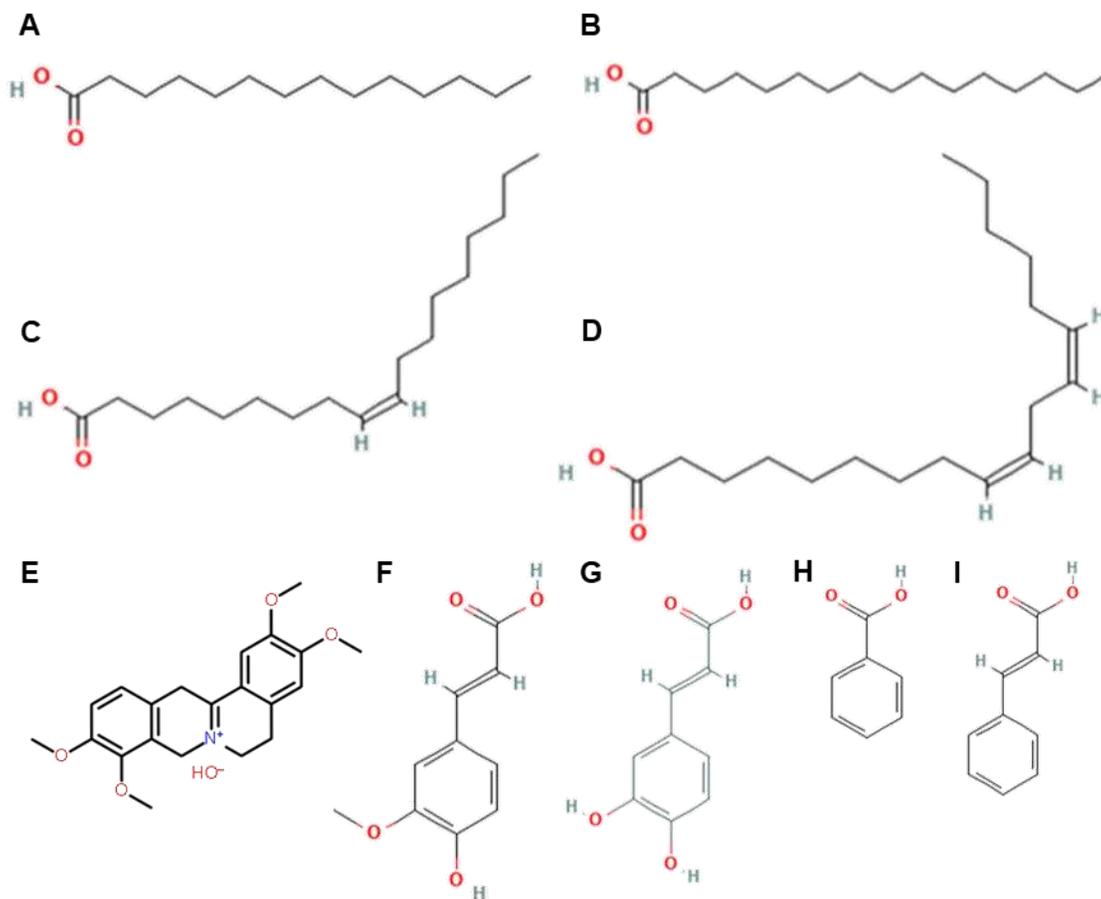


Figura 1.6. Metabolitos secundarios presentes en el látex y el aceite de la semilla de *A. mexicana* L. Ácidos grasos (A: ácido mirístico, B: ácido palmítico, C: ácido oleico, D: ácido linoleico) y fenoles (E: hidróxido de dihidropalmitina, F: ácido ferúlico, G: ácido cafeico, H: ácido benzoico, I: ácido cinámico).

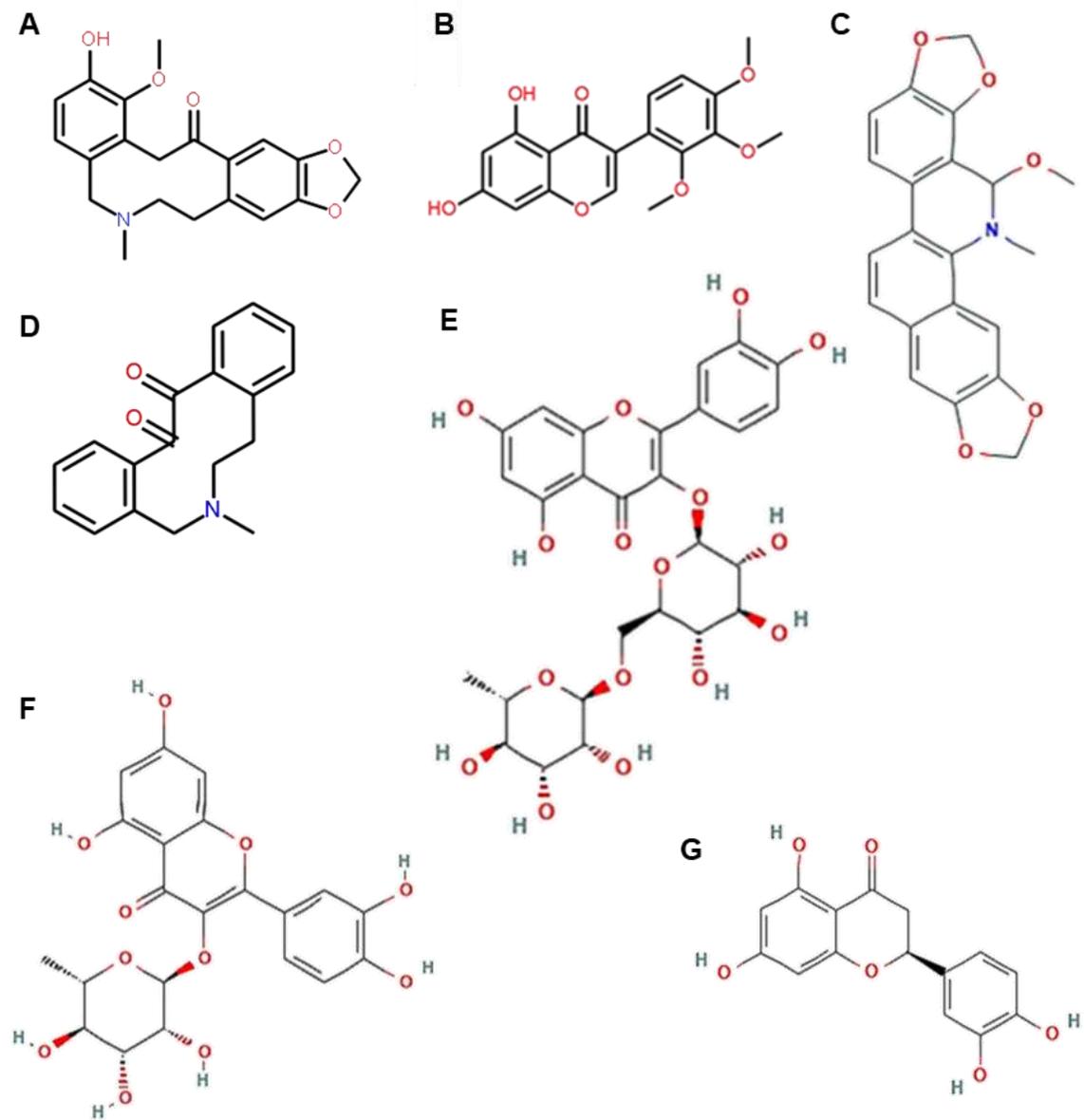


Figura 1.7. Metabolitos secundarios presentes en las hojas de *A. mexicana* L. A: protomexicina, B: mexitina, C: 8-metoxidihidrosanguinarina, D: 13-oxoprotopina, E: rutina, F: quercetrina, G: eriodictiol.

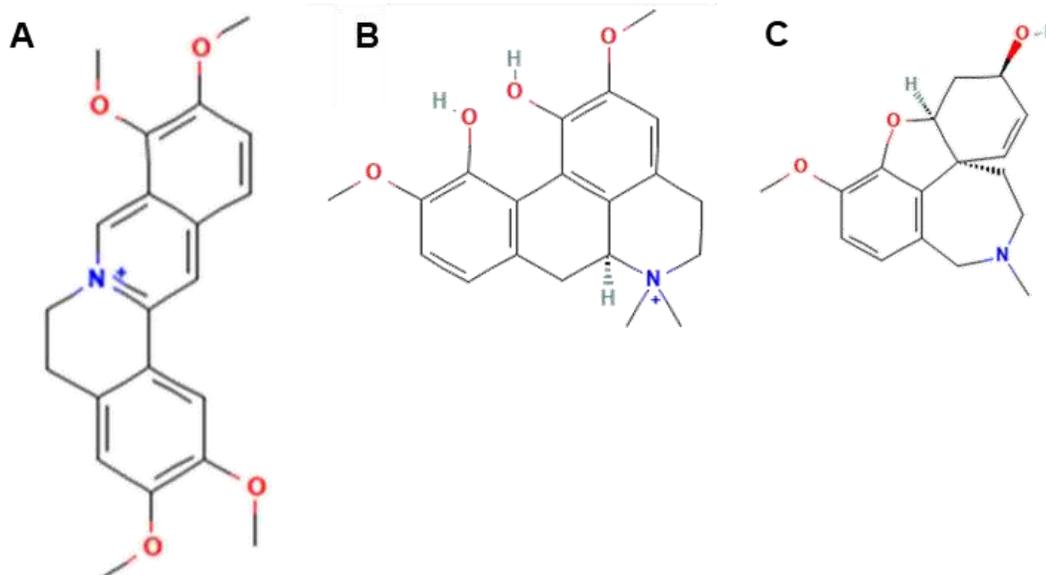


Figura 1.8. Algunos de los alcaloides presentes en las raíces de *A. mexicana* L. A: palmatina, B: magnoflorina, C: galantamina.

La resistencia basal en las plantas comienza con el reconocimiento de inductores que se derivan de los microorganismos. Además, se ha reportado que existen similitudes en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) en animales; posteriormente, al entrar en contacto con patógenos o con microorganismos no patógenos o inductores, se activan los flujos iónicos, la fosforilación/desfosforilación de proteínas y la producción de moléculas de señalización, como el ácido salicílico (AS), ácido jasmónico, etileno y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto influye en la regulación de la expresión génica y la inducción de respuestas de defensa, ya sea mediante el fortalecimiento de la pared celular o la acumulación de fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR). Se ha propuesto que algunos microorganismos se volvieron virulentos gracias a la producción de moléculas efectoras que reducen la respuesta de defensa. Cuando se dan estas interacciones compatibles, el patógeno virulento se disemina en la planta susceptible (Berger *et al.*, 2007a).

La resistencia específica se basa en el reconocimiento de estas moléculas efectoras por parte de proteínas receptoras vegetales. Este evento ocurre en interacciones incompatibles por lo que la planta es resistente y puede prevenir con éxito la propagación del patógeno. Esta defensa exitosa se basa en el reconocimiento temprano de las cepas virulentas de los patógenos vegetales y la activación rápida de las defensas. Además, en casos estrictamente necesarios se puede programar una muerte celular localizada que logra detener eficazmente la propagación de patógenos biotróficos (Berger, *et al.*, 2007a).

Los efectos ante el ataque de un patógeno generan una serie de cambios rápidos en el hospedero como la disminución de la fotosíntesis y un aumento en la respiración, fotorrespiración, así como en la actividad de la enzima invertasa. Aunque los detalles del funcionamiento de estos mecanismos, así como de las vías que median estos cambios rápidos no son del todo conocidos, se ha reportado que el ácido 12-oxo-fitodienoico (12-OPDA) (Figura 1.9) se acumula después de la infección por patógenos y produce una disminución de la fotosíntesis poco después de la aplicación. Por otro lado, las hexosas liberadas por la acción de una mayor actividad invertasa actúan como moléculas de señalización y reprimen los genes fotosintéticos. La regulación a la baja de los genes fotosintéticos, a su vez, disminuye la tasa neta de fotosíntesis (Figura 1.10). Aunque los datos de varias interacciones planta-patógeno, especialmente con patógenos fúngicos biotróficos virulentos, encajan en este modelo, hay algunos ejemplos que difieren en distintos puntos. Como se mencionó anteriormente, no siempre se ha observado la acumulación de hexosas y la represión de genes fotosintéticos lo que respalda la complejidad de las interacciones que se basan en la diversidad fundamental de la planta y del socio microbiano (Berger *et al.*, 2007 **a** y **b**).

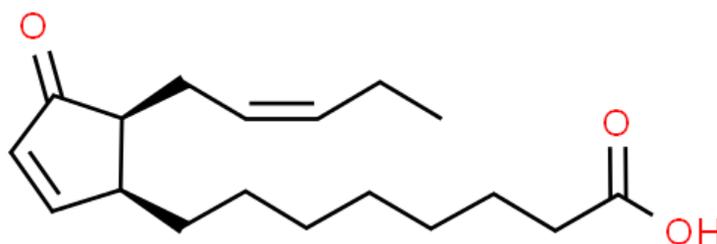


Figura 1.9. Estructura del ácido 12-oxo-fitodienoico.

1. 5. CULTIVOS *IN VITRO*.

Las plantas medicinales son una gran fuente de metabolitos bioactivos, estos metabolitos secundarios tienen diversas aplicaciones en la industria química, cosmética, agroalimentaria y farmacéutica por lo que la demanda de estos productos ha aumentado de manera significativa. Sin embargo, la producción de metabolitos secundarios suele ser baja (<1% de peso seco) y depende en gran medida de los factores ambientales durante el crecimiento de la planta, ya que estos afectan su estado fisiológico y su desarrollo (Singh y Dwivedi., 2018; Thakur *et al.*, 2018; Narayani y Srivastava., 2017).

Actualmente existen diversas alternativas para la obtención de metabolitos secundarios ya sea de manera directa o indirecta. Estos incluyen técnicas de extracción o síntesis química; la primera está limitada por la disponibilidad del material vegetal que depende de la estacionalidad y de las condiciones climáticas y geográficas. Adicionalmente, los extractos vegetales se obtienen como una mezcla de productos que deben ser purificados, lo que encarece exponencialmente los costos de producción. La segunda suele presentar dificultades como la disponibilidad de los precursores, la estereoespecificidad de las reacciones, la inestabilidad de los productos, la dificultad de algunas reacciones químicas y los elevados costos de producción (Sabater-Jara., 2013).

Entre las alternativas de producción de carácter biotecnológico para la obtención de metabolitos secundarios está la utilización de los cultivos *in vitro* de órganos, tejidos y/o células vegetales. El cultivo *in vitro* de células vegetales ha abierto nuevas alternativas como fuente renovable de compuestos bioactivos de gran valor añadido (Ramachandra y Ravishankar, 2002); sus principales ventajas incluyen la independencia de los cultivos *in vitro* de factores geográficos, estacionales y ambientales, la estabilidad de sus sistemas de producción y los bajos requerimientos de espacio para los procesos de producción son reducidos. El proceso de purificación del producto de interés es más fácil y se optimiza cuando éste se libera al medio de cultivo, generando la posibilidad de producirlo a gran escala y de obtener productos que no son sintetizados de forma natural por la planta (Singh y Dwivedi, 2018; Cai *et al.*, 2012; Ramachandra y Ravishankar, 2002).

El cultivo de callos, así como de células en suspensión, se emplea para la regeneración de plantas por organogénesis o embriogénesis somática y también es utilizado para la obtención de protoplastos y productos del metabolismo secundario. No obstante, a pesar de las numerosas ventajas que presenta el cultivo de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios, también presenta varias limitaciones, principalmente la inestabilidad de las líneas celulares, el bajo rendimiento en la obtención del producto, la lenta velocidad de crecimiento y los problemas de escalado. Esto ha llevado a que varias investigaciones estén dirigidas al desarrollo de estrategias que incrementen la producción de metabolitos secundarios por cultivo *in vitro* (Sabater-Jara., 2013). Entre estas estrategias se encuentran las siguientes:

- a) Selección del material vegetal y optimización de las condiciones de cultivo, el cultivo de células diferenciadas, la inmovilización de células vegetales, el empleo de inductores y la aplicación de condiciones de estrés, entre otros.

- b) Estudio de las vías de transducción de la señal que conducen a la biosíntesis de metabolitos secundarios.
- c) Estudio de los factores de transcripción y su mecanismo de regulación, incluyendo la manipulación de genes reguladores para mejorar la producción de metabolitos secundarios.
- d) Estudio del flujo metabólico y del perfil metabólico de los intermediarios de la ruta de biosíntesis para conocer las rutas más completas y la regulación de la acumulación de los productos de interés.
- e) El estudio de la transcripción génica del metabolismo secundario mediante el estudio y análisis del perfil de expresión génica en diferentes condiciones, con el fin de comprender la regulación del metabolismo secundario en todo su conjunto.

Entre los distintos tipos de cultivos, las células en suspensión ofrecen una alternativa biotecnológica interesante, debido a que son capaces de dirigir su metabolismo hacia la síntesis de determinados compuestos en respuesta a la estimulación con inductores. De este modo, la cantidad del producto sintetizado puede aumentar, alcanzando cantidades comparables a las que se extraen de los tejidos vegetales recolectados (Sabater-Jara., 2013; Bru *et al.*, 2006).

1. 5.1. Uso de inductores para la producción de metabolitos secundarios.

Como se mencionó anteriormente, las plantas tienen un potencial bajo para la síntesis de metabolitos secundarios, por lo que diversos estudios están dirigidos al desarrollo de estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios por cultivo *in vitro*, entre estas alternativas encontramos el uso de inductores para potenciar la producción de metabolitos secundarios (Sabater-Jara, 2013; Bru *et al.*, 2006).

Recientemente, la inducción se ha convertido en una de las herramientas destacadas para la obtención de metabolitos secundarios, así como su producción mejorada en cultivos de plantas. Los inductores son moléculas que pueden mejorar la respuesta al estrés de la planta, al inducir la síntesis de metabolitos secundarios que pueden asegurar la supervivencia, persistencia y competitividad de la planta en condiciones bióticas adversas. Un inductor puede ser cualquier factor biótico o abiótico que, introducido en pequeñas cantidades, es capaz de perturbar el metabolismo a través de una regulación transcripcional de genes relacionados con las respuestas de defensa. (Kaur *et al.*, 2021; Singh y Dwivedi, 2018; Sabater-Jara., 2013). La estimulación del metabolismo secundario por inducción es el resultado de una compleja

interacción entre el tejido vegetal y el inductor; entre los parámetros a considerar destacan la concentración, la selectividad, la duración de la exposición al inductor, así como la etapa de crecimiento del cultivo que se va a estimular con el inductor, la línea celular y sus parámetros de crecimiento. Todos estos factores, entre otros, pueden influir en la producción exitosa de un metabolito secundario (Halder *et al.*, 2019; Singh y Dwivedi, 2018).

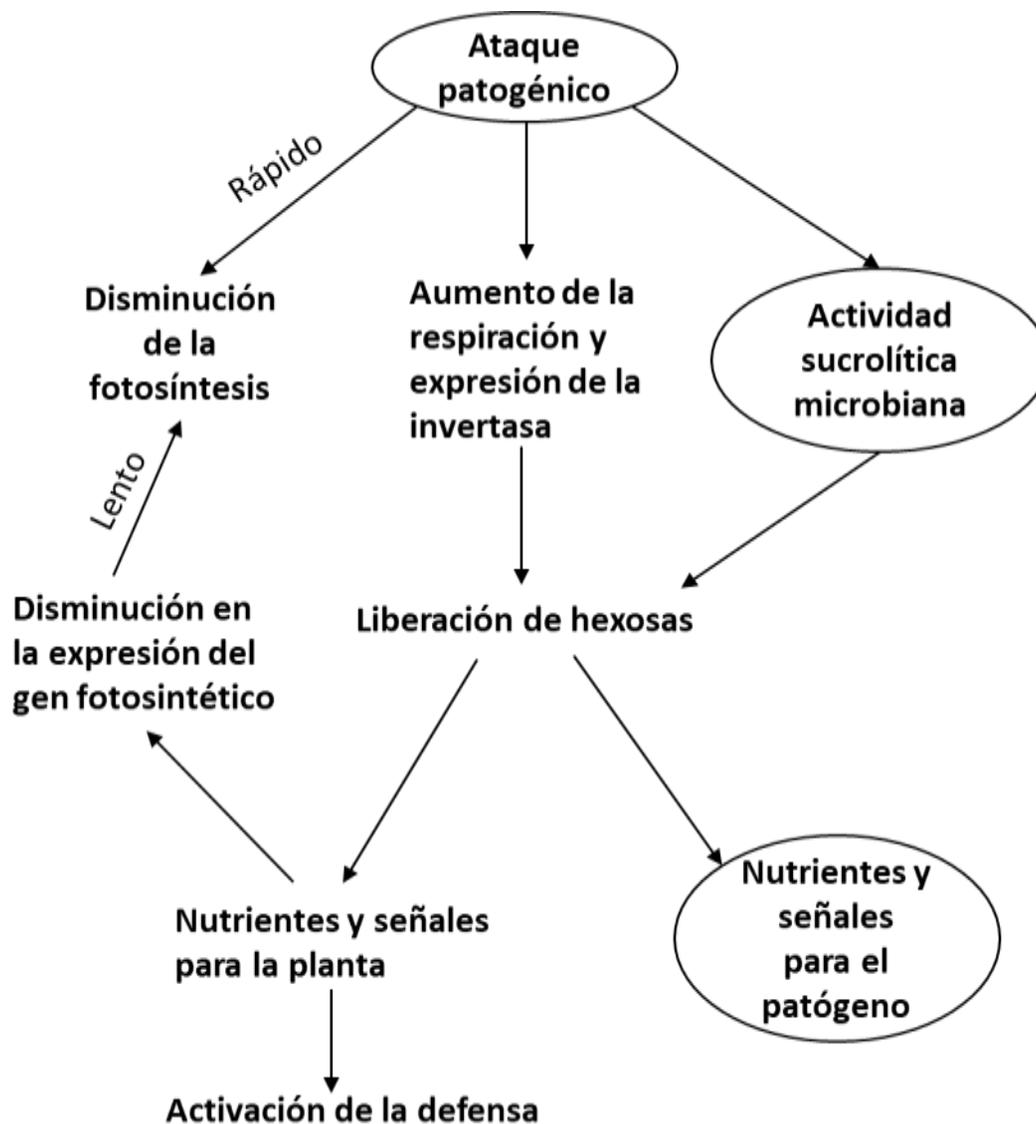


Figura 1.10. Modelo de cambios en el metabolismo de los carbohidratos en respuesta a la infección por patógenos biotróficos virulentos (Berger *et al.*, 2007a).

1. 5.1.1. Clasificación de los inductores.

Los inductores se clasifican en dos grupos según su origen: abióticos y bióticos. Los primeros pueden ser, a su vez, de dos tipos (Chavdarova., 2019):

- a) Inductores físicos: Déficit hídrico, temperatura extrema, radiación luminosa excesiva o insuficiente, anaerobiosis por encharcamiento, factores mecánicos (viento, compactación del suelo y las lesiones).
- b) Inductores químicos: Estrés iónico (por salinidad), estrés nutricional y contaminantes.

Los inductores abióticos son sustancias no biológicas que pueden alterar la integridad de la membrana o funcionan a través de otros mecanismos.

Por su parte, los inductores bióticos son liberados por seres vivos y pueden ser de dos tipos exógenos o endógenos; los inductores exógenos incluyen sustancias de origen patógeno en tanto que los endógenos que son compuestos producidos por las propias plantas después de la acción del patógeno.

Los inductores bióticos exógenos incluyen compuestos liberados por microorganismos y otros patógenos, o formados por la acción de enzimas vegetales en las paredes celulares microbianas. Como ejemplos están las enzimas microbianas, lisados de hongos y bacterias, extractos de levadura y los polisacáridos que forman las paredes celulares de los microorganismos (e.g. quitina y glucanos). Los inductores de origen endógeno incluyen polisacáridos que se originan de la degradación patógena de la pared celular vegetal, de proteínas intracelulares y de moléculas señalizadoras (e.g. hormonas vegetales como MeJA), sintetizadas por la célula vegetal en respuesta al ataque de patógenos. Los polisacáridos, glicoproteínas, quitina, pectina, alginato, elicitina, xantano, etc., son los ejemplos de moléculas con una composición definida, mientras que el homogeneizado fúngico y el EL tienen composiciones complejas (Kaur *et al.*, 2021; Ramírez-Estrada *et al.*, 2016; Atanasov *et al.*, 2015; Rao y Ravishankar, 2002). En el Cuadro 1.2 muestra la clasificación básica de inductores para la producción de metabolitos secundarios (Halder *et al.*, 2019).

En el cuadro 1.3 se muestran algunos inductores abióticos y bióticos utilizados para la producción de metabolitos secundarios (alcaloides) de plantas (tomado de Kaur *et al.*, 2021).

Cuadro 1.2. Clasificación de los inductores de acuerdo con su naturaleza. Tomado de Kaur *et al.*, 2021.

Bióticos		Abióticos		
Composición definida	Composición no definida	Químicos	Físicos	Moléculas de señalización intracelular
Polisacáridos purificados, glicoproteína, glucanos, quitina, quitosano, pectina, alginato, xantano, elicitina, enzimas inactivadas etc.	EL, homogeneizado de hongos, extracto bacteriano etc.	Sales de metales pesados: Ag ₂ S ₂ O ₃ , AgNO ₃ , CuCl ₂ , CuSO ₄ , VO ₄ , NISO ₄ , selenio etc.	Luz y radiación ultravioleta, cambio de temperatura, salinidad, sequía, etc.	JA, MeJA, AS, ácido acetil salicílico, sistemina, etc.
		Estresores osmóticos: Manitol, sorbitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de cadmio, polivinilpirrolidona etc.		
		Gases: NO, etileno etc.		

Cuadro 1.3. Algunos inductores abióticos y bióticos utilizados para la producción de metabolitos secundarios (alcaloides) de plantas en cultivos vegetales. Tomado de Kaur *et al.*, 2021.

Planta	Metabolito secundario	Inductor		
		Biótico	Abiótico	
			Físico	Químico
<i>Luridus anisódico</i>	Escopolamina e hiosciamina		UV	AAS
<i>Luridus anisódico</i>	Escopolamina e hiosciamina			Etanol, Ag ⁺ , MeJA
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina	<i>Colletotrichum spp.</i>		
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina	<i>Piriformospora indica</i>		
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinina			MeJA
<i>Atropa belladonna</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , quitosano, quitina, extracto de levadura			Fitosulfokina- α , CuCl ₂ , CdCl ₂ , H ₂ O ₂ , glutatión, MeJA
<i>Brugmansia candida</i>	Hiosciamina, escopolamina			CdCl ₂ , AgNO ₃ , CaCl ₂ , SA
<i>Brugmansia candida</i>	Hiosciamina, escopolamina	Hemicelulasa		AlCl ₃ , JA
<i>Calotropis gigantean</i>	Cardenolida (glucósidos cardíacos)	EL y quitosano		MeJA

<i>Catharanthus roseus</i>	Ajmalicina (alcaloide del indol terpenoide)			Manitol, NaCl, KCl, CdCl ₂ , <i>n</i> -hexadecano, Tween 80, DMSO, Triton X-100, JA, MeJA
<i>Datura metel</i>	Alcaloide tropano, atropina	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Bacillus cereus</i>		
<i>Datura stramonium</i>	Alcaloides tropano Lubimina y 3-hidroxilubimina	Celulasa, levadura, <i>Fusarium solani</i> , <i>T. viride</i> , <i>Gongrenella</i> sp., <i>A. alternata</i> , <i>A. niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>C. bakenseae</i>		CdCl ₂ , CuSO ₄ ,
<i>Datura stramonium</i>	Alcaloides tropano		pH	
<i>Datura stramonium</i>	Alcaloide tropano, hiosciamina			KCl, CaCl ₂
<i>Datura innoxia</i>	Alcaloide tropano, hiosciamina			KCl, CaCl ₂
<i>Datura tatula</i>	Alcaloide tropano, hiosciamina			KCl, CaCl ₂
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Escopolamina			MeJA
<i>Hyoscyamus reticulatus</i> L.	Hiosciamina y escopolamina			Nitroprusiato de sodio
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Hiosciamina y escopolamina	Quitosano		
<i>Papavar orientale</i>	Alcaloides morfinanos			MeJA
<i>Portulaca oleracea</i>	Dopamina			MeJA y SA
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Alcaloide indol	Mannan		NaCl
<i>Rhazya stricta</i>	Alcaloide indol			MeJA
<i>Scopolia parviflora</i>	Escopolamina	Bacterias		
<i>Solanum khasianum</i>	Alcaloides	<i>Aspergillus niger</i>		Celulasa, NaCl
<i>Taxus media</i> Var. Hicksii Rehd.	Paclitaxel, 10-desacetilbacatina III			MeJA
<i>Trigonella foenum-graceum</i>	Diosgenina	Quitosano		

Ag+, plata; **AgNO₃**, nitrato de plata; **AlCl₃**, cloruro de aluminio; **AAS**, ácido acetilsalicílico, **CaCl₂**, cloruro de calcio, **CdCl₂**; cloruro de cadmio, CuSO₄; sulfato de cobre; **H₂O₂**, peróxido de hidrógeno; **JA**, ácido jasmónico; **KCl**, cloruro de potasio; **MeJA**, jasmonato de metilo; **NaCl**, cloruro de sodio, **AS**, ácido salicílico; **UV**, radiación ultravioleta.

1. 5.1.2. Inductores como estimuladores biológicos de respuestas de defensa en plantas.

Los inductores son productos o factores químicos que desencadenan la activación de las respuestas de defensa de las plantas y que al inducir la síntesis de metabolitos secundarios específicos, a menudo aumentan su producción. Se ha observado que los inductores promueven reordenamientos en los flujos metabólicos de una vía expresada constitutivamente, hacia la vía activada por el agente. Esta regulación diferencial en la biosíntesis de productos alternos refleja una característica importante del papel del metabolismo secundario en la planta, que es mediada por el inductor (Kaur *et al.*, 2021; Ferrari, S., 2010).

Los inductores actúan como una señal y el estímulo comienza con la percepción de ésta por receptores específicos presentes en la membrana de la célula vegetal. Esto es seguido por el inicio de la cascada de transducción de señales que implica eventos reversibles de fosforilación y desfosforilación de proteínas, tanto membranales como citosólicas, lo que a su vez, da lugar a un recambio citosólico del Ca_2^+ , salida de iones Cl^- y K^+ y entrada de H^+ , con la consiguiente alcalinización extracelular y acidificación citoplásmica, así como activación de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), activación de la NADPH oxidasa, y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS). Esto conduce a cambios en el nivel de expresión de varios genes y factores de transcripción reguladores, así como de genes para pasos limitantes de la velocidad de las vías metabólicas secundarias, dando como resultado una mayor síntesis y acumulación de metabolitos antimicrobianos, como fitoalexinas, y de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), ambos utilizados por las plantas para prevenir los ataques microbianos (Figura 1.11). Adicionalmente, este mecanismo también puede aumentar el nivel de resistencia de la planta contra futuros ataques de patógenos (Kaur *et al.*, 2021; Halder *et al.*, 2019; Ramírez-Estrada *et al.*, 2016).

De este modo, la transducción de las señales activada por inductores consiste en una red de componentes múltiples que establece una defensa eficaz mediante diversas reacciones secuenciales que incluye vías de señalización paralelas o reticuladas que conducen a diferentes respuestas. Así, las vías de señalización de un inductor pueden variar en la percepción de diferentes estímulos o respuestas de defensa del objetivo, incluso puede generar respuestas hipersensibles, caracterizadas por una muerte celular rápida en las inmediaciones del punto de exposición al patógeno, así como la formación de barreras defensivas estructurales, como la deposición de lignina para reforzar las paredes celulares (Kaur *et al.*, 2021).

Actualmente, muchas investigaciones en biotecnología vegetal están dirigidas a dilucidar el mecanismo de acción de los principales inductores. En algunos casos se han determinado los receptores, los mensajeros secundarios, las vías de transducción y los genes sensibles y también se sabe que existe una gran variabilidad en los mecanismos de acción que conllevan a una amplia gama de respuestas metabólicas (Kaur *et al.*, 2021).

La optimización del tipo de inductor, así como la dosis y el tiempo de exposición es esencial para su aplicación en la producción biotecnológica de metabolitos secundarios, ya que su acción es específica, tanto para la especie vegetal, como para la ruta biosintética. Por lo tanto, un inductor puede no estimular el metabolismo secundario de manera similar en todas las especies o no afectar del mismo modo a los diferentes grupos de metabolitos secundarios en una misma especie. Por otro lado, los inductores no solo ayudan a mejorar la acumulación de un metabolito, sino que también pueden estimular la salida de productos intracelulares, lo que incide en la recuperación y purificación del metabolito secundario. Recientemente se ha examinado la integración de diferentes estrategias para estos fines que incluyen la inducción tradicional, con un inductor único, o la aplicación de combinaciones simultáneas de más de un inductor. En la mayoría de las especies, estas estrategias mejoraron el rendimiento de metabolitos secundarios, mediante el efecto sinérgico de la estrategia individual (Kaur *et al.*, 2021; Halder *et al.*, 2019).

1.5.2. Inducción de la biosíntesis de alcaloides en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* L.

Se ha reportado que los cultivos celulares de *A. mexicana* responden acumulando alcaloides al tratamiento con inductores y que la respuesta varía de acuerdo con el inductor utilizado. La acumulación de Sa en cultivos tratados con MeJA (100 μ M) puede alcanzar valores de 2 mg/g de peso seco, duplicando el rendimiento de los no expuestos, mientras que el AS (100 μ M) no induce un aumento en la producción de Sa, pero tampoco la inhibe. Por otro lado, la aplicación de homogenados de *Fo* (equivalente a 1 cm² de micelio) produce un aumento significativo después de 96 h con valores superiores a los 4 mg/g PS, cerca de cuatro veces más que los testigos no expuestos (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

Adicionalmente se encontró que la aplicación secuencial de MeJA (100 μ M), AS (100 μ M) y EL (200 mg/L) a cultivos celulares de *A. mexicana* resulta en la mayor acumulación de Sa (190 mg/g PS a las 96 h) comparada con la aplicación simultánea (108 mg/g PS a las 96 h) e individual, donde la inducción con MeJA duplicó la acumulación de Sa (40 mg/g PS) comparadas con las muestras control (20 mg/g PS). (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010) y la exposición a EL resultó en

una importante acumulación de Sa (108 mg/g PS). Estos resultados demuestran el efecto sinérgico que genera usar más de un inductor para la acumulación de un metabolito secundario de interés (Kaur *et al.*, 2021; Halder *et al.*, 2019; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012).

Se ha observado que los tratamientos con MeJA (100 μ M), y EL (200 mg/L) inducen producción de Sa. La respuesta limitada de los cultivos expuestos a EL tratados con ácido dietilditiocarbámico (DIECA), un inhibidor de la vía octadecanoica (OCDA), sugiere que la biosíntesis de Sa depende de manera parcial de esta vía (Guizar-González *et al.*, 2016).

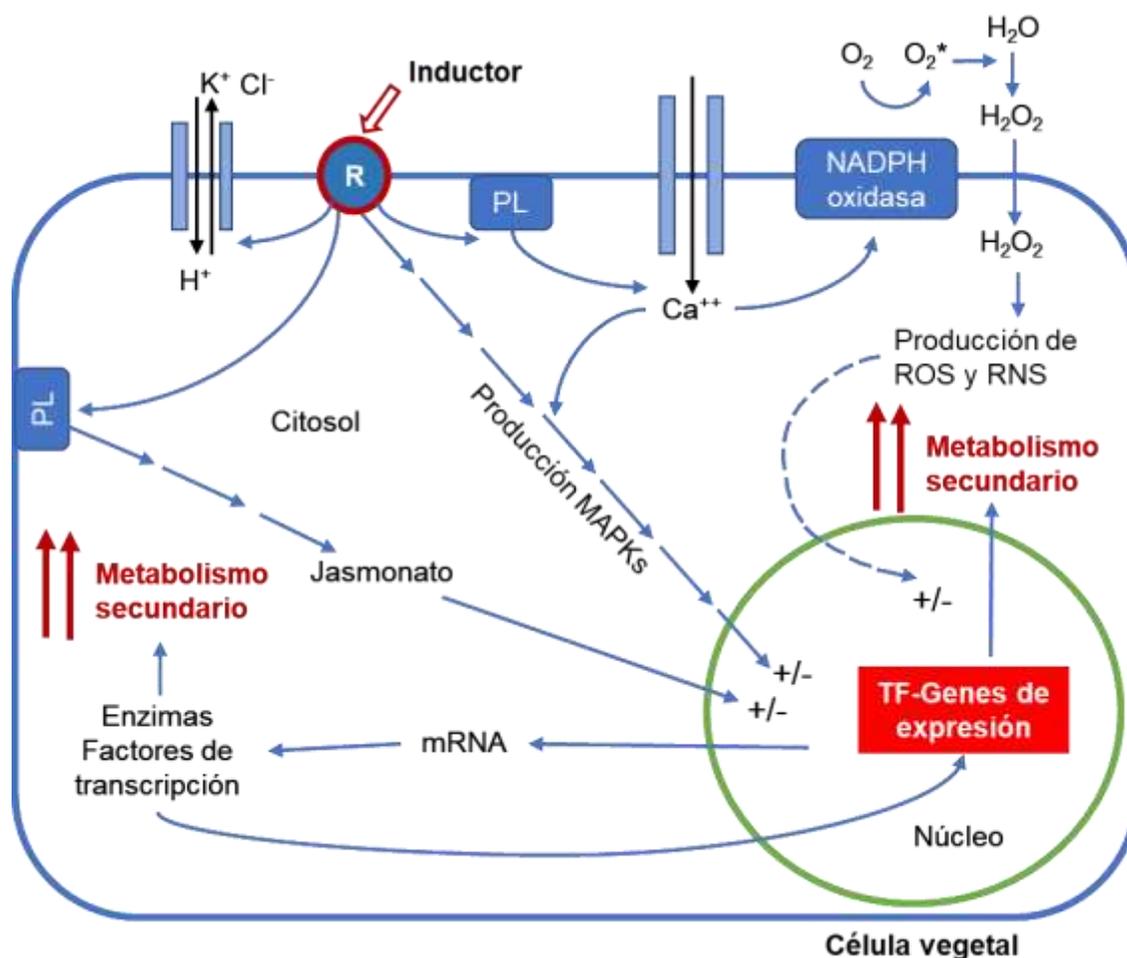


Figura 1.11. Modo de acción del jasmonato en el proceso de inducción del metabolismo secundario (R: receptor; PL: fosfolipasa; MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos; ROS: especies reactivas de oxígeno; RNS: especies reactivas de nitrógeno; TF: factores de transcripción) (Ramírez-Estrada *et al.*, 2015).

Aun cuando el uso de inductores en cultivos celulares de *A. mexicana* L. puede generar un aumento en la producción de Sa, también se debe considerar que estos cultivos producen otros alcaloides, aunque en menor proporción. Por ello, es obvio que el inductor utilizado, así como la

dosis y los diferentes tiempos de exposición, pueden repercutir en la síntesis de los demás alcaloides, distintos a Sa. De aquí, el interés por comprender de qué manera los inductores intervienen en la síntesis de otros alcaloides en cultivos celulares de *A. mexicana*

RECAPITULACIÓN

Las plantas, al estar continuamente expuestas a condiciones de estrés biótico y abiótico en su entorno natural, han desarrollado mecanismos para percibir señales externas, lo que les permite montar una respuesta óptima a esas condiciones. Los factores de riesgo a los que se exponen las plantas se agrupan en dos grandes categorías; aquellos que se deben a condiciones fisicoquímicas del ambiente, como temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes o iluminación (inducción abiótica); y aquellas ocasionados por otros organismos vivos, como microorganismos y herbívoros (inducción biótica). En ambos casos, la respuesta defensiva de las plantas repercute en su metabolismo secundario.

Los inductores bióticos son liberados por seres vivos y pueden ser de dos tipos; los exógenos que incluyen sustancias producidos por microorganismos y algunos patógenos por ejemplo: enzimas microbianas, lisados de hongos y bacterias, extracto de levadura y los polisacáridos; y los endógenos son producidos por las propias plantas después de la acción del patógeno como las hormonas vegetales MeJA o el AS.

En este trabajo se pretende analizar la respuesta de *A. mexicana* (Papaveraceae) a condiciones adversas que conducen a la acumulación de estos alcaloides. Para esto se utilizarán dos modelos de estudio; plantas de campo afectadas por una infección fúngica y cultivos *in vitro* en condiciones de inducción.

Dado que tanto la Be como la Sa tienen propiedades antimicrobianas (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013), se espera que durante el proceso de infección ocurran cambios en la acumulación de estos alcaloides y que los cambios se relacionen con la distribución tisular de ambos alcaloides.

Por otro lado, tomando en cuenta que los cultivos celulares de *A. mexicana* responden a la adición de inductores del metabolismo secundario modificando sus patrones de acumulación de los ABI's Sa y dihidrosanguinarina, en este estudio se plantea comparar la respuesta de cultivos *in vitro* de *A. mexicana* a diferentes condiciones de inducción que incluyen la aplicación de tres

estrategias de inducción; individual, simultánea y secuencial, usando dos dosis diferentes (100 y 200 mg/L y 100 y 200 μ M) de los inductores EL y MeJA.

Estudios previos han reportado la acumulación de Sa o dihidrosanguinarina en la línea AMMiF de *A. mexicana* sometidos a inductores del metabolismo secundario como MeJA, AS, EL y homogenado fúngico de *Fo* (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). Sin embargo, se desconoce la respuesta de la línea AM1 en condiciones de inducción por lo que se propone su análisis en este trabajo. Las inducciones se realizarán con EL y MeJA en tres esquemas diferentes; cada uno de manera individual; en una combinación simultánea y en otra secuencial en la que primero serán expuestos a MeJA y después de un periodo de tiempo a EL.

Por otro lado, también se utilizarán plantas silvestres de *A. mexicana* provenientes de poblaciones infectadas, asintomáticas y sanas para analizar de qué manera el proceso de infección influye en la distribución tisular de los alcaloides presentes. La Be y la Sa son dos de los alcaloides mayoritarios en *A. mexicana* con propiedades antimicrobianas (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013), por lo que se espera que durante el proceso de infección ocurran cambios en la acumulación de estos alcaloides y que los cambios se relacionen con su distribución tisular.

JUSTIFICACIÓN

Argemone mexicana es una especie productora de ABI's entre los que destacan Be y Sa por ser los alcaloides que se sintetizan mayoritariamente, sin embargo, es posible encontrar otros alcaloides como Que, protopina, pancorina, argenaxina entre otros. Estudios previos han reportado que cultivos celulares de *A. mexicana* responden a la adición de inductores del metabolismo secundario modificando sus patrones de acumulación. Hasta ahora se ha estudiado el efecto de inductores como MeJA, AS, EL y el homogenado fúngico de *Fo* en la acumulación de Sa o dihidrosanguinarina en la línea AMMiF de *A. mexicana*. Sin embargo, se desconoce la respuesta en la regulación de los alcaloides presentes en la línea AM1 en condiciones de inducción por lo que se propone su análisis en este trabajo. Es importante mencionar que los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* tanto la línea AMMiF como la línea AM1 se caracterizan por la presencia de Sa y la ausencia de Be, mientras que en condiciones normales, las plantas silvestres sintetizan estos dos alcaloides de manera simultánea de acuerdo con la etapa de desarrollo de la planta (Monforte-González *et al.*, 2019; Vázquez-Flota *et al.*, 2018; Guizar-González *et al.*, 2016; Hagel y Fachini, 2013; Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013; Trujillo-

Villanueva *et al.*, 2012; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). De igual forma, *A. mexicana* presenta susceptibilidad a algunos patógenos que pueden afectar su desarrollo. Así mismo, los estudios que documentan especies patógenas en *A. mexicana* son muy escasos por lo que lo convierte en un área de oportunidad (Abdel-Hafez, 1985; Holm *et al.*, 1977).

Se propone el uso de dos modelos de estudio: cultivos *in vitro* de *A. mexicana* bajo inducción y plantas silvestres de *A. mexicana* infectadas por hongos patógenos. La inducción en los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* es con el fin de simular una infección por hongos, ya que el extracto de levadura contiene fragmentos de la pared celular que activan las reacciones de defensa en los cultivos. Por otro lado, el MeJA es un mediador bioquímico en las respuestas de defensa. Mientras que Be y Sa también son conocidos por sus propiedades antimicrobianas. Por lo tanto, se espera que durante el proceso de infección ocurran cambios en la acumulación de dichos alcaloides y que estos cambios se relacionen con la distribución tisular que ambos alcaloides presentan.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los cambios inducidos en la acumulación de alcaloides en cultivos celulares y plantas silvestres infectadas de *A. mexicana* L. producidos como parte de una respuesta de defensa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar técnicas cromatográficas para analizar la respuesta de cultivos *in vitro* de *A. mexicana* bajo condiciones de inducción.
- Obtener el perfil metabólico de plantas silvestres de *A. mexicana* infectadas por hongos patógenos.
- Utilizar técnicas cromatográficas para evaluar las respuestas de las condiciones de contraste en las plantas infectadas de *A. mexicana*.
- Comparar la variación cromatográfica de los alcaloides entre los cultivos *in vitro* y las plantas silvestres de *A. mexicana* con respecto a las diferentes condiciones de inducción biótica.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se planteó con dos modelos de estudio: Cultivos *in vitro* expuestos a inductores del metabolismo secundario y plantas de poblaciones silvestres con síntomas de infección por hongos. Las estrategias de inducción en cultivos *in vitro* incluyeron la aplicación individual de MeJA y EL, así como combinaciones de ambos de manera simultánea o secuencial (MeJA 24 hrs. después de EL). Para las plantas, se utilizaron tejidos con síntomas visibles de infección (denominadas de aquí en adelante como plantas infectadas), plantas de la misma población, pero sin mostrar síntomas (definidas como plantas asintomáticas) y plantas provenientes de una población sin individuos infectados (plantas sanas). En secciones posteriores se describen los detalles de los estudios realizados en cada modelo. Los tejidos colectados en los diferentes tratamientos se analizaron en cuanto al contenido de alcaloides por cromatografía en capa fina (CCF) y los resultados se analizaron estadísticamente (Figura 1.11).

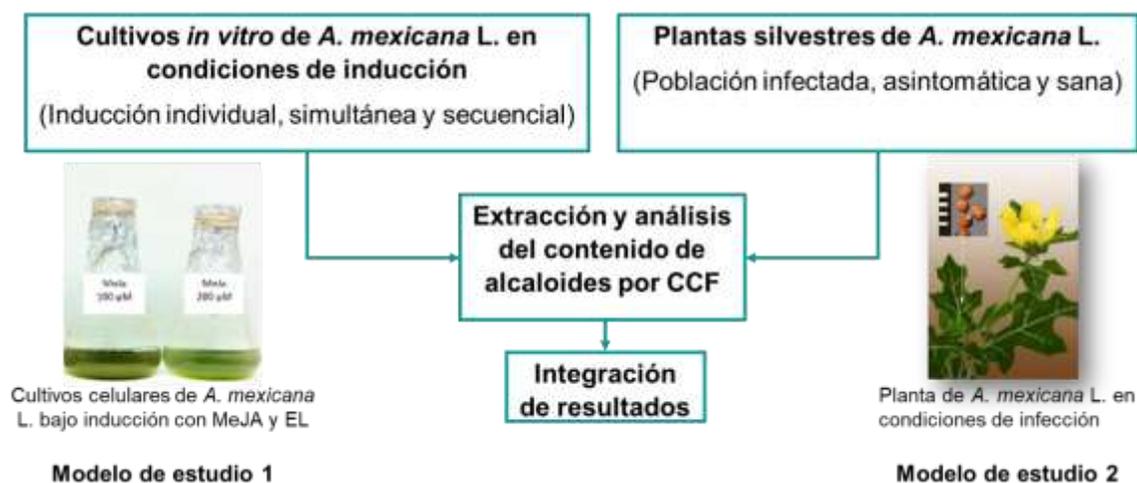


Figura 1.12. Estrategia experimental para el análisis del contenido de alcaloides en *A. mexicana* L. en dos modelos de estudio.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1.1 Cultivos *in vitro* de *A. mexicana* L.

Las suspensiones celulares, utilizadas en los experimentos de inducción, se obtuvieron a partir de una línea de callos AM1 provenientes de hojas de *A. mexicana* (Monforte-González *et al.*, 2019). La resiembra de los callos se realizó cada 21 días en medio sólido de Murashige y Skoog (MS) (Cat. M5519-50L, Sigma-Aldrich, Merck), suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0.5 mg/L de 6-bencilaminopurina (BAP), 1.5 mg/L de ácido 1-naftalenacético (ANA) y 2.2 g/L de Gelrite (Gellan Gum, G1910, Sigma-Aldrich, Merck). La resiembra de las suspensiones celulares se realizó cada 14 días en medio MS líquido con la misma composición ya descrita, pero sin adicionar el gelificante (Figura A.1.). Los cultivos se mantuvieron en agitación continua a 100 rpm (Gyrotory Shaker G10, new brunswick scientific co., inc), en un cuarto de cultivo a 25 °C, con 70 % de humedad relativa y bajo iluminación continua provista con lámparas de luz blanca fluorescentes de 39 W.

2.1.2. Tratamientos de inducción en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* L.

Para las inducciones se utilizaron suspensiones celulares obtenidas a partir de la línea de callos AM1 (línea AMME; ver Resultados). Las suspensiones fueron expuestas a EL y MeJA bajo tres tratamientos (Figura 2.1); **1**) individual: se ensayaron dos concentraciones diferentes por cada inductor, 100 y 200 mg/L (EL) y de 100 y 200 μ M (MeJA); **2**) secuencial, aplicando primero EL 200 mg/L y MeJA 200 μ M 24 h después; y **3**) simultáneo, EL 200 mg/L y MeJA 200 μ M.

En todos los casos, los tratamientos se aplicaron a suspensiones de 5 días, inicialmente inoculadas con 10 mL de suspensiones celulares con 14 días de crecimiento. Para ello, se preparó una suspensión madre combinando matraces de cultivo con suspensiones de 14 días de crecimiento y se ajustó la densidad a 0.03 g/mL con medio fresco (aproximadamente 1.5 g de peso fresco en 50 mL de medio MS). Matraces conteniendo 50 mL de medio MS suplementado, se dejaron bajo iluminación continua y agitación constante a 100 rpm durante 120 hrs. antes de las aplicaciones se inocularon con 10 mL de la suspensión madre y se mantuvieron en agitación constante en el cuarto de cultivo hasta el momento de ser utilizadas. Las colectas de los

tratamientos, en el número de repeticiones indicadas, se efectuaron en los tiempos correspondientes, incluyendo los testigos expuestos a una mezcla de los disolventes utilizados en la preparación de cada inductor (etanol 50% en agua).

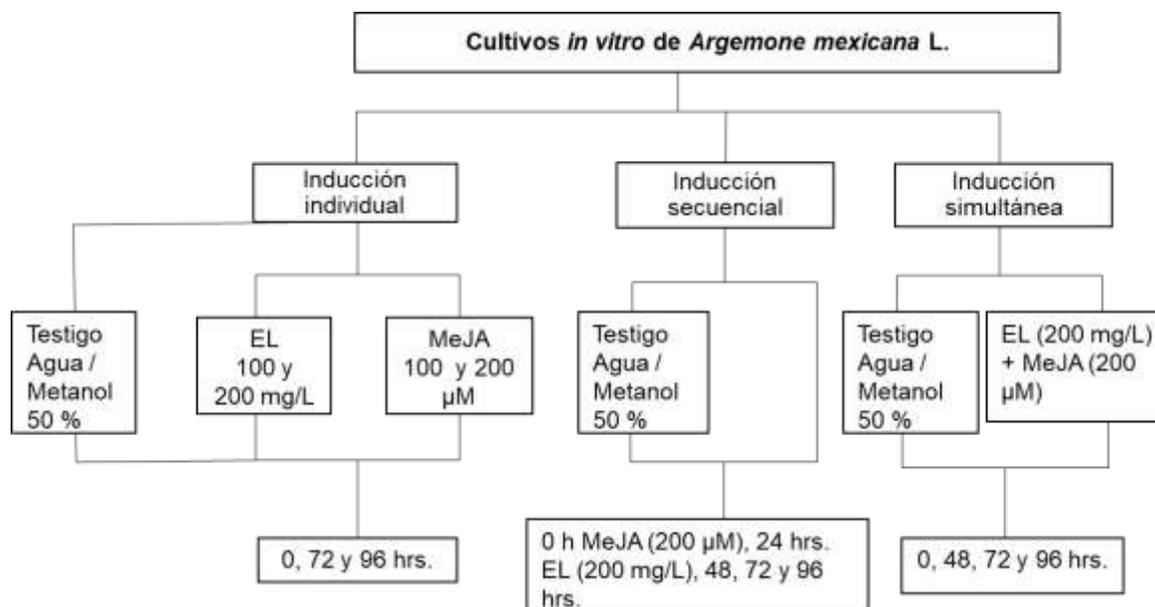


Figura 2.1. Esquema de los tratamientos de inducción aplicados.

Al momento de aplicar el tratamiento 1 (inducción individual), las suspensiones tenían 6 semanas de haber sido generadas a partir de la línea de callos AM1, mientras que para los tratamientos 2 (secuencial) y 3 (simultánea), contaban con 12 y 18 semanas, respectivamente. Todas las manipulaciones se realizaron en una campana de flujo laminar horizontal (Esco laminar flow cabinet. ISO 14644.1 Class 4 - IEC 61010-1) utilizando pinzas e instrumentos previamente esterilizados por calor (Simon Keller STERI 350 Seconds-Sterilizer EU Plug 31171). Los medios de cultivo y la cristalería se esterilizaron en una autoclave (Sterile Health G3).

Para el tratamiento 1, el MeJA (Methyl jasmonate-95%, 39924-52-2, Sigma-Aldrich) (1.085 ml) se disolvió en 50 mL de etanol obteniendo una solución madre a 100 μM y se agregaron 50 y 100 μL de la solución stock para una concentración de 100 μM y 200 μM respectivamente, mientras que EL (Y-1625 SIGMA-ALDRICH) se disolvió en agua obteniéndose una solución madre a una concentración de 100 mg/L y se agregaron 50 y 100 μL para una concentración de 100 y 200 mg/L (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012). Antes de aplicar el tratamiento, las suspensiones se dejaron 120 hrs. para aclimatarse al nuevo medio. Las colectas se realizaron a las 0, 72 y 96 hrs. y cada tratamiento se realizó por triplicado, las muestras colectadas se almacenaron en el congelador para su posterior liofilización. Cabe destacar que las dosis seleccionadas para el

tratamiento 2 y 3 fueron determinadas por los resultados obtenidos en la cuantificación de Sa del tratamiento 1 (Ver sección de resultados).

Para el tratamiento 2, las suspensiones se aclimataron durante 120 hrs. después de la resiembra y se aplicó MeJA primeramente y 24 hrs. después EL en los volúmenes para alcanzar las dosis correspondientes (200 mg/L para EL y 200 μ M para MeJA). Las colectas, por triplicado, se realizaron a las 0, 24, 48, 72 y 96 hrs. después del inicio de la inducción.

Para el tratamiento 3, ambos inductores se aplicaron en volúmenes para alcanzar las dosis indicadas después de 120 hrs. de aclimatación al nuevo medio y las colectas, por triplicado, se realizaron a las 0, 24, 48, 72 y 96 hrs. después del inicio de la inducción.

En todos los casos, los matraces se cosecharon por filtración al vacío, se congelaron tanto las células como el medio de cultivo y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

2.1.3. Plantas sanas e infectadas de *A. mexicana* L.

Las plantas analizadas provenían de poblaciones silvestres colectadas en zonas urbanas: localidad de Cholul, Municipio de Mérida Yucatán, que incluía tanto plantas con síntomas visibles de infecciones fúngicas y plantas sin afecciones visibles (asintomáticas); y otra población localizada en la colonia Pinzones/Chuburná, aledaña al Jardín Botánico Regional Roger Orellana del CICY, en Mérida Yucatán, que para este estudio se determinaron como plantas sanas. Se clasificaron en tres grupos de acuerdo con la presencia o ausencia de síntomas de infección. Estos grupos fueron **plantas infectadas**, con síntomas visibles de infección fúngica espontánea; **plantas asintomáticas**, provenientes de la misma población que las plantas infectadas, pero sin síntomas visibles; y **plantas sanas**, provenientes de una población distinta de la anterior y sin plantas con síntomas visibles.

Se realizaron colectas de tres individuos de cada población, y de cada individuo, se colectaron 10 muestras de hoja, tallo y raíz. Los tallos se seccionaron en tres partes de acuerdo con su posición (apical, medio y basal). Para el caso de las raíces, se colectaron las raíces de los individuos vecinos a las plantas infectadas con el fin de tener el número de repeticiones requeridas (Figura 2.2). Los tejidos se lavaron con agua corriente, se pesaron, y se almacenaron a -20°C .

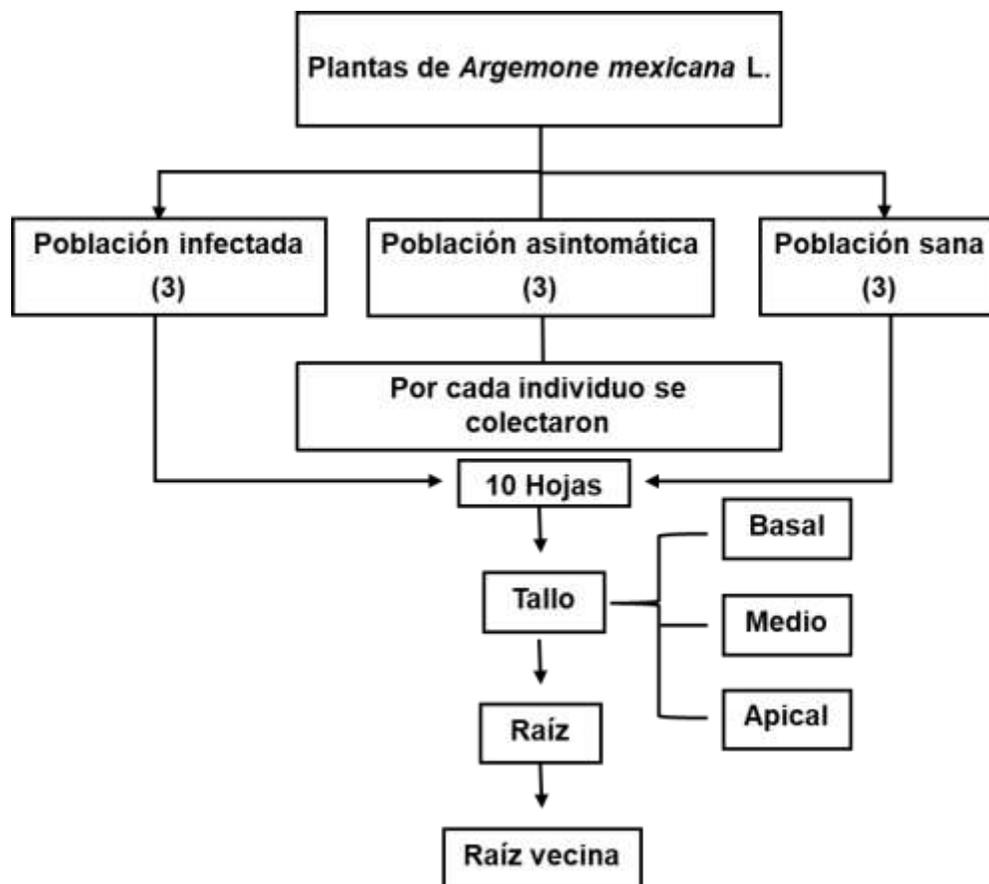


Figura 2.2. Esquema de la colecta de muestras de las plantas analizadas.

2.2. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE ALCALOIDES.

Los tejidos congelados se secaron por liofilización (FreeZone 4.5, 7750020, LABCONCO) y una vez secos, se molieron en un mini molino eléctrico (IKA Tube Mill 100 control) hasta obtener un polvo fino que se almacenó en un ambiente seco hasta su análisis.

2.2.1. Extracción por maceración.

Las extracciones se realizaron con aproximadamente 800 mg de material vegetal por cada 100 mL de metanol grado analítico para macerar por 2 h en agitación a 100 rpm y a temperatura ambiente (Figura A.2.). El sobrenadante se separó por decantación y se tomaron 1600 μ L que se centrifugaron por 20 min a 8,000 rpm y 18°C para eliminar residuos. Alícuotas de 500 μ L de este extracto se pasaron a un tubo de microcentrífuga evaporar a presión reducida en un Centrivap (Heto RU).

2.2.2. Separación por cromatografía en capa fina.

La separación de alcaloides se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) en placas de gel de sílica de 20 x 10 cm (Merck, cat. No. 1.05554.0004) con indicador fluorescente (F254). Para los análisis, los extractos secos se resuspendieron en 100 μ L de MeOH grado HPLC y se tomó 1 μ L para ser aplicado a la placa cromatográfica. Las placas, de 10 cm de altura, se aplicaron 1 cm por arriba del borde inferior, respetando la misma distancia de los bordes laterales y entre cada aplicación.

Como fases móviles se utilizaron dos mezclas de disolventes, previamente establecidas para la separación de alcaloides de *A. mexicana*. El sistema 1 consiste en una mezcla de n-butanol (Sigma-Aldrich 360465):agua:hidróxido de amonio (Fermont 36051) 8:1:1 (v:v:v) y permite la visualización de Be; mientras que el sistema 2 corresponde a una mezcla de ciclohexano:etanol 94:6 (v:v), y permite la visualización de Sa. Las mezclas se prepararon al momento en una campana de extracción, se agregaron a la cámara cromatográfica y=previo a la elución, se permitió un tiempo de saturación de la cámara de 1 min. La elución de la placa cromatográfica se detuvo cuando el frente del disolvente alcanzó 3 cm abajo del borde superior de la placa. Los alcaloides se identificaron comparando los valores de R_f con los estándares disponibles (Be, Que y Sa), así como por los patrones de autofluorescencia. Los perfiles cromatográficos se visualizaron bajo luz UV a 365 nm utilizando una lámpara manual (UVP Chromato-Vue C-75 UV Viewing Cabinet) (Monforte-González *et al.*, 2012).

2.2.3. Análisis cuantitativo de Sa, Be y Que.

La cuantificación de Be, Que y Sa, se llevó a cabo por densitometría *in situ* utilizando el equipo Chromato Scanner 4, CAMAG, Muttenz, Basilea-Campiña, Suiza a una longitud de onda de 330 nm, mediante el método de estándar externo. Las lecturas se hicieron por barrido lineal de cada carril y la concentración de los alcaloides se determinó comparando el área del componente de las muestras contra el área de los componentes obtenidos con concentraciones conocidas de los estándares. Los datos recopilados incluyeron alturas y áreas de los componentes, así como las posiciones de las zonas (inicio, medio y extremo), por cada componente resuelto en cada pista cromatográfica en la placa de CCF. También se aplicó un ajuste de la línea base para que todos los componentes se integraran con precisión. Para las lecturas de los cromatogramas se usó la dirección de escaneo desde el origen hasta el frente del solvente en cada pista. Para cada banda se calcularon el factor de retención (R_f) y el área del componente y se registró el color de la auto

fluorescencia. Posteriormente se correlacionó la concentración de sustancias patrones con el área de las bandas para determinar la intensidad de los componentes de los productos identificados. Se realizaron curvas de calibración para cada uno de los alcaloides por el método de estándar externo. Los parámetros se presentan en la sección de anexos (Cuadro A.1 y Figura A.3)

2.4. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS.

Para el análisis de los datos y la generación de gráficas se utilizó el programa Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (versión 2111) y para el análisis de varianza el software estadístico Minitab 19.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. MODELO DE ESTUDIO 1. CULTIVOS *IN VITRO* DE *A. mexicana* L.

3.1.1. Obtención de la línea celular de AMME a partir de la línea AM1 de *A. mexicana* L. y respuesta morfológica.

Antes de iniciar los tratamientos se observó un crecimiento lento en las suspensiones disponibles (línea AM1). Por ello, se procedió a inducir una nueva suspensión a partir de la línea AM1 de callos a partir de la cual se obtuvo la suspensión (línea AMME). Callos de la línea AM1 se sembraron en medios líquidos y se monitorearon periódicamente. A partir de las 48 hrs; en algunos matraces se observó el desarrollo de una coloración rosa-naranja (Figura 3.1 B). Al grupo de muestras que presentaron cambios de coloración se denominó daño mecánico, estos cambios sugieren la liberación de Sa al medio, dadas las características del alcaloide (Figura A.4.). Por ello, se tomó la decisión de no aplicar los tratamientos de inducción y continuar la observación de los cultivos, teniendo como hipótesis que este fenómeno ocurrió en respuesta a la manipulación realizada de los callos durante las inoculaciones (daño mecánico; anexo 1). Esta respuesta se intensificó gradualmente (Figura 3.1 C y D) y después de 168 hrs. (7 días), se formaron dos grupos de manera espontánea; uno de 20 matraces que se mantuvo y otro con 40 matraces que sí desplegó la respuesta a la manipulación (Figura 3.2). Al término de este periodo, las células se cosecharon, así como los medios residuales (Figura 3.2). Se cosecharon tres muestras al azar, tanto de medios como de las células, de los dos grupos formados. A estos dos grupos se incluyó un segundo testigo que consiste en los callos cosechados al inicio del experimento. Las muestras colectadas se almacenan en un congelador para su posterior liofilización y extracción de alcaloides. Los resultados del análisis por CCF del perfil de alcaloides de los callos en medio líquido se presentan como parte del anexo (Figura A.4 y A.5; Cuadro A.3.). Los cultivos sin daños por la manipulación inicial se mantuvieron en suspensión y se propagaron para dar lugar a una nueva línea AMME, que se utilizó para los experimentos de inducción.



Figura 3.1. Aspecto de los callos en proceso de aclimatación en el medio líquido a las 24 (A), 48 (B), 72 (C) y 96 (D) hrs. después de iniciar el cultivo.

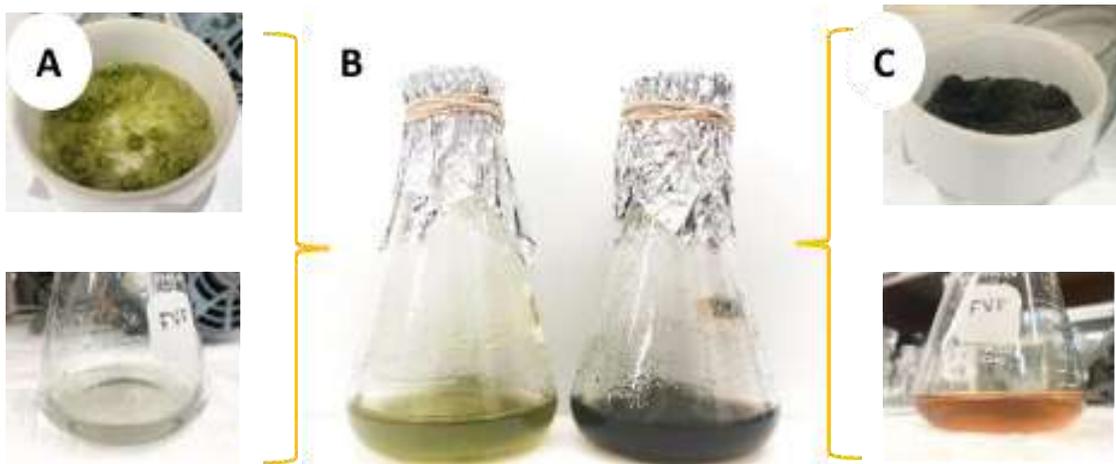


Figura 3.2. Aspecto de los callos de *A. mexicana* L. después de 168 hrs. (7 días) en medio líquido. El grupo DMT (A y B izquierda) se disgregó en una suspensión verde; mientras que el grupo DM (B derecha y C) se oscureció durante el cultivo.

3.1.1. Respuesta morfológica de los tratamientos de inducción de la línea AMME de *A. mexicana* L.

Las inducciones individuales se evaluaron después de 72 y 96 hrs. de exposición. A las 72 hrs. no se observaron cambios notorios en la coloración del medio para ninguno de los tratamientos (Figuras 3.3 y 3.4). Sin embargo, a las 96 hrs. se observó el desarrollo de una coloración para ambos tratamientos, siendo más notables con 100 μ M de MeJA y 200 mg/L de EL, que adquirieron una coloración parda (Figura 3.5 y 3.6), tanto en las células cosechadas como en el medio residual, sugiriendo la producción de saguinarina (Figura 3.7). Cada colecta consistió en cinco muestras que se filtraron, para separar células y medio, y se almacenan en un congelador para su posterior análisis.

Para la inducción secuencial se observó el desarrollo de una coloración en el medio, siendo más notorio al final del tratamiento con 72 hrs. de exposición combinada a MeJA y EL y 96 hrs. en total (Figura 3.9). A lo largo de este tratamiento, los cultivos fueron adquiriendo una coloración parda, sugiriendo la acumulación de Sa (Figura 3.11). La intensidad de la coloración fue mayor en este tipo de tratamiento que en los individuales con cada inductor, sustentado la idea de que el efecto sinérgico de estos agentes potencia la acumulación de metabolitos secundarios (Kaur *et al.*, 2021; Halder *et al.*, 2019).

Además de las respuestas detectadas como cambios de coloración en el medio, se registraron los cambios en la acumulación de peso fresco en los diferentes tratamientos de inducción de la línea AMME. Los resultados se muestran en el Cuadro 3.1 e indican que los tratamientos combinados (MeJA y EL) fueron los que más dañaron a las células expuestas.



Figura 3.3. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 72 hrs. de exposición a una concentración de 100 y 200 µM de MeJA por 72 hrs.



Figura 3.4. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 72 hrs. de exposición a una concentración de 100 y 200 mg/L de EL por 72 hrs.



Figura 3.5. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 96 hrs. de exposición a MeJA a 100 y 200 μM por 96 hrs.



Figura 3.6. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* L. después de 96 hrs. de exposición a EL a 100 y 200 mg/L por 96 hrs.

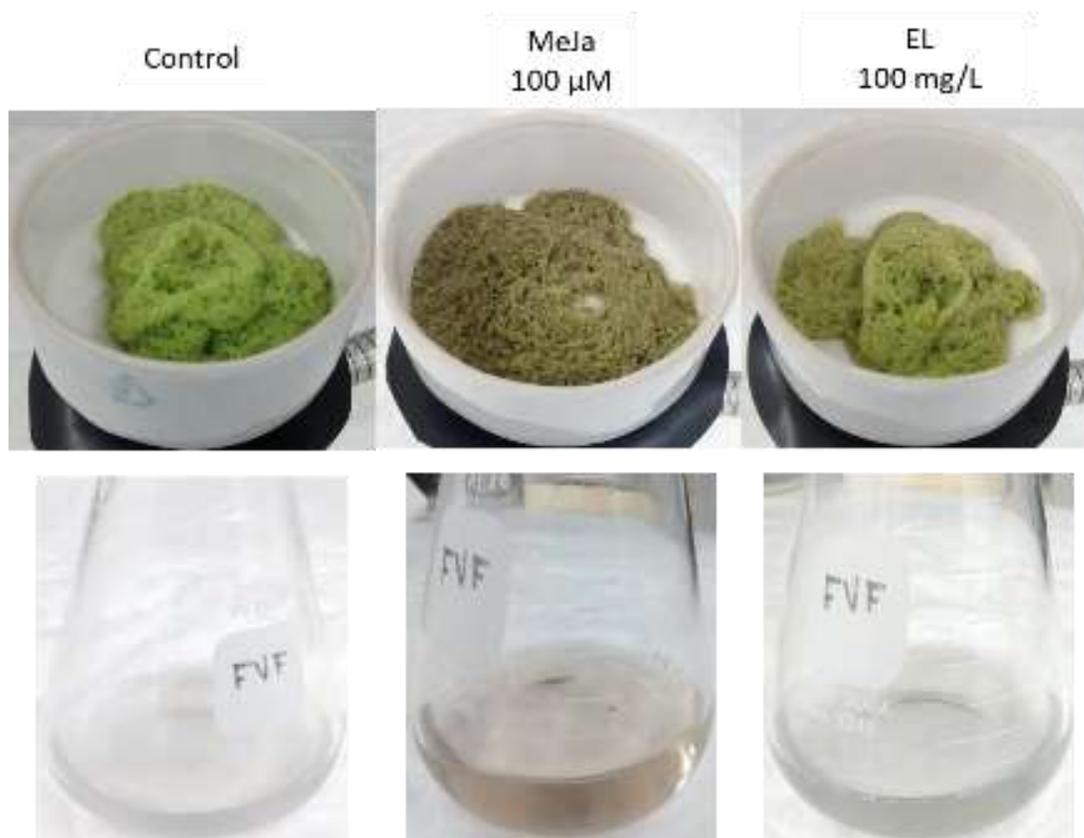


Figura 3.7. Aspecto de las cosechas de callos de la inducción individual. Células filtradas (arriba) y medio de cultivo (abajo) después de 96 hrs. de exposición a 100 μ M de MeJA y 100 mg/L de EL respectivamente.

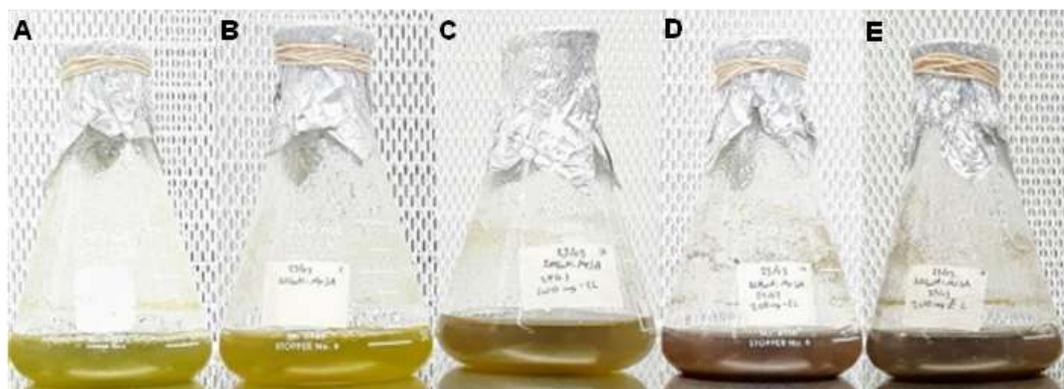


Figura 3.8: Aspecto de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. expuestas a inducción secuencial combinada con MeJA 200 μ M y EL 200 mg/L. A: Suspensiones celulares con 5 días de crecimiento (tiempo 0); B: a las 24 hrs. de exposición a MeJA (momento de la aplicación de EL); C: a las 24 hrs. de exposición combinada; D: a las 48 hrs. de exposición combinada; E: a las 72 hrs. de exposición combinada. B, C, D y E, corresponden a cultivos con 24, 48, 72 y 96 hrs. totales de tratamiento puesto que las primeras 24 hrs. fueron expuestas a únicamente a MeJA.

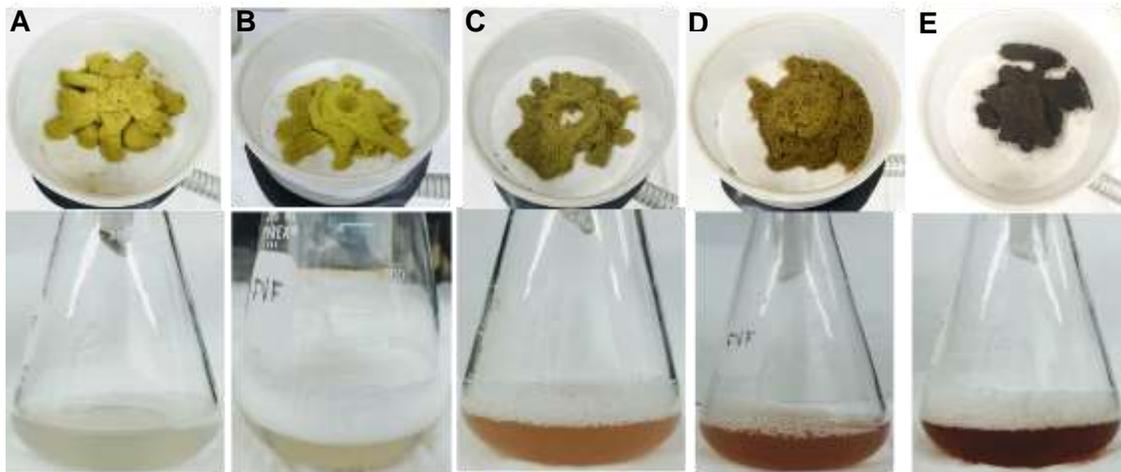


Figura 3.9: Aspecto de las cosechas de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. a inducción secuencial con MeJA y EL; paneles superiores e inferiores muestran las células y medios de cultivo colectados cada 24 hrs. A: suspensiones celulares de 5 días de crecimiento (tiempo 0). B, C, D y E, corresponden a las inducciones con MeJA y EL, como en la Figura 3.8.

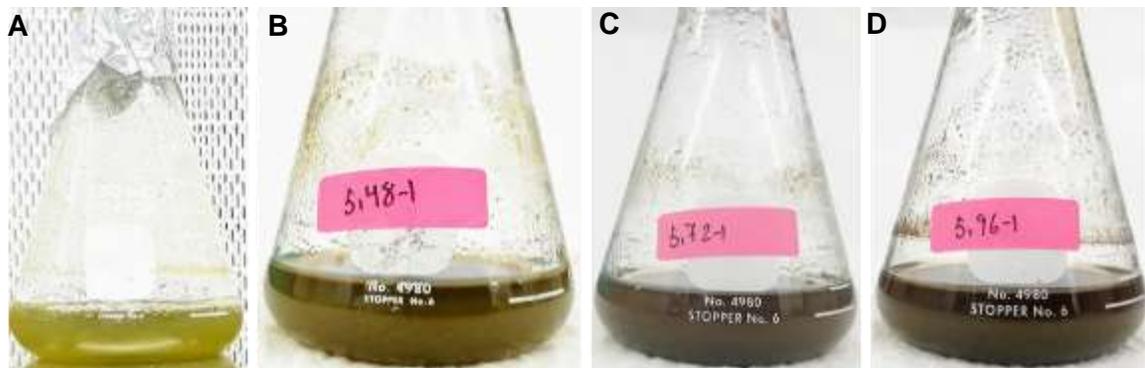


Figura 3.10: Aspecto de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. expuestas a inducción simultánea a 200 μ M de MeJA y 200 mg/L de EL. A: Suspensiones a los 5 días de crecimiento (tiempo 0); B; C y D a las 48, 72 y 96 hrs. de exposición a ambos inductores.

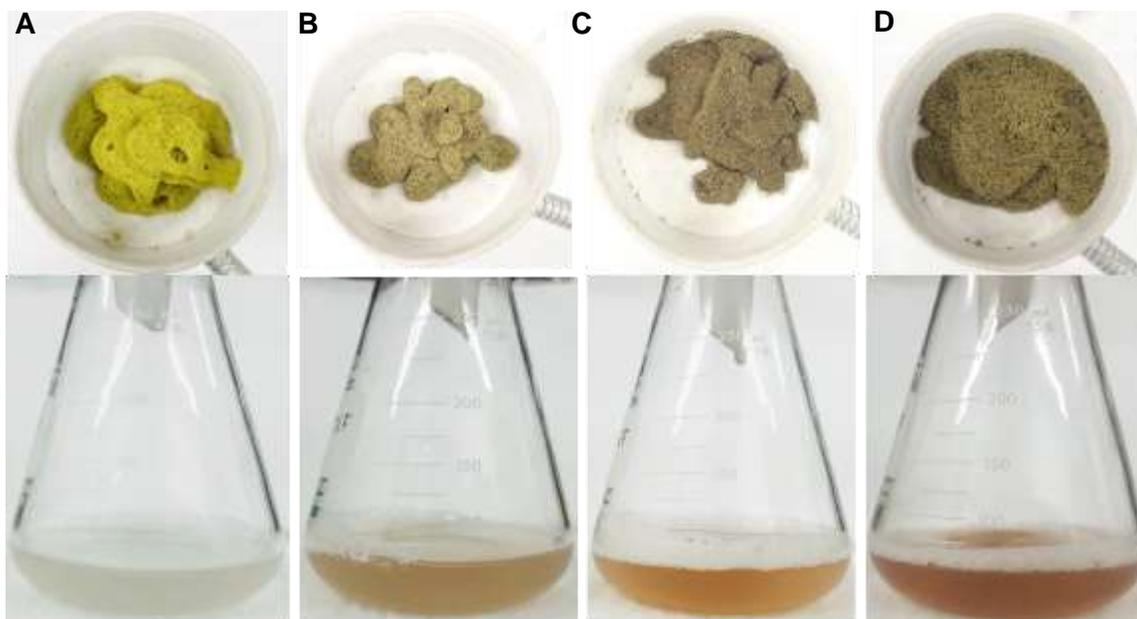


Figura 3.11: Aspecto de las cosechadas de las suspensiones celulares de *A. mexicana* L. expuestas a inducción simultánea a 200 μ M de MeJA y 200 mg/L de EL. A: Suspensiones a los 5 días de crecimiento (tiempo 0); B; C y D, suspensiones a las 48, 72 y 96 hrs. de exposición a ambos inductores. Paneles superiores e inferiores muestran las células filtradas y medios, respectivamente.

Cuadro 3.1. Crecimiento acumulado (g PF) en la línea AMME durante los tratamientos de inducción.

Inducción	Tratamiento	Tiempo de exposición (hrs.)				
		0	24	48	72	96
Individual	Ctl	7 \pm 0.1			9 \pm 0.2	10 \pm 0.2
	MeJA (100/200 μ M)				8.5 \pm 0.2	8 \pm 0.3
	EL (100/200 mg/L)				8.5 \pm 0.2	8 \pm 0.2
Secuencial	Ctl	7 \pm 0.1	7.5 \pm 0.2	8 \pm 0.35	9 \pm 0.3	10 \pm 0.3
	MeJA + EL Secuencial		7.5 \pm 0.2	8 \pm 0.3	8.5 \pm 0.35	8 \pm 0.38
Simultánea	Ctl	6.9371 \pm 0.85		8.1846 \pm 1.66	9.3712 \pm 1.45	15.0244 \pm 3.6
	MeJA + EL Simultáneo			8.8870 \pm 1.5	8.9244 \pm 1.40	7.2615 \pm 0.76

Promedio de 3 repeticiones con desviación estándar

3.1.2. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) del perfil de alcaloides de los tratamientos de inducción de la línea AMME de *A. mexicana* L.

Los tratamientos con (MeJA 100 y 200 μ M y EL 100 mg/L y 200 mg/L), aplicados de manera individual, no aumentaron la intensidad de la señal correspondientes, en las diferentes dosis y tiempos en que se ensayaron, la Sa se pudo detectar al inicio del experimento y en los controles a las 72 hrs. (Figura 3.12: carriles 1 y 2), no pudiéndose detectar a las 96 hrs. (Figura 3.13; carril 7), pero Sa se observó de manera más prominente en los tratamientos con de 200 μ M de MeJA y 200 mg/L de EL (Figura 3.12). El análisis de estas muestras en el sistema 1 de disolventes no mostró la presencia de Be, en ninguna de las muestras incluidas (Figura 3.13). Esto coincide con lo referido en la literatura sobre los cultivos *in vitro* de *Argemone* en los que no se ha podido detectar este alcaloide de manera consistente (Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

Los tratamientos de inducción secuencial tuvieron un efecto positivo en la producción de Sa a partir de las 48 hrs. totales de exposición (equivalentes a 24 hrs. de exposición combinada de MeJA y EL). En las muestras colectadas a las 72 y 96 hrs. de exposición total (equivalentes a 48 y 72 hrs. de exposición a ambos agentes) se logró observar la intensificación de la banda característica correspondiente a Sa, con una tonalidad naranja-rojizo, en comparación con los testigos (Figura 3.14). De igual forma se logró visualizar la presencia de una mancha con tonalidad amarillo brillante en la parte superior (frente del disolvente), correspondiente a la dihidrosanguinarina, que es un precursor biosintético y una forma menos tóxica de Sa, se comparó el patrón de fluorescencia presentado y el valor Rf (Guízar-González, *et al.*, 2012), mientras que no se logró detectar en ninguna de las muestras (Figura 3.14).

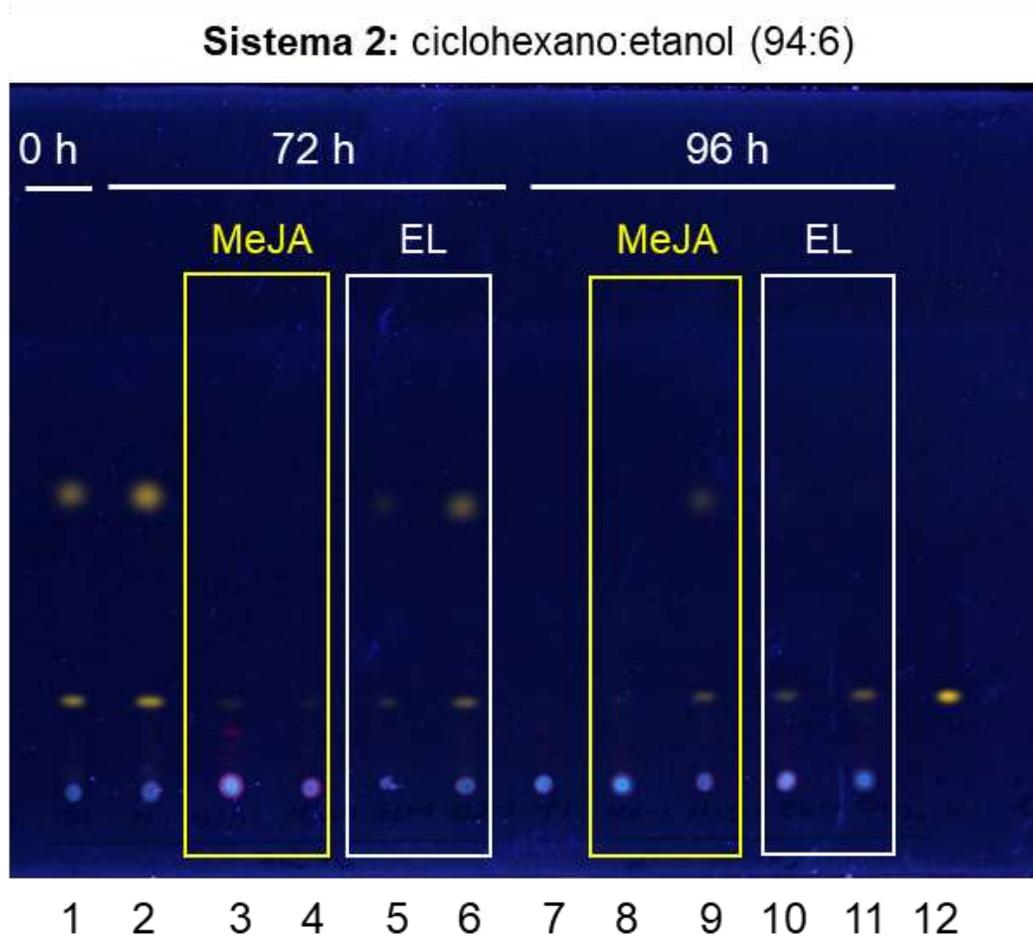


Figura 3.12: Detección de Sa, en la línea AMME expuesta a los inductores individuales. Carril 1, 0 hrs. de exposición; 2-6, 72 hrs. y 7-11, 96 hrs. de cultivo. Carril 2) control 72 hrs; 3-4) MeJA 100 y 200 μ M; 5-6) EL 100 y 200 mg/L, a las 72 hrs. de exposición; 7) control 96 hrs; 8-9) MeJA 100 y 200 μ M; 10-11) EL 100 y 200 mg/L, a las 96 hrs; 12) estándar de Sa. Los recuadros amarillos y blancos señalan los tratamientos con MeJA y EL a los diferentes tiempos de exposición.

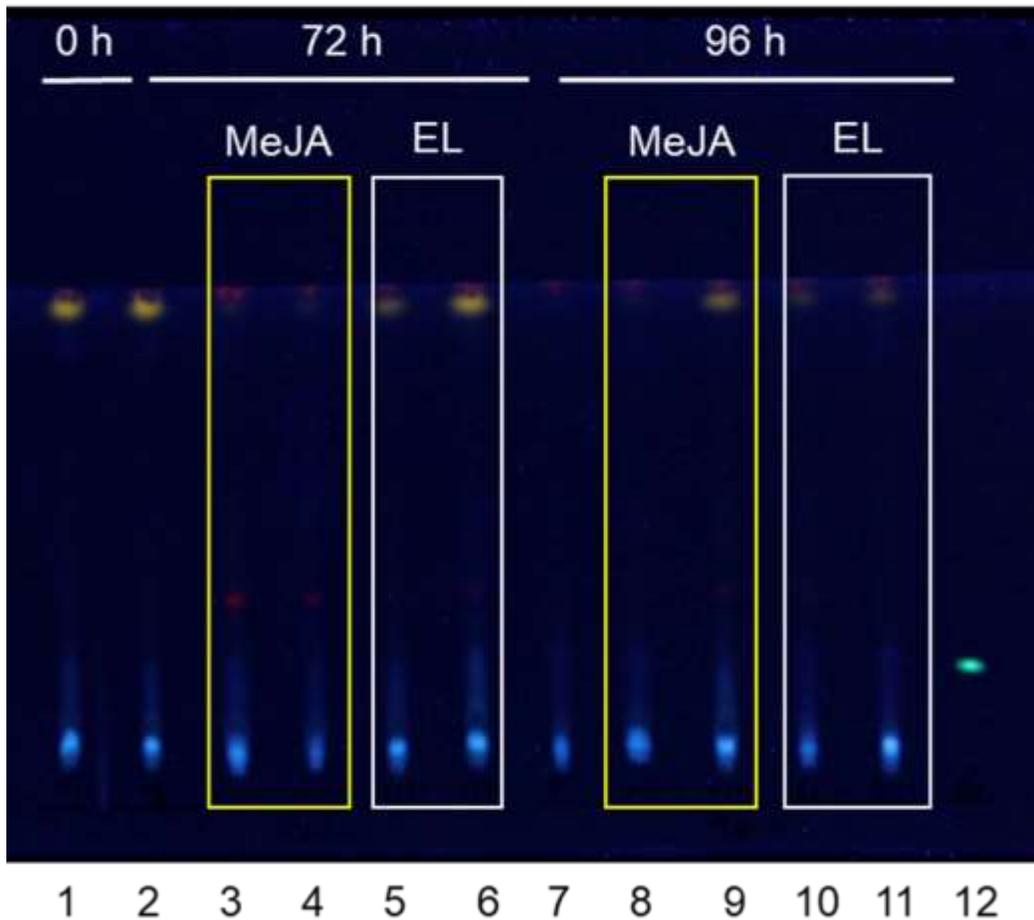
Sistema 1: n-butanol:agua:hidróxido de amonio (8:1:1)

Figura 3.13: Detección de Be, en la línea AMME expuesta a los inductores individuales. Carril 1, 0 hrs. de exposición; 2-6, 72 hrs. y 7-11, 96 hrs. de cultivo. Carril 2) control 72 hrs; 3-4) MeJA 100 y 200 μM ; 5-6) EL 100 y 200 mg/L, a las 72 hrs. de exposición; 7) control 96 hrs; 8-9) MeJA 100 y 200 μM ; 10-11) EL 100 y 200 mg/L, a las 96 hrs; 12) estándar de Be. Los recuadros amarillos y blancos señalan los tratamientos con MeJA y EL a los diferentes tiempos.

Sistema 2: ciclohexano:etanol (94:6)

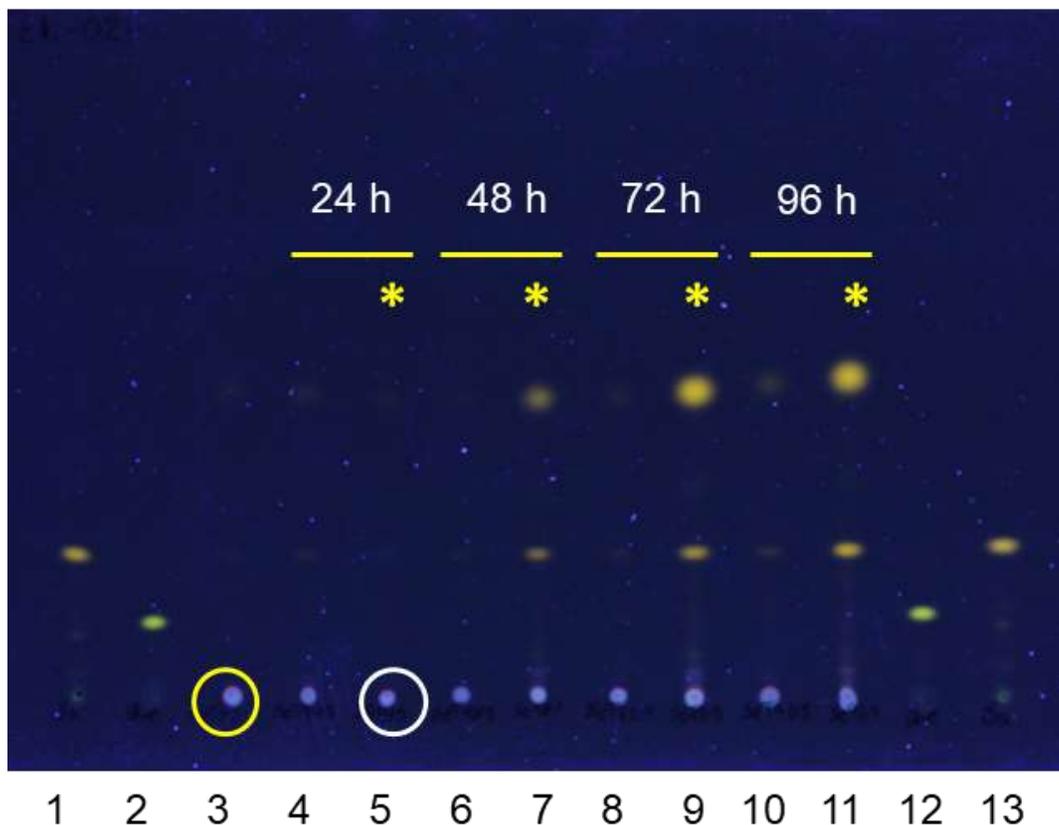


Figura 3.14. Detección de Sa y Que en la línea AMME expuesta a la inducción secuencial. Carriles 1-2) estándares de Sa y Que; 3) cultivos a las 0 hrs. (control T_0 ; momento de la aplicación de MeJA $200 \mu\text{M}$ - círculo amarillo); 4-5) cultivos control y expuestos a las 24 hrs. (24 hrs. a MeJA y momento de aplicación de EL - círculo blanco); 6-7) cultivos control y expuestos a las 48 hrs. (48 hrs. a MeJA y 24 hrs. a EL); 8-9) cultivos control y expuestos a las 72 hrs. (72 hrs. a MeJA y 48 hrs. a EL); 10-11) cultivos control y expuestos a las 96 hrs. (96 hrs. a MeJA y 48 hrs. a EL); 12-13) estándares de Que y Sa. Los círculos amarillo y blanco indican los momentos de aplicación de MeJA y EL, respectivamente, mientras que los asteriscos señalan los carriles correspondientes a los tratamientos de cada tiempo (controles sin marca).

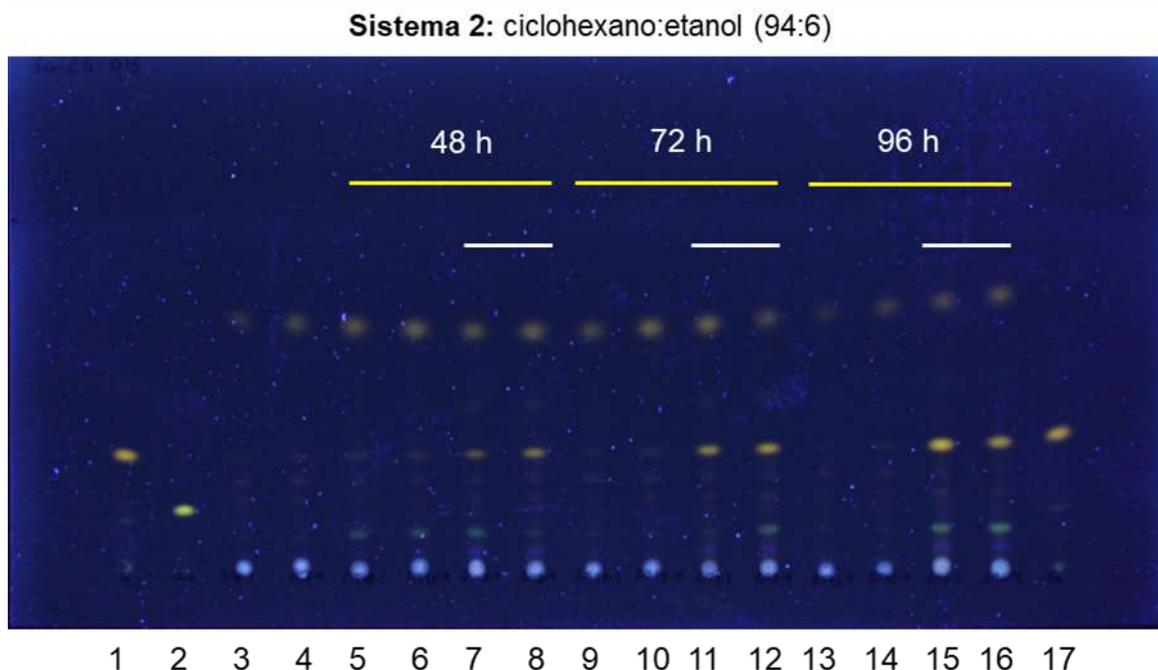


Figura 3.15: Detección de Sa y Que en la línea AMME expuesta a la inducción simultánea. Carriles 1-2) estándares de Sa y Que; 3-4) cultivos iniciales (T_0); 5-6) cultivos control 48 hrs; 7-8) cultivos expuestos 48 hrs; 9-10) cultivos control 72 hrs; 11-12) cultivos expuestos 72 hrs; 13-14) cultivos control 96 hrs; 15-16) cultivos expuestos 96 hrs; 17) estándar Sa. Las líneas amarillas indican los diferentes tiempos de tratamiento; mientras que las líneas blancas señalan los cultivos expuestos a los inductores (controles sin marca).

La inducción simultánea de la línea AMME también resultó en un incremento en la acumulación de Sa a partir de las 48 hrs. los niveles de acumulación de Sa aumentaron sucesivamente hasta las 96 hrs. en donde se observa la mancha característica de Sa (naranja-rojizo) mientras que los niveles encontrados de Que variaron, e incluso en algunas muestras estuvo ausente. El cromatograma reveló que los niveles de Que se encontraban por debajo del límite de cuantificación y no se pudo detectar en todas las muestras. Debido a estas inconsistencias, no se pudo realizar la cuantificación de este alcaloide. El perfil obtenido de la inducción simultánea presentó una mayor variación en el contenido de alcaloides minoritarios, que se pueden visualizar de manera tenue. No obstante, conforme transcurre el tiempo de monitoreo los niveles aumentaron progresivamente.

De esta manera, solamente en los tratamientos con una combinación de inductores, sea de manera secuencial o simultánea, se logró una respuesta positiva en la acumulación de alcaloides y, aparentemente ésta se limitó a Sa, ya que no se pudo observar la acumulación de Be. Así mismo, la inducción simultánea ocasionó una mayor acumulación de Sa de acuerdo con los perfiles obtenidos por TLC. En este tratamiento también, se logró visualizar un perfil más variado

en el que se detectaron alcaloides minoritarios, entre ellos Que, aunque de manera muy tenue. Los cromatogramas densitométricos indicaron que este alcaloide no se encontró en todas las muestras, por lo que estos datos no se incluyeron en el análisis. Es de notar que no se lograron visualizar en los perfiles de la inducción secuencial e individual.

3.1.3. Análisis del contenido de Sa de los tratamientos de inducción de los cultivos *in vitro* de la línea AMME de *A. mexicana* L.

Debido a que no se detectó la presencia de Be ni de Que, se monitoreó únicamente el contenido de Sa por CCF y las cuantificaciones se realizaron por densitometría. Para la inducción individual, se ensayaron dos concentraciones diferentes por cada inductor y en total se obtuvieron 4 tratamientos y 1 grupo control: **MJ1**: MeJA a 100 μ M, **MJ2**: MeJA a 200 μ M, **EL1**: EL 100 mg/L, **EL2**: EL 200 mg/L, **IT**: grupo control; de acuerdo con los resultados obtenidos sobre la concentración de la acumulación de alcaloides por cada tratamiento se observó que la mayor acumulación de Sa ocurrió a las 72 hrs. en todos los tratamientos siendo la inducción con EL la que presentó mayores niveles de Sa (**EL (200 mg/L)**: 0.114, **EL (100 mg/L)**: 0.093), seguido de la concentración más alta de MeJA (**MJ (200 μ M)**: 0.052) de manera general se observó que las concentraciones de 200 μ M para MeJA y 200 mg/L para EL fueron los que presentaron los niveles más altos de la acumulación de Sa por cada inductor, así mismo estas dosis fueron seleccionadas para las inducciones secuencial y simultánea, también se observó que las muestras colectadas a las 96 hrs. mostraron una decaída de la concentración de Sa (Figura 3.16).

En la inducción secuencial que consistió en la aplicación de MeJA a 200 μ M y se incubó por 24 hrs. para después añadir EL a 200 mg/L, se observó un incremento en la acumulación de Sa a partir de las 48 hrs. Mientras que a las 72 hrs. se encontraron los niveles más altos (Cuadro 3.3.2 y Figura 3.17). En la inducción simultánea se observó un incremento en la acumulación de Sa después de aplicar los inductores, obteniendo la mayor acumulación a las 96 hrs. después de la inducción (Figura 3.18).

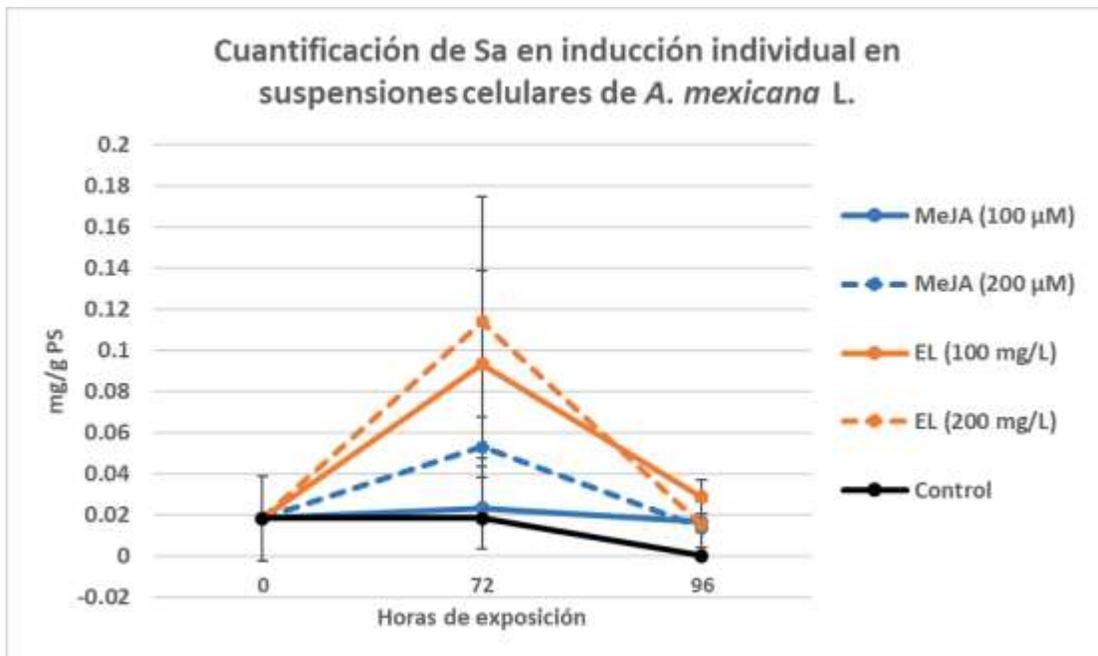


Figura 3.16. Contenido de Sa en los tratamientos de inducción individual de suspensiones celulares de la línea AMME de *A. mexicana* L. Promedio de triplicados con desviación estándar.

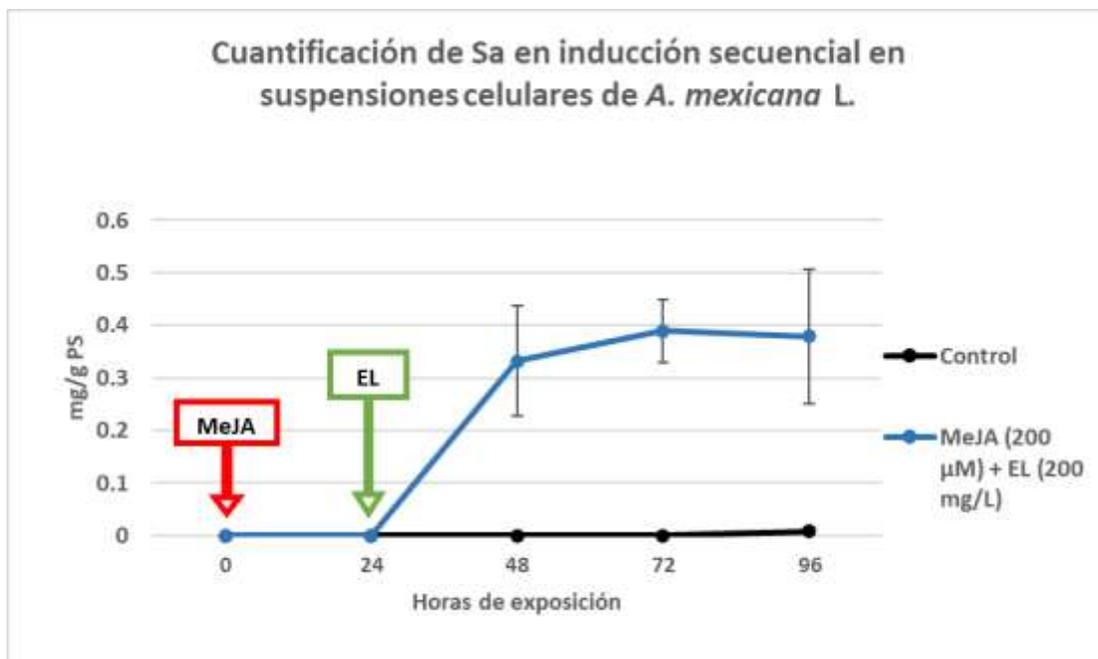


Figura 3.17: Contenido de Sa en los tratamientos de inducción secuencial de suspensiones celulares de la línea AM1 de *A. mexicana* L. Promedio de triplicados con desviación estándar.

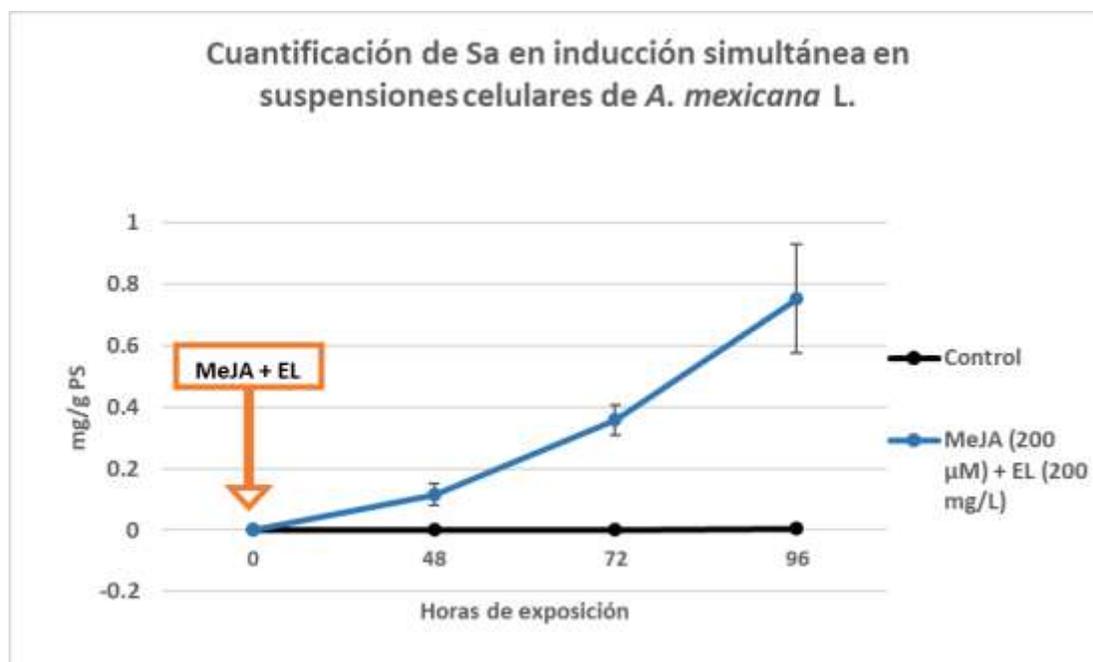


Figura 3.18: Contenido de Sa en los tratamientos de inducción simultánea de suspensiones celulares de la línea AM1 de *A. mexicana* L. Promedio de triplicados con desviación estándar.

3.2. MODELO DE ESTUDIO 2. ANÁLISIS DE PLANTAS SILVESTRES DE *A. mexicana* L.

3.2.1. Caracterización morfológica de las colectas de las planta silvestres de *A. mexicana* L.

Se colectaron plantas provenientes de las tres poblaciones de acuerdo con la presencia o ausencia de síntomas de infección. Las *plantas infectadas* presentaban síntomas visibles de infección fúngica; *plantas asintomáticas*, provenientes de la misma población que las plantas infectadas, pero sin síntomas visibles; y *plantas sanas*, provenientes de una población distinta de la anterior y sin plantas con síntomas visibles de infección. Estos criterios están basados en la observación de síntomas de enfermedades en plantas vasculares que definen a una **planta infectada** como aquella que presenta disturbios visibles causados por el patógeno al invadir tejidos u órganos en la planta hospedera (manchas foliares, necrosis, marchitez vascular, amarillamiento, etc.): **la población asintomática** se conforma por plantas sin estos cambios morfológicos, o bien, cuando la infección está presente sin desarrollo evidente. Esto implica que una planta infectada pueda ser difícil de detectar y, por lo tanto, pueda ser una hospedera que actúa como reservorio, siendo una fuente de contaminación para los individuos circundantes. Además, como se mencionó anteriormente la población infectada y asintomática compartía la

misma zona de localización mientras que la población sana se localizó en una zona diferente en donde se encontraron plantas sanas libres de patógenos por lo tanto con un desarrollo normal (Kolander *et al.*, 2012; Sankaran *et al.*, 2011).

Las plantas colectadas tenían entre 40 y 60 cm de altura, con flores y frutos maduros (edad aproximada de entre 2 y 3 meses), se colectaron entre los meses de febrero y marzo de 2021 (Figura 3.19 A y B). Se colectaron tres individuos de cada población y, de cada individuo, se colectaron muestras de hoja, tallo y raíz. Los tallos se seccionaron en tres partes de acuerdo con su posición (apical, medio y basal). Para el caso de las raíces, se colectaron las raíces de los individuos vecinos a las plantas infectadas con el fin de tener el número de repeticiones requeridas (Figura 3.20).



Figura 3.19. Aspecto de las plantas de *A. mexicana* L., sanas (A) e infectadas (B) utilizadas en este trabajo. Los círculos rojo y amarillo en B señalan las hojas colectadas (círculo rojo) y con síntomas severos (no colectadas – círculo amarillo).

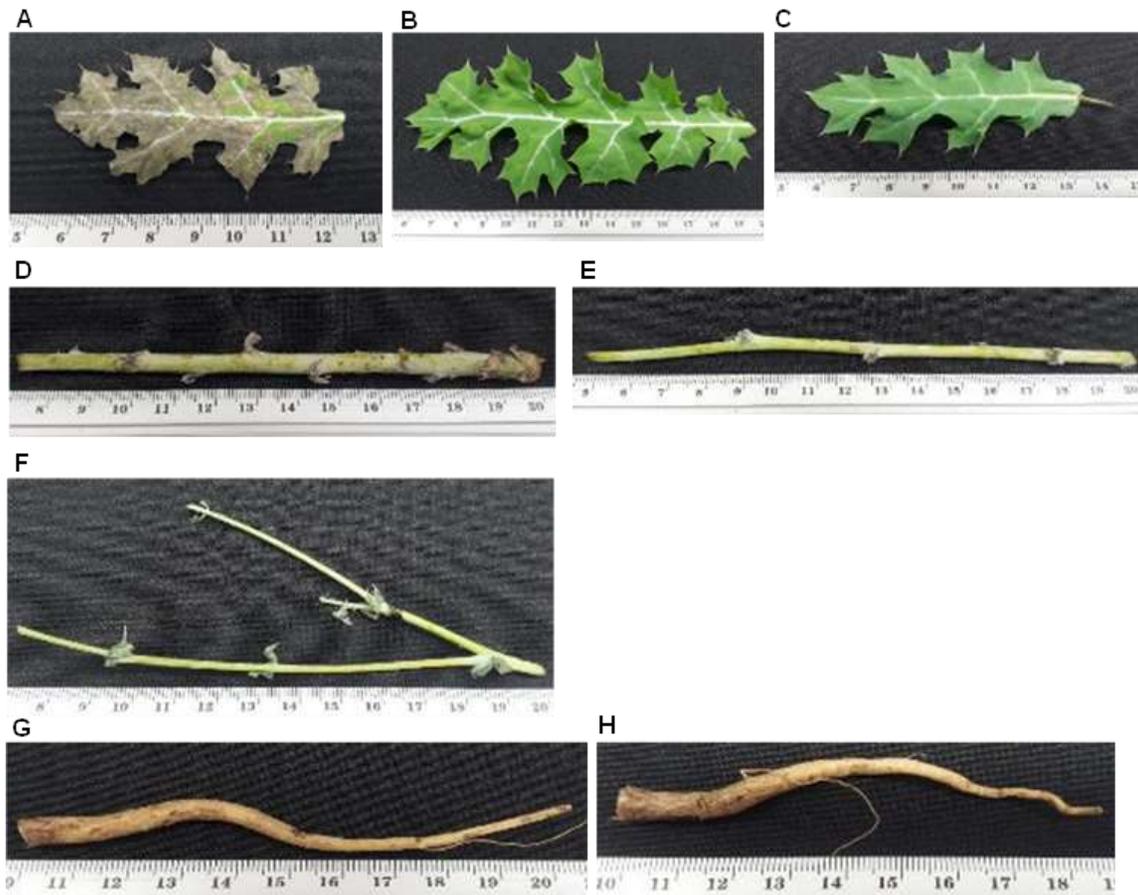


Figura 3.20. Órganos de *A. mexicana* L. colectados de las poblaciones de plantas (infectadas, asintomáticas y sanas). A, B, C: hojas infectadas, asintomáticas y sanas, respectivamente; D, E, F: secciones de tallo basal, medio y apical, respectivamente; G y H raíces de plantas de los individuos infectados y vecinos a éstos, respectivamente.

3.2.2. Aislamiento de los patógenos identificados en las hojas de *A. mexicana* L.

Para las identificaciones de los hongos de las plantas infectadas, se colectaron hojas con síntomas (Figura 3.21) que se incubaron en una cámara húmeda para el posterior aislamiento de hongos, *A. mexicana* es susceptible a los hongos *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Ulocladium atrum*, *U. botrytis*, *Phoma humicola*, *Aspergillus niger* y *Curvularia ellisii* entre otros (Devanathan K, 2020; Bosch, CH, 2007; Holm *et al.*, 1977; Abdel-Hafez, 1985). No obstante, los hongos identificados como posibles agentes causales de la infección fueron: *Lasiodiplodia theobromae*, *Neopestalotiopsis clavispora*, *Cladosporium cladosporoides*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani*—(comunicación personal de Hernández-Eleria G.) (Figura 3.22).



Figura 3.21: Presencia de síntomas, como manchas foliares, necrosis y amarillamiento ocasionados por patógenos en hojas de *A. mexicana* L.

3.2.3. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) del perfil de alcaloides en plantas silvestres de *A. mexicana* L.

Se realizó una CCF para la separación de alcaloides en plantas de *A. mexicana* extraídas de las poblaciones infectada, asintomática y sana utilizando los dos sistemas de disolventes previamente descritos. Al visualizar los perfiles cromatográficos bajo luz UV a 365 nm, utilizando una lámpara manual, se observó cómo una mancha de coloración verde azulada con Rf de 0.26 (sistema 1) y Sa como una mancha de color naranja rojizo, con un Rf de 0.21 (sistema 2).

La Figura 3.23 muestra el perfil cromatográfico obtenido con el sistema 1, para el monitoreo de Be, a partir de una planta de *A. mexicana* infectada. Se observa la presencia de Be en hojas, tallo y raíces, con diferentes grados de intensidades, siendo los tallos y raíces los que muestran las bandas de mayor intensidad. Así mismo, es posible visualizar una banda con una coloración similar (verde tierno) a Be (verde azulado) en hojas, pero con un valor de Rf de 0.18, así como una acumulación de otros metabolitos secundarios en la parte superior (frente del disolvente). Éstos se resuelven mejor con el sistema 2 (Figura 3.24). Tanto Sa como Que se pudieron observar en hojas, tallo y raíces. Del mismo modo, es posible notar la presencia de otras bandas que no han sido identificadas, pero que pueden diferenciarse de acuerdo con la fluorescencia presentada bajo UV a 365 nm y su valor Rf.

La Figura 3.25 presenta los perfiles obtenidos integrando ambos sistemas, por lo que engloban los alcaloides de baja, mediana y alta polaridad. Esto permite observar un perfil más variado y colorido de cada una de las muestras de la población infectada, así como los estándares utilizados de referencia.

La presencia de Sa en los tejidos aéreos de las plantas infectadas es interesante, ya que este alcaloide no se encuentra de manera consistente en dichos tejidos, en las plantas maduras (Vázquez-Flota *et al.*, 2018; Xool-Tamayo *et al.*, 2017).

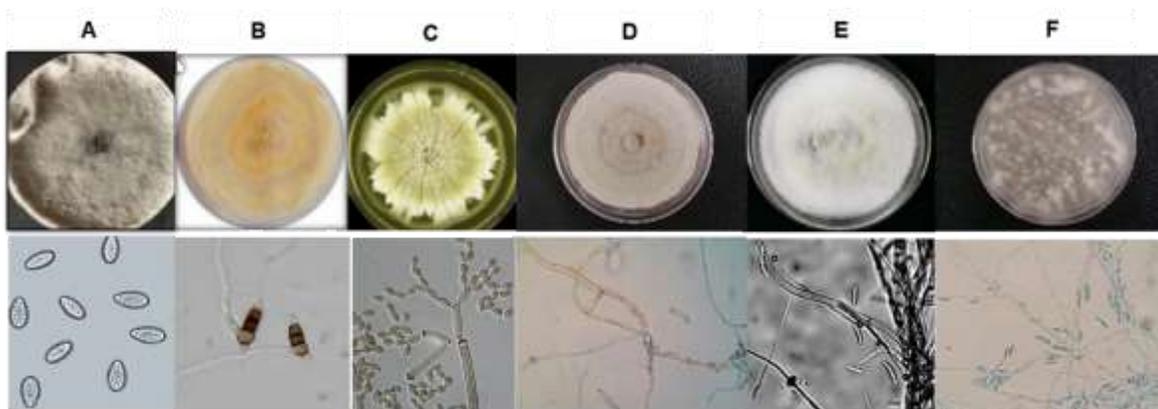


Figura 3.22: Cultivos de los hongos aislados de hojas de *A. mexicana* L. A: *Lasiodiplodia theobromae*. B: *Neopestalotiopsis clavispora*. C: *Cladosporium cladosporoides*. D: *Corynespora cassiicola*. E: *Fusarium equiseti*. F: *Fusarium solani*. Cortesía de Hernández-Eleria G.

En comparación con las plantas infectadas, las plantas de la población asintomática mostraron una menor intensidad en las bandas correspondientes a Sa, Be y Que, así como para los demás productos desconocidos (Figura 3.26). Algo similar se observó en plantas de la población sana, ya que las intensidades correspondientes a Be, Sa y Que fueron menos notables (Figura 3.27), excepto en las raíces que representan el principal sitio de acumulación de este alcaloide en plantas maduras (Vázquez-Flota *et al.*, 2018; Xool-Tamayo *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos de acuerdo con el perfil de cada población nos muestran que en condiciones de infección Sa se encuentra presente en todas las muestras a pesar de que estas provienen de plantas adultas y en las muestras de población sana solo es posible detectarla en la raíz. Este dato resulta muy interesante, además de que coincide con lo reportado en la literatura puesto que Sa únicamente es posible encontrarla en la raíz y semillas cuando se trata de plantas adultas, mientras que Be se encuentra presente en todos los órganos.

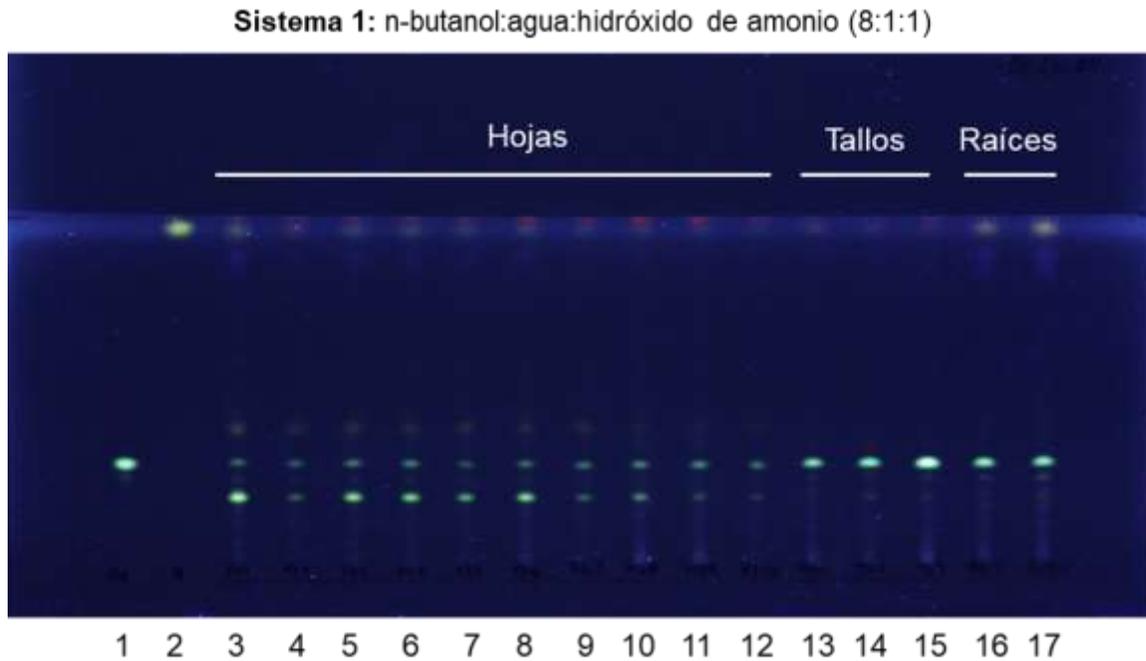


Figura 3.23. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema 1 (n-butanol: agua: hidróxido de amonio (8:1:1)) de plantas infectadas de *A. mexicana* L. Carriles 1-2) estándares de Be y Que; 3-12) hojas; 13-15) secciones de tallo basal, medio, y apical; 146-157) raíces de la planta infectada y de una planta vecina, con síntomas de infección. Todas las hojas y tallos provienen de un mismo individuo. Las raíces son de diferentes plantas, ambas con síntomas de infección.

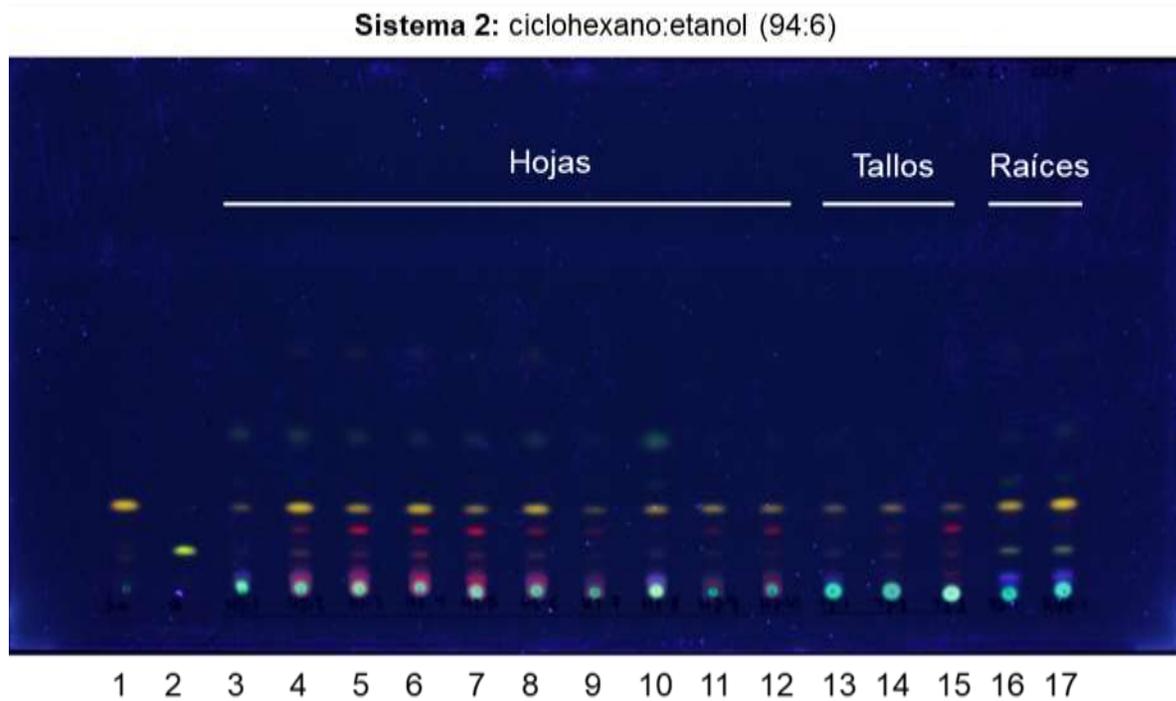


Figura 3.24. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema 2 (ciclohexano:etanol (94:6)) de plantas infectadas de *A. mexicana* L. Carriles 1-2) estándares de Sa y Que; 3-12) hojas; 13-15) secciones de tallo basal, medio, y apical; 16-17) raíces de la planta infectada y de una planta vecina, con síntomas de infección. Todas las hojas y tallos provienen de un mismo individuo. Las raíces son de diferentes plantas, ambas con síntomas de infección.

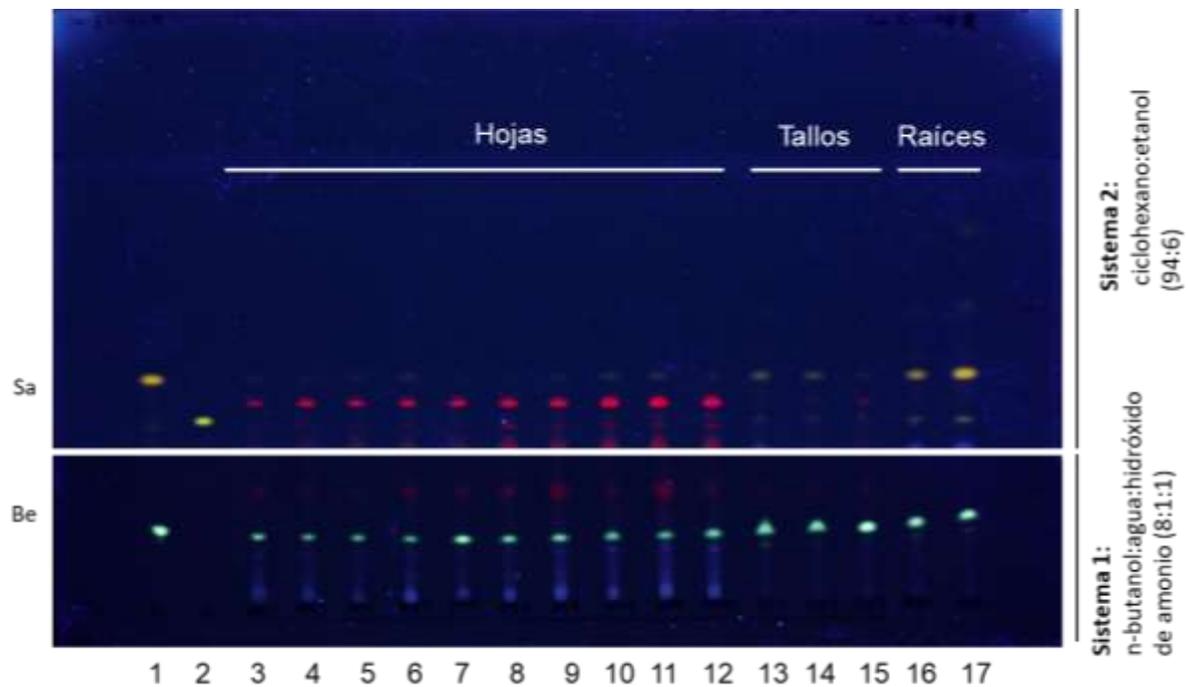


Figura 3.25. Combinación de los perfiles cromatográficos obtenidos con los sistemas 1 (panel inferior) y 2 (panel superior) de plantas infectadas de *A. mexicana* L. Carriles 1-2) estándares de Be, Sa y Que; 3-12) hojas; 13-15) secciones de tallo basal, medio, y apical; 16-17) raíces de la planta infectada y de una planta vecina, con síntomas de infección. Todas las hojas y tallos provienen de un mismo individuo. Las raíces son de diferentes plantas, ambas con síntomas de infección. La descripción de las bandas detectadas se presenta en la Tabla 3.2.

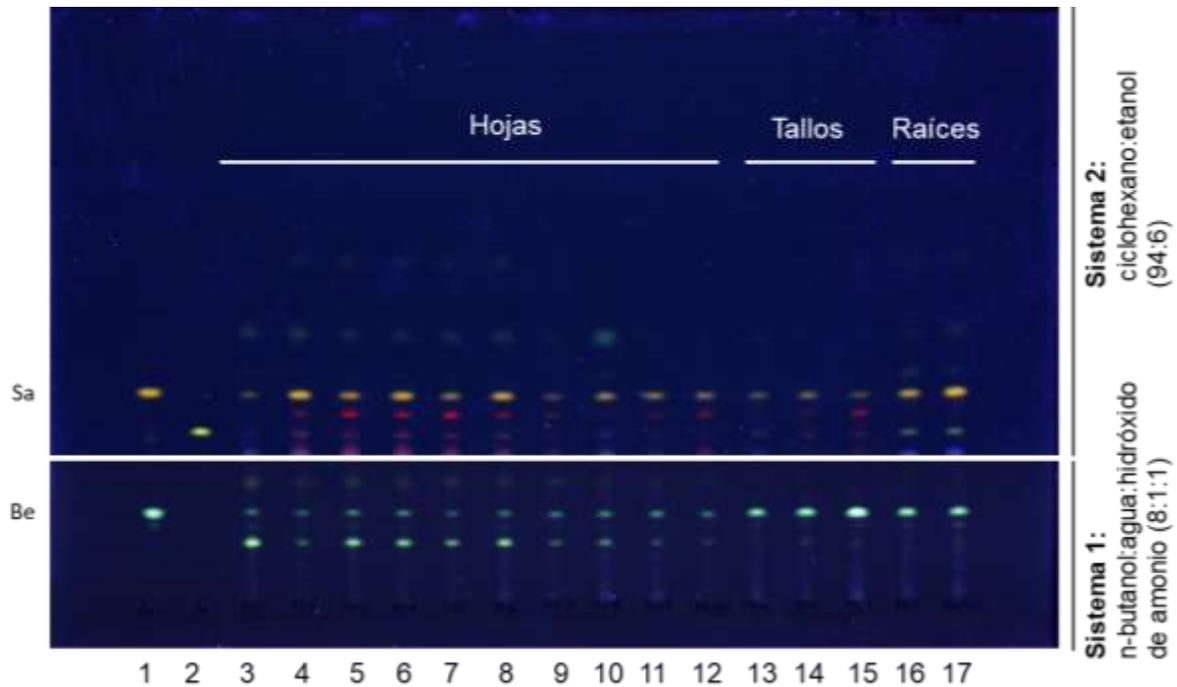


Figura 3.26: Combinación de los perfiles cromatográficos obtenidos con los sistemas 1 (panel inferior) y 2 (panel superior) de plantas asintomáticas de *A. mexicana* L. Carriles 1-2) estándares de Be, Sa y Que; 3-12) hojas; 13-15) secciones de tallo basal, medio, y apical; 16-17) raíces de dos plantas adyacentes, sin síntomas de infección. Todas las hojas y tallos provienen de un mismo individuo. Las raíces son de diferentes plantas, ambas sin síntomas de infección.

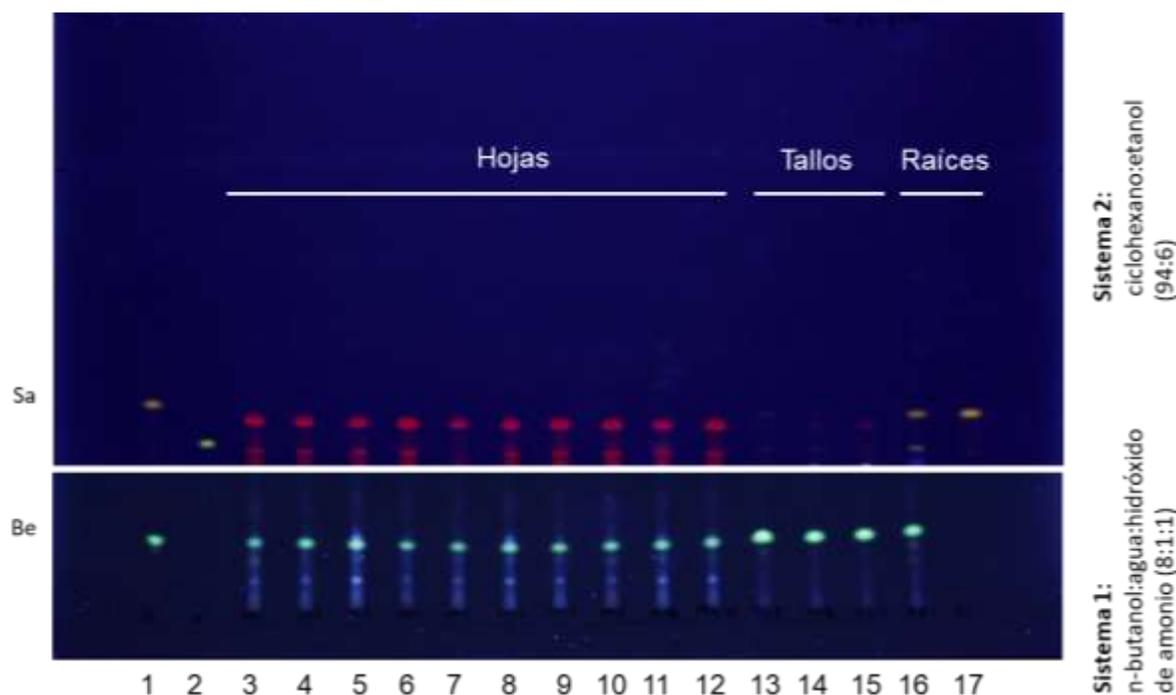


Figura 3.27: Combinación de los perfiles cromatográficos obtenidos con los sistemas 1 (panel inferior) y 2 (panel superior) el de plantas sanas de *A. mexicana* L. Carriles 1-2 estándares de Be, Sa y Que; 3-12) hojas; 13-15) secciones de tallo basal, medio, y apical; 16-17) raíces sin síntomas de infección y de una población distante de las poblaciones con plantas infectadas. Todas las hojas y tallos provienen de un mismo individuo. Las raíces son de diferentes plantas, ambas con síntomas de infección.

3.2.3.1. Comparación de los perfiles de alcaloides de plantas silvestres de *A. mexicana* L. obtenidos por cromatografía en capa fina (CCF).

Con el fin de comparar de manera precisa las variaciones en la composición de alcaloides entre las diferentes poblaciones de plantas, se analizaron por densitometría *in situ* las placas cromatográficas mediante un barrido, que muestran una serie de componentes, correspondientes a los diferentes productos separados en la CCF (Figura 2.6). El densitómetro se puede ajustar para un rendimiento óptimo ya que cada placa se comporta de manera diferente, es decir, al realizar las aplicaciones de manera manual puede presentar ciertas variaciones por lo que se requiere mucha exactitud (Chaita *et al.*, 2017; Reich y Schibli., 2006).

Para la asignación de identidades a los alcaloides detectados, se utilizaron los tres estándares disponibles, mientras que para el resto se registraron valores R_f , así como sus propiedades fluorescentes. Estos productos se enumeraron de acuerdo con el orden de elución en los dos sistemas utilizados, basados en las diferencias de polaridades. El sistema de disolventes 1, que

resuelve mejor los alcaloides polares, logró separar siete alcaloides entre ellos Be. Por su parte, el sistema 2 logró separar ocho alcaloides, entre ellos Sa y Que. El Cuadro 3.2 enlista los alcaloides separados a partir de los tejidos de las poblaciones infectada, asintomática y sana de *A. mexicana*. La figura 3.28 es un ejemplo de un cromatograma obtenido de un individuo de la población infectada, en donde se indica la asignación de componentes de acuerdo con su orden de elución.

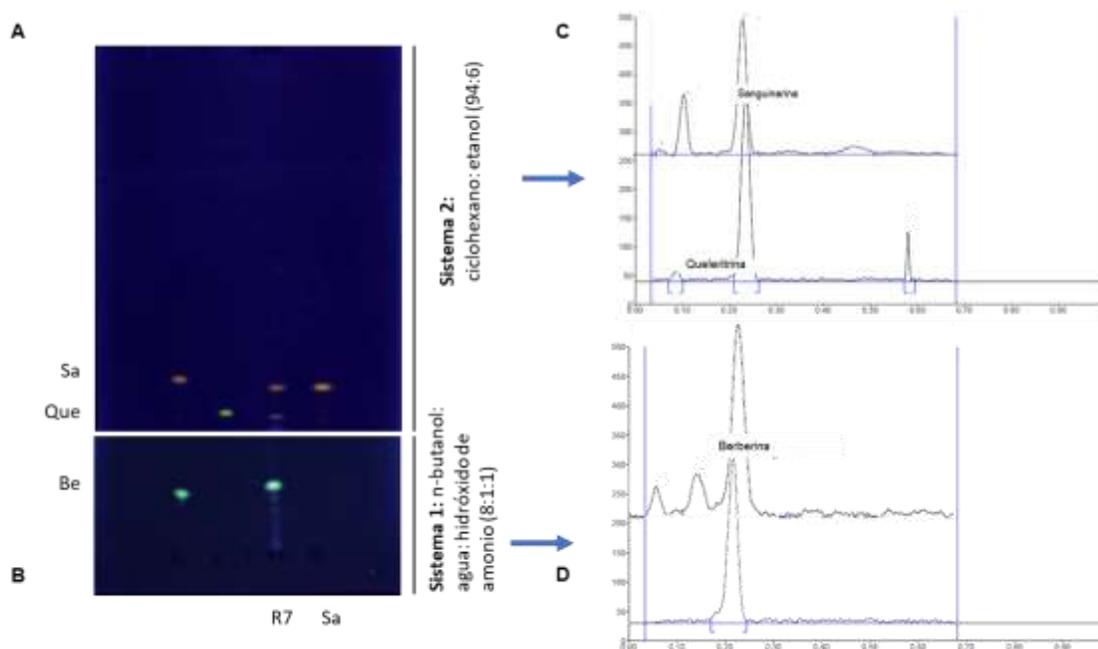


Figura 3.28. Perfil cromatográfico bajo luz UV (330 nm). Sa: sanguinarina, Be: Berberina, Que: Queleritrina. R7: Muestra. A: Sistema 1 que resuelve mejor la separación de Sa y Que. B: Sistema 2 que resuelve la separación de Be. C: Densitograma de la resolución de Sa panel superior y Que (panel inferior). En un mismo cromatograma, la línea inferior corresponde al estándar mientras que la superior corresponde a una muestra de raíz de la población sana de *A. mexicana* L. D: Densitograma de la resolución de Be, la línea inferior corresponde a la muestra estándar mientras que en la superior corresponde a una muestra de hoja de una planta sana de *A. mexicana* L. El espectro de fluorescencia se corrió entre 200 y 700 nm de excitación, registrando la emisión a 363 nm.

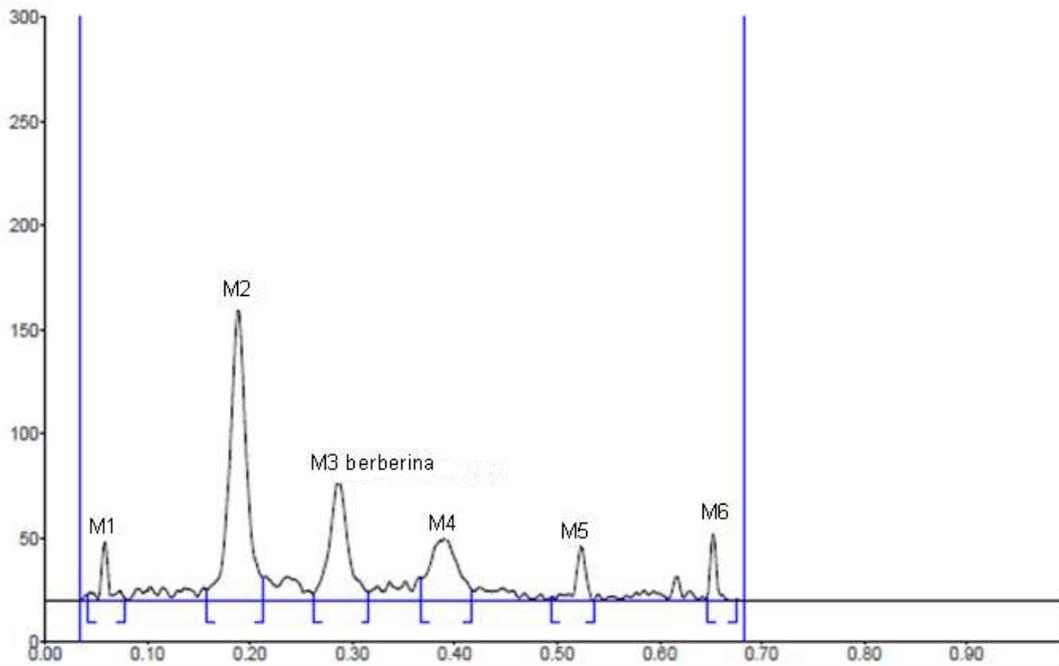


Figura 3.29: Separación cromatográfica de extractos de hoja infectada (H3-3) en el sistema:n-butanol:agua:hidróxido de amonio (8:1:1). Ver Cuadro 3.2.

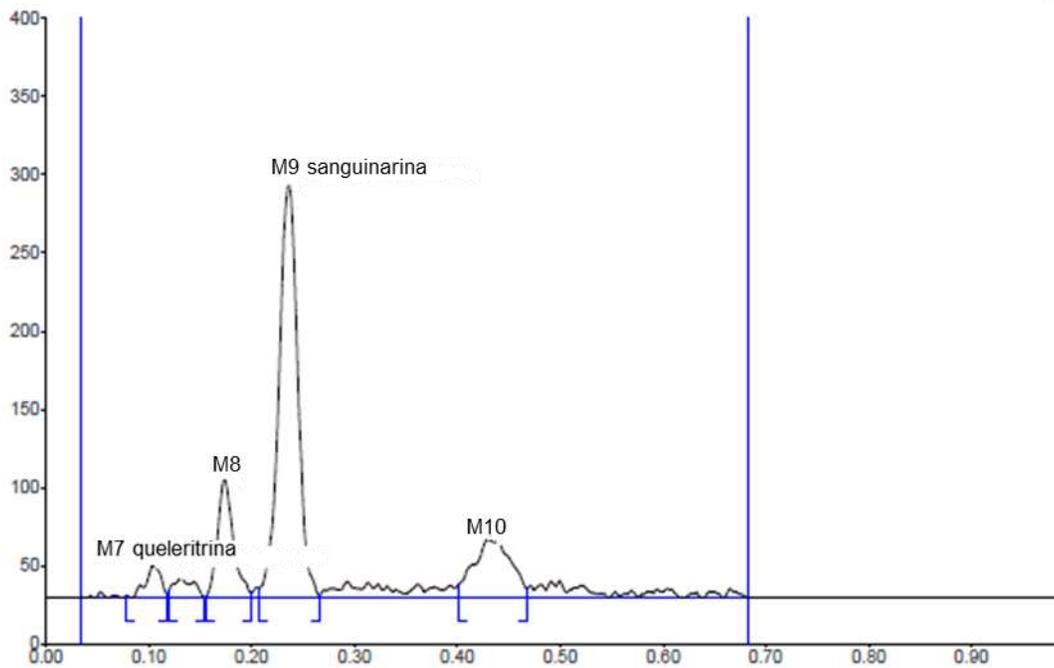


Figura 3.30: Separación cromatográfica de extractos de hoja infectada (H2-3) en el sistema:ciclohexano:etanol (94:6). Ver Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Productos separados en los tejidos provenientes de poblaciones de plantas infectadas (PI), asintomáticas (PA) y sanas (PS) de *A. mexicana* L.

Alcaloide	Rf	Sistema	Color*	Tejidos		
				PI	PA	PS
1	0.12	1	Azul rey			Raíz Raíz vecina
2	0.14	1	Azul rey bajo			Raíz Raíz vecina
3	0.16	1	Azul pastel			Raíz Raíz vecina
4	0.18	1	Verde tierno	Hoja Raíz	Hoja Raíz	Hoja Raíz
5 (Be)	0.26	1	Verde azulado	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz
6	0.37	1	Verde seco	Hoja	Hoja	Hoja
7	0.50	1	Azul oscuro	Hoja		Hoja
8	0.04	2	Azul-Lila	Raíz	Hoja	Raíz
9	0.07	2	Azul claro		Hoja	Hoja
10 (Que)	0.09	2	Verde amarillento	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz
11	0.17	2	Rojo-naranja	Raíz vecina	Hoja Raíz	Hoja Raíz
12 (Sa)	0.21	2	Naranja rojizo	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz	Hoja Tallo basal Tallo medio Tallo apical Raíz
13	0.25	2	Carne	Raíz	Hoja Raíz	Hoja Tallo basal Raíz
14	0.35	2	Café amarillento	Hoja Raíz	Hoja Raíz	Hoja Raíz
15 (Dsa)	0.57	2	Amarillo-Naranja	Hoja Raíz	Hoja Raíz	Hoja Raíz

*Se refiere al color de la autofluorescencia bajo UV de 365 nm. La paleta de colores se determinó de manera arbitraria.

Para visualizar la distribución de cada uno de los alcaloides detectados en los diferentes tejidos, se organizaron en diagramas de Venn (Figuras 3.31 - 3.33). En la Figura 3.31. presenta los alcaloides detectados en las hojas de *A. mexicana* colectadas de las tres poblaciones. Se

observa que todas comparten cinco alcaloides, entre ellos Be, así como los alcaloides 4, 6, 14 y 15 (dihidrosanguinarina). Es importante destacar que el alcaloide 6 únicamente fue posible encontrarlo en las hojas. El alcaloide 7 estuvo presente únicamente en las hojas de la población sana e infectada, mientras que el alcaloide 8 solo se encontró en la población asintomática. Estos datos resultan interesantes y sugieren el posible papel de estos alcaloides en la resistencia hacia los patógenos.

La Figura 3.32. presenta los alcaloides detectados en los diferentes segmentos de los tallos de *A. mexicana*. Se observa que en todos los casos (tallos basal, medio y apical de las tres poblaciones) se compartió la presencia de Sa, Be y Que, además fue posible encontrar el alcaloide 13, únicamente en el tallo basal de la población sana.

La Figura 3.33 presenta los alcaloides detectados en las raíces de *A. mexicana* colectadas en las tres poblaciones analizadas. Se pudo observar la presencia de los tres alcaloides identificados en las tres poblaciones, así como de los alcaloides 4, 14 y 15. No obstante los alcaloides 1, 2 y 3, sólo pudieron detectarse en la población sana, de los dos individuos analizados. También se pudo notar que los alcaloides 11 y 13 solamente se detectaron en uno de los dos individuos colectados de las poblaciones asintomática y sana.

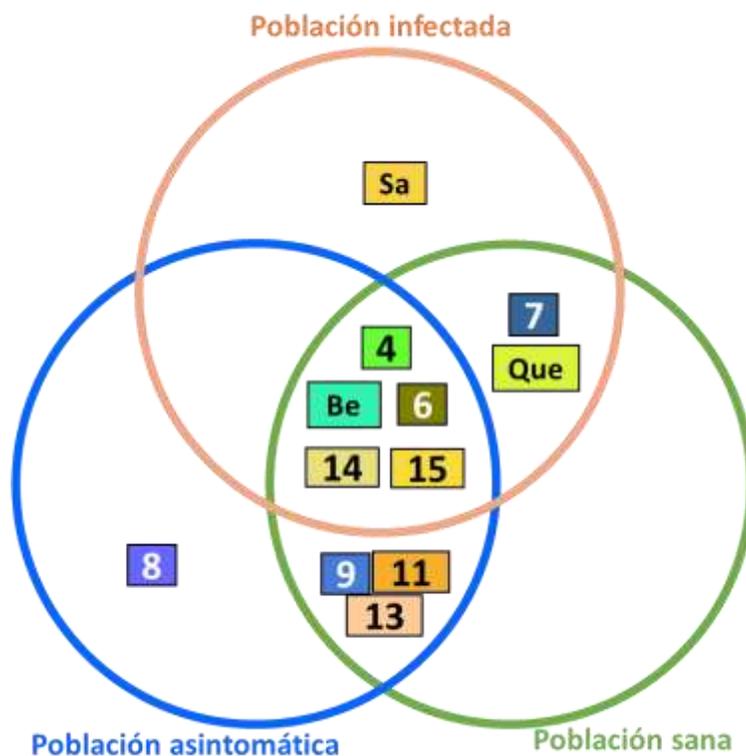


Figura 3.31. Alcaloides detectados en las hojas de *A. mexicana* L. colectadas en las poblaciones infectada (círculo naranja), asintomática (círculo azul) y sana (círculo verde). Alcaloides observados en el sistema 1: 4, 5 (Be), 6 y 7; en el sistema 2: 8, 9, 10 (Que), 11, 12 (Sa), 13, 14 y 15. Los colores de cada cuadro representan la autofluorescencia emitida en las placas bajo luz UV de 365 nm. Los valores Rf se pueden visualizar en la tabla 3.2.

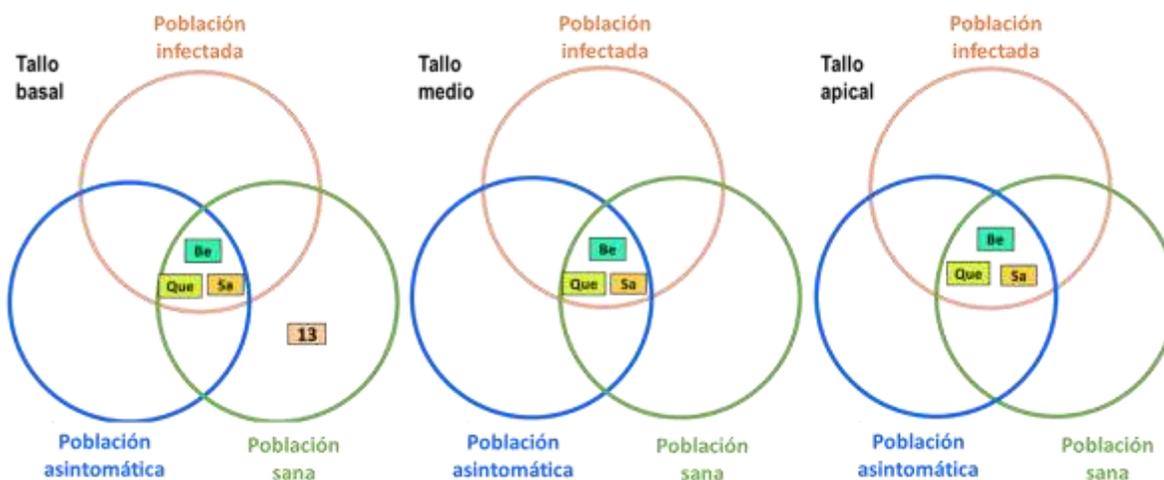


Figura 3.32. Alcaloides detectados en los tallos de *A. mexicana* L. colectados en las poblaciones infectada (círculo naranja), asintomática (círculo azul) y sana (círculo verde). Alcaloides detectados en sistema 1: 5 (Be); en el sistema 2: 10 (Que), 12 (Sa), y 13. Los colores de cada cuadro representan la autofluorescencia emitida en las placas bajo luz UV de 365 nm. Los valores Rf se pueden visualizar en la tabla 3.2.

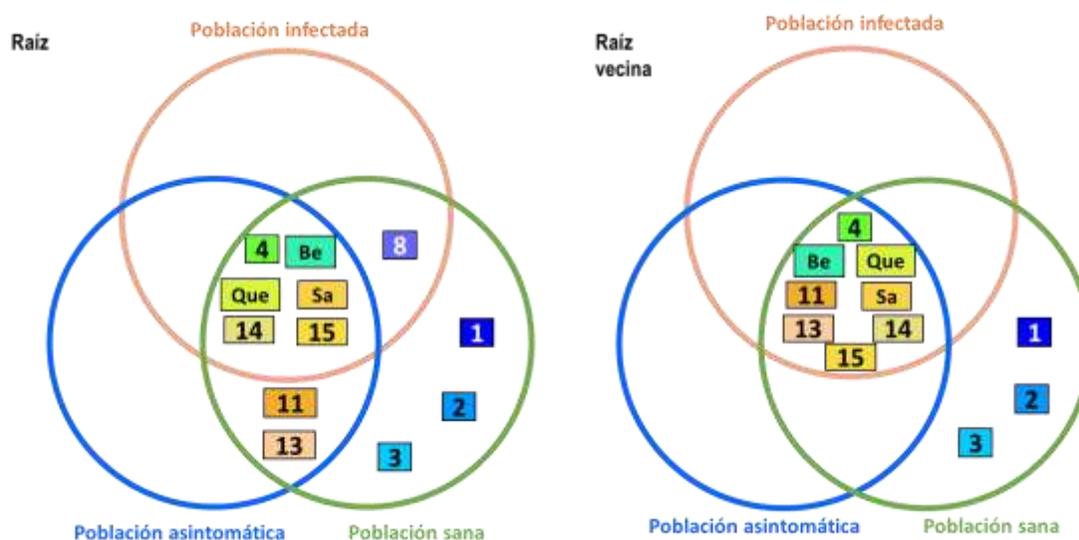


Figura 3.33. Alcaloides detectados en las raíces de *A. mexicana* L. colectadas en las poblaciones infectada (círculo naranja), asintomática (círculo azul) y sana (círculo verde). Alcaloides detectados en sistema 1: 1, 2, 3, 4, 5 (Be) y 7; en el sistema 2: 8, 10 (Que), 11, 12 (Sa), 13, 14 y 15. Los colores de cada cuadro representan la autofluorescencia emitida en las placas bajo luz UV de 365 nm. Los valores Rf se pueden visualizar en la tabla 3.2.

3.2.3.2. Análisis cuantitativo del contenido de alcaloides en plantas silvestres infectadas de *A. mexicana* L.

La cuantificación de Be, Que y Sa, se llevó a cabo por densitometría *in situ* sobre las placas cromatográficas midiendo la intensidad de la mancha, por transmitancia, fluorescencia o

reflexión, como se describió en la sección Materiales y Métodos. Las curvas de calibración para cada uno de los alcaloides analizados, así como sus parámetros estadísticos se muestran en la sección de anexos (Figura A.3. y Cuadro A.1.). Se observaron cambios notables asociados a la presencia de los síntomas de infección fúngica, en particular en las hojas. Con el fin de establecer la influencia de la presencia de hongos en los patrones de alcaloides, se realizó un análisis estadístico de los contenidos detectados. Para ello, primero se comprobó la normalidad y homocedasticidad de la distribución de las variables (contenido de Sa, Be y Que) por medio de la prueba de Anderson-Darling. Sin embargo, la mayoría de los datos analizados no presentaron una distribución normal por lo que se optó por las pruebas no paramétricas.

3.2.3.3. Análisis del contenido de Sa en plantas silvestres de *A. mexicana* L.

Las hojas de plantas infectadas presentaron Sa en valores de 0.202 mg/g PS, mientras que en las poblaciones asintomática y sana no se detectó la presencia de este alcaloide (LDC: 0.005 mg/g S; Cuadro 3.3). La prueba de Kruskal-Wallis, confirmó que estas diferencias fueron significativas (95% confianza; $p < \alpha$) y de acuerdo con el valor Z, y la prueba de Mann-Whitney, confirmó que la mediana de la población infectada respecto a la sana y asintomática es significativamente diferente (Cuadro A.4. y A.5 y Figura A.6.).

Cuadro 3.3. Contenidos de Sa en diferentes órganos de plantas de *A. mexicana* L. colectadas en poblaciones infectadas, asintomáticas y sanas. Promedio de triplicados con desviación estándar.

Contenido de Sa en hojas de <i>A. mexicana</i> (mg/g PS).			
Población	Infectada	Asintomática	Sana
Órgano			
Hojas	0.202 ± 0.221	ND: por debajo del límite de detección	ND: por debajo del límite de detección
Tallo basal	0.118 ± 0.092	0.194 ± 0.205	0.033 ± 0.030
Tallo medio	0.090 ± 0.090	0.069 ± 0.038	ND: por debajo del límite de detección
Tallo apical	0.052 ± 0.049	ND: por debajo del límite de detección	ND: por debajo del límite de detección
Raíz	0.505 ± 0.158	0.533 ± 0.328	0.435 ± 0.132
Raíz vecina	1.016 ± 0.205	1.095 ± 0.348	0.613 ± 0.383

Respecto a los tallos, los contenidos de Sa en las secciones basales de cada población se encontraron por debajo de 0.2 mg/g PS, siendo la población asintomática la que presenta los mayores niveles, seguido de la población infectada y la población sana (0.033 mg/g PS; Cuadro 3.3). La prueba de Kruskal-Wallis reveló que no existen diferencias significativas (95% confianza; $p > \alpha$), mientras que el valor Z indica que la población asintomática presenta diferencias respecto a las otras poblaciones (Cuadro 3.3, A.6, A.7 y Figura A.7)

Las secciones medias presentaron contenidos de Sa por debajo de 0.1 mg/g PS para la población infectada y asintomática, mientras que en la sana no se logró detectar. La prueba de Kruskal-Wallis indicó que no existen diferencias (95% confianza) en las medianas de cada población (infectada y asintomática) ($p > \alpha$), lo que se confirmó por la prueba de Mann-Whitney (Cuadro 3.3, A.6, A.7 y Figura A.8).

En cuanto a las secciones apicales, solo se logró detectar la presencia de Sa en la población infectada (0.052 mg/g PS; Cuadro 3.3). La prueba de Kruskal-Wallis confirmó (95% confianza) que al menos una mediana fue significativamente diferente ($p < \alpha$) y de acuerdo con el valor Z, ésta fue la población infectada. La prueba de Mann-Whitney también confirmó la diferencia de la población infectada respecto a las asintomática y sana, en las que no fue posible detectar el alcaloide. Es importante mencionar que en la población asintomática se observó la presencia de Sa, pero en niveles por debajo del límite de cuantificación (0.005 mg/g PS) (Cuadro 3.3, A.6, A.7 y Figura A.9).

De manera general, se observa que las secciones basales de cada población presentaron los niveles más altos de Sa seguido de las secciones media y apical, aunque cabe destacar que solo el tallo apical de la población infectada se logró detectar la presencia de Sa, esto nos permite hablar de una tendencia en donde los tallos basales acumulan mayores niveles de Sa que bien puede estar relacionado con la cercanía a la raíz, ya que la acumulación final de Sa en raíces está relacionada con la aparición de células especializadas capaces de almacenarla (Cuadro 3.3 y Figura A.10) (Xool-Tamayo, 2017; Rubio-Piña y Vázquez- Flota, 2013). Los niveles detectados de Sa en las raíces de las tres poblaciones fueron similares. Esto se puede relacionar con la característica de la raíz de ser el órgano que acumula mayores niveles de este alcaloide. En la raíz del individuo analizado fueron similares a los encontrados en la raíz vecina (Cuadro 3.3 y Figura A.13).

De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis (95% confianza), no existen diferencias significativas entre las medias de las poblaciones analizadas de la raíz y la raíz vecina ($p > \alpha$). Así mismo, al comparar las raíces de cada población tampoco se observaron diferencias significativas entre ellas, ya que el valor de p tanto para la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney es mayor a α (0.05) (Cuadro A.8, A.9, A.10 y Figura A.7, A.8 y A.13).

3.2.3.4. Análisis del contenido de Be en plantas silvestres de *A. mexicana* L.

Los análisis del contenido de Be en hojas de *A. mexicana* mostraron que existe una disminución del contenido de este alcaloide cuando la planta se encuentra en condiciones de infección, en comparación con las plantas en condiciones asintomáticas o sanas. De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis (95% confianza), se encontró que existen diferencias significativas entre estas poblaciones ($p < \alpha$), la prueba de Mann-Whitney confirmó la diferencia entre las medianas de las tres poblaciones (Cuadros 3.4, A.11, A.12 y Figura A.14).

Cuadro 3.4. Contenido de Be en diferentes órganos de plantas *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar.

Contenido de Be en hojas de <i>A. mexicana</i> (mg/g PS).				
Órgano	Población	Infectada	Asintomática	Sana
Hojas		0.155 ± 0.147	0.302 ± 0.250	0.626 ± 0.285
Tallo basal		0.250 ± 0.023	0.460 ± 0.158	0.857 ± 0.397
Tallo medio		0.338 ± 0.101	0.337 ± 0.166	0.853 ± 0.248
Tallo apical		0.898 ± 0.036	0.792 ± 0.056	0.967 ± 0.491
Raíz		0.294 ± 0.107	0.319 ± 0.074	0.595 ± 0.209
Raíz vecina		0.659 ± 0.194	0.699 ± 0.220	0.563 ± 0.176

Los contenidos de Be en las secciones basales de los tallos mostraron una disminución en condiciones de infección en comparación con las sanas. En las secciones medias, el contenido fue similar en condiciones de infección y asintomática, siendo mayor en la sana, mientras que la sección apical fue similar en las tres poblaciones, aunque ligeramente mayor en la población sana, seguido de las infectada y asintomática. Las pruebas de Kruskal-Wallis indicaron (95% confianza) que no existen diferencias significativas entre las medianas de las poblaciones de los tallos analizados ($p > \alpha$), aunque el valor Z sugiere que las poblaciones sanas generaron la mayor diferencia. La prueba de Mann-Whitney confirmó que las medianas de las tres poblaciones no fueron significativamente diferentes ($p > \alpha$) (Cuadros 3.4, A.13, A.14 y Figura A.15, A.16 y A.17). De acuerdo con el perfil obtenido por CCF se encontró que los contenidos de Be en las tres secciones del tallo analizadas fueron mayores en la población sana, seguidos de la población infectada y asintomática aunque estadísticamente no existen diferencias entre estos (Figura A.18).

Las pruebas estadísticas en los contenidos de Be en raíces mostraron que de acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis (95% confianza) no existen diferencias significativas entre las medianas

de las poblaciones, ya que el valor de p tanto para la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney fue mayor a α (0.05) (Cuadro 3.4, A.20, A. 21, A.22 y Figura A.19, A.20 y A.21).

3.2.3.5. Análisis del contenido de Que en plantas silvestres de *A. mexicana* L.

Se detectó la acumulación de Que en todos los órganos de las diferentes poblaciones, excepto en las hojas asintomáticas. No obstante, los contenidos fueron menores que los de Sa y Be coincidiendo con lo reportado previamente (Vázquez-Flota *et al.*, 2018). Los niveles de Que en hojas de plantas sanas fueron mayores que en las infectadas, mientras que en la asintomática no fue posible detectarla (Figura A.22).

La prueba de Kruskal-Wallis (95% confianza) indicó que entre los niveles de Que en hojas de las tres poblaciones, no existen diferencias significativas entre las medianas ($p > \alpha$), el valor Z muestra que la población sana generó la mayor diferencia. La prueba de Mann-Whitney corroboró que las diferencias de las medianas de las tres poblaciones fueron estadísticamente significativas ($p < \alpha$) (Figura A.22 y Cuadro 3.5, A. 18, A.19).

De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis (95% confianza), no existen diferencias significativas entre las medianas de las poblaciones de los tallos analizados ($p > \alpha$). La prueba de Mann-Whitney corroboró que las diferencias de las medianas de las tres poblaciones no son estadísticamente significativas ($p < \alpha$) (Figura A.23, A.24 y A.25 y Cuadro 3.5, A.20, A.21).

De acuerdo con la prueba de Kruskal-Wallis (95% confianza), no existen diferencias significativas entre las medianas de las raíces del individuo y las raíces vecinas de cada población, ya que los valores p tanto para las pruebas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney fueron mayores a α (0.05). La prueba de Mann-Whitney corroboró que las diferencias entre las medianas de las tres poblaciones no fueron estadísticamente significativas ($p < \alpha$) (Figura A.27, A.28 y A.29 y Cuadro 3.5, A.22, A.23, A.24).

De manera general, los niveles encontrados de Que entre todas las muestras analizadas de los órganos de las poblaciones de plantas silvestres de *A. mexicana* no presentaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que no parece haber algún indicio de correlación con respuesta al estímulo a la infección patogénica.

Cuadro 3.5: Contenido de Que en diferentes órganos de plantas de *A. mexicana* L. colectadas en poblaciones infectadas, asintomáticas y sanas. Promedio de triplicados con desviación estándar.

Contenido de Que en hojas de <i>A. mexicana</i> (mg/g PS).				
Órgano	Población	Infectada	Asintomática	Sana
Hojas		0.010 ± 0.028	ND: por debajo del límite de detección	0.016 ± 0.032
Tallo basal		0.011 ± 0.012	0.018 ± 0.011	0.027 ± 0.039
Tallo medio		0.001 ± 0.002	0.007 ± 0.008	0.003 ± 0.004
Tallo apical		0.003 ± 0.006	0.012 ± 0.011	0.0007 ± 0.001
Raíz		0.099 ± 0.026	0.081 ± 0.069	0.130 ± 0.073
Raíz vecina		0.195 ± 0.083	0.155 ± 0.041	0.188 ± 0.146

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

4.1. DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DE ALCALOIDES EN CULTIVOS *IN VITRO* DE *A. mexicana* L.

Se han realizado estudios previos del uso de inductores en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* en la línea AMMiF que se caracterizaba por presentar únicamente Sa en concentraciones altas y la ausencia de Be (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010). Debido a que la línea AMMiF se perdió fue necesario la obtención de una nueva línea celular, a partir de plántulas germinadas *in vitro* obteniéndose la línea AM1 (Monforte-González *et al.*, 2019).

La línea AM1 empleada en este trabajo para la obtención de la línea AMME coincide con lo reportado previamente. *A. mexicana* se caracteriza por sintetizar tanto Sa como Be simultáneamente pero durante la generación del cultivo de callos los niveles de estos dos alcaloides de bencilisoquinolina mostraron tendencias opuestas, los niveles de Be disminuyeron constantemente desde la etapa inicial de explante hasta la proliferación temprana de masas de células parenquimatosas desorganizadas mientras que el contenido de Sa aumentó siendo el principal alcaloide presente en esta línea celular (AM1). Por lo tanto se observó que la síntesis de alcaloides en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* se relaciona con el nivel de organización tisular, ya que la acumulación de Be parece requerir la presencia de órganos diferenciados, mientras que Sa no lo requiere. Aunque el cultivo de tejidos vegetales permite el control de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto; también pueden verse comprometidas algunas características de las células presentes en las plantas como su diferenciación, la comunicación intercelular y su metabolismo en los diferentes procesos morfogénéticos (Monforte-González *et al.*, 2019; Arias *et al.*, 2009; Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

Las suspensiones celulares, crecen más rápido que los cultivos de callos y son más homogéneos; sin embargo, la tasa de variabilidad también aumenta produciendo variabilidad e inestabilidad de los cultivos ya que están constituidas principalmente por células meristemáticas indiferenciadas débiles e inestables en comparación con su estado en el ambiente natural, para evitar el problema de la inestabilidad, los cultivos se subcultivan cuando las células están al final de la fase de crecimiento exponencial, en la fase estacionaria, debido a que es el estado que más se aproxima a las condiciones naturales, además se ha reportado un cierto grado de

diferenciación, y acumulación de metabolitos secundarios (Arias *et al.*, 2009; Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

Por otra parte, la tasa de crecimiento y la friabilidad del callo producido puede variar ampliamente entre explantes e incluso dentro de réplicas del mismo medio. Esta heterogeneidad se ve en los callos establecidos como diferencias en color, morfología, estructura, crecimiento y metabolismo. Incluso un callo aparentemente uniforme puede contener células de diferente ploidía y capacidad metabólica (Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

Los experimentos de inducción en las suspensiones celulares de *A. mexicana* requerían suficiente material vegetal, por lo que se necesitaba la producción masiva de suspensiones celulares y debido a la falta de tiempo se decidió el empleo de callos en medio líquido para realizar las inducciones, sin embargo, en el monitoreo realizado se observaron los cambios que presentaron los callos, para ello se formaron de manera espontánea dos grupos, unos que se tornaron de un color pardo en la que no se observó la disgregación de las células, mientras que el otro grupo presentaba una coloración normal y conforme iba transcurriendo el tiempo se observó la formación de una suspensión celular.

Se plantearon dos hipótesis, la primera fue que la coloración parda se debía a que las células habían sido sometidas a estrés, por lo que, en su proceso de aclimatación conllevó a la producción alta de Sa y por ello el medio de cultivo y las células se habían tornado de un color rojo pardo, ya que Sa se caracteriza por presentar una coloración rojiza (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010; Loyola-Vargas *et al.*, 2008). La segunda hipótesis es que esta respuesta se debía a la producción de fenoles, ya que estos están directamente estimulados por varios factores como la edad de la planta, el tamaño, el estrés biótico y abiótico, estimulando la oxidación fenólica lo que provoca el obscurecimiento de los medios que puede llegar a bloquear la absorción de nutrientes y en última instancia conduce a la muerte de los explantes, además se considera que el pardeamiento parece estar relacionado con el tiempo de cultivo, además de la tasa de diferenciación, la concentración de polifenol oxidasa (PPO), la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la peroxidasa (POD) (Ahmad *et al.*, 2013; Tang y Newton, 2004).

La función fisiológica de los polifenoles oxidasas es un tema de discusión, aunque su participación en el metabolismo de los fenoles en condiciones de estrés como la senescencia, daño mecánico o infecciones microbianas está bien documentada. Durante dicho estrés, las

enzimas entran en contacto con sus sustratos vacuolares y, en caso de daño mecánico, la oxidación de fenoles puede constituir un mecanismo de defensa contra la infección microbiana mediante la generación de quinonas altamente reactivas, productos hidroxifenólicos con acción bactericida o fungicida y polímeros oxidados que contribuyen a la cicatrización de heridas (López-Arnaldos *et al.*, 2001).

Así mismo se ha observado que el contenido de metabolitos secundarios puede aumentar después de la herbivoría y el daño mecánico en varias plantas, por ejemplo, en las hojas de *Psychotria brachyceras*, donde se observó un aumento al doble de la concentración del alcaloide indol bioactivo braquicerina (Gregianini *et al.*, 2004) y metabolitos como uliginosina B (De Matos *et al.*, 2014) entre otros (Kessler y Baldwin, 2002).

Como el enfoque de este trabajo fue evaluar cambios inducidos en la acumulación de alcaloides como parte de una respuesta de defensa, se tomó la primera hipótesis del experimento 1 ya que esta fue corroborada con la cuantificación del contenido de Sa en las muestras analizadas, en donde los resultados que se presentan como parte de los anexos permitieron observar un incremento considerable de la acumulación de Sa (0.6851 mg/g PS) comparables a los obtenidos con la inducción simultánea (0.7508 mg/g PS), las muestras de raíz y raíz vecina infectadas (0.505113671; 1.0167 mg/g PS).

Si bien, los resultados obtenidos indican que el daño mecánico ocasionado de manera espontánea en los callos de *A. mexicana* en medio líquido, mejoraron la acumulación de Sa aunque probablemente no sea reproducible. Por ello, se decidió trabajar únicamente con las suspensiones celulares.

Particularmente el uso de inductores como MeJA, AS, EL y *Fo* en cultivos celulares de *A. mexicana* responde a la acumulación de alcaloides, aunque solo se ha estudiado su efecto en la acumulación de Sa o dihidrosanguinarina, sin embargo, la respuesta varía de acuerdo con el inductor utilizado, así mismo se ha examinado la integración de diferentes estrategias de inducción como la inducción tradicional, con un inductor único, o la aplicación de combinaciones simultáneas de más de un inductor. En la mayoría de las especies, estas estrategias mejoran el rendimiento volumétrico de los metabolitos secundarios, mediante el efecto sinérgico de la estrategia individual. (Kaur *et al.*, 2021; Halder *et al.*, 2019).

En cuanto a inducciones individuales hasta ahora se ha reportado que la acumulación de Sa en cultivos de la línea AMMiF tratados con EL como único inductor resultó en una mayor

acumulación de Sa a las 24 y 48 hrs. de exposición en comparación con MeJA y AS (108 mg/g PS), en otro estudio también se observó que MeJA (100 μ M) puede alcanzar valores de 2 mg/g de peso seco, duplicando el rendimiento de los no expuestos (1 mg/g PS); por otro lado, la aplicación de homogenados de *Fo* (equivalente a 1 cm² de micelio) produjo un aumento significativo después de 96 hrs. con valores superiores a los 4 mg/g PS, cerca de cuatro veces más que los testigos no expuestos (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

En el presente estudio también se aplicó la inducción individual en la línea AMME, es importante destacar que esta línea no había sido inducida anteriormente, por lo que tomando como antecedentes los inductores empleados anteriormente se aplicó MeJA y EL a 100 y 200 (μ M y mg/L respectivamente), en donde las dosis ensayadas a las 72 hrs. mostraron un rendimiento alto siendo el EL a 200 mg/L el que resultó en una mayor acumulación de Sa (0.114 mg/g PS) seguido de EL a 100 mg/L (0.093 mg/g PS) coincidiendo con lo reportado previamente.

La aplicación secuencial de MeJA (100 μ M), AS (100 μ M) y EL (200 mg/L) a cultivos celulares de la línea AMMiF de *A. mexicana* generó la mayor acumulación de Sa (190 mg/g PS a las 96 hrs.) comparado con la aplicación simultánea (108 mg/g PS a las 96 hrs.) y a aquellas muestras control (20 mg/g PS) (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

Para la inducción secuencial y simultánea en este trabajo se empleó EL y MeJA a 200 (μ M y mg/L respectivamente), en la inducción secuencial se aplicó primero MeJA seguido de EL (24 hrs. más tarde), resultando en la acumulación de Sa a las 72 y 96 hrs. con valores de 0.389 y 0.3795 mg/g PS y para la inducción simultánea a las 72 hrs. a 0.7508 mg/g PS resultando en la mayor acumulación de Sa, si bien estas dos formas de inducción coinciden en que el uso de más de un inductor ejerce un efecto sinérgico para la acumulación de metabolitos secundarios, también difiere de lo obtenido previamente en donde la inducción secuencial resultaba en la mayor acumulación de Sa, esto tal vez se debe a que se tratan de dos líneas diferentes.

También se ha analizado la participación de la vía octadecanoica (OCDA) en la acumulación de Sa inducida por EL, usando el ácido dietilditiocarbámico (DIECA) que es un inhibidor de la vía OCDA. La aplicación de este agente a los cultivos expuestos a EL resultó en una respuesta limitada y la aplicación posterior de MeJA no revirtió totalmente el efecto inhibitorio de DIECA, lo que sugiere que la biosíntesis de Sa depende solamente de manera parcial de la vía OCDA (Guizar-González *et al.*, 2016).

De manera general, los resultados obtenidos anteriormente con la línea AMMiF son comparables con los resultados obtenidos en este trabajo debido a que también se observó un efecto sinérgico en la inducción secuencial y simultánea a las 96 hrs. (0.3795 y 0.7508 mg/g PS respectivamente), en comparación con la inducción individual con MeJA a 200 μ M y EL 200 mg/L con valores de 0.0529 mg/g PS y 0.1140 mg/g PS respectivamente. Sin embargo, los valores obtenidos para la línea AMME son relativamente bajos en comparación con la línea AMMiF, debido a que como se mencionó anteriormente, esta línea se caracterizaba por la producción de niveles altos de Sa sin condiciones de inducción.

Para los experimentos de inducción, y para definir las dosis aplicadas en este trabajo, se tomaron como antecedentes los trabajos previos con la línea AMMiF ya que la línea AMME no había sido anteriormente expuesta a tratamientos de inducción del metabolismo secundario. Por esta razón, es posible que los resultados obtenidos para la acumulación de alcaloides hayan sido más bajos que los obtenidos en la línea AMMiF. De manera general es posible decir que en la inducción individual con EL a 200 mg/L resultó ser el tratamiento que generó la mayor acumulación de Sa, en comparación con las otras dosis aplicadas de MeJA, mientras que la inducción simultánea fue la que mejor respuesta generó en comparación con las otras inducciones coincidiendo con lo reportado para la línea AMMiF.

Si bien sabemos que el uso de inductores en cultivos celulares de *A. mexicana* puede generar una acumulación de Sa, también se debe considerar que estos cultivos producen otros alcaloides, aunque en menor proporción. Por ello, factores como el inductor utilizado, así como la dosis y los diferentes tiempos de exposición, pueden repercutir en la síntesis y/o degradación de los demás alcaloides, distintos a Sa (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

Los perfiles obtenidos por CCF de los diferentes métodos de inducción ensayados permitieron visualizar un perfil más variado en la inducción simultánea, por lo que se logró detectar la presencia de Que y otros presuntos alcaloides de manera muy tenue e inconsistente, así mismo, los cromatogramas obtenidos indicaron que Que no estaba presente en todas las muestras analizadas, por lo que no se realizó la cuantificación de este alcaloide, así mismo, es importante mencionar que este trabajo, es el primer reporte de ensayos de inducción realizados en la línea AMME que permitió observar que la inducción simultánea con EL y MeJA en donde ejercieron un efecto sinérgico en la acumulación de Sa, así como de otros alcaloides minoritarios, por lo que, en futuras investigaciones se recomienda utilizar la inducción simultánea para la obtención

de un perfil más variado de los alcaloides presentes en los cultivos *in vitro* de la línea AMME de *A. mexicana* así como un monitoreo más prolongado ya que en este estudio solo se monitoreo hasta las 96 hrs. El monitoreo realizado en la inducción simultánea hasta las 96 hrs. permitió detectar Sa a niveles de 0.750 mg/g PS lo cual resulta comparable con los niveles encontrados en las raíces vecinas de plantas silvestres de *A. mexicana*, la raíz se caracteriza por acumular Sa ya que cuenta con células especializadas capaces de almacenarla sin ocasionar un daño tóxico a la planta, el valor encontrado supera a los niveles encontrados en la población sana que presentó 0.613 mg/g PS, mientras que los niveles encontrados en la población infectada y asintomática fueron ligeramente mayores a 1 mg/g PS.

4.2. DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS DE ALCALOIDES EN PLANTAS INFECTADAS DE *A. mexicana* L.

Se han identificado más de 30 ABI's en *A. mexicana*, siendo Sa y Be las más abundantes representando a las benzofenantridinas y protoberberinas, respectivamente, aunque la distribución de estos alcaloides cambia de acuerdo con la etapa de desarrollo de la planta. (Rubio-Piña y Vázquez Flota, 2013).

En plantas adultas Be se distribuye tanto en las raíces y tejidos aéreos mientras que en plantas en desarrollo se encuentra ausente. Por su parte, Sa solamente puede ser detectada en las partes aéreas de plantas en desarrollo y en las plantas maduras se restringe a las raíces y las semillas. En plántulas en desarrollo y plántulas jóvenes, los sitios de acumulación de alcaloides difieren de aquellos que muestran la actividad transcripcional relacionada con su síntesis, lo que sugiere la operación de mecanismos reguladores complejos, que podrían involucrar controles postranscripcionales, transporte a larga distancia o flexibilidad catalítica enzimática. La distribución de los alcaloides en los tejidos no necesariamente corresponde con la actividad transcripcional. Por ejemplo, existe una actividad transcripcional relacionada con la síntesis de Sa en la parte aérea de plántulas en desarrollo, aunque más tarde ocurre un mecanismo de transporte para su acumulación en la parte radical ya que la raíz cuenta con células especializadas para almacenar Sa, sin llegar a intoxicar a la planta (Vázquez-Flota et al., 2018; Xool-Tamayo et al., 2017; Xool-Tamayo et al., 2014).

Los niveles encontrados de Sa en los tejidos analizados coinciden con lo reportado previamente, sin embargo, los tejidos aéreos de la población infectada de *A. mexicana* parecen tener la capacidad de producir y acumular Sa, ésta principalmente se encuentra restringida a sus partes

subterráneas en plantas adultas sanas. En condiciones sanas se notó que Sa sólo era detectable en raíces y el tallo basal. Sin embargo, en la población asintomática es posible detectarlo en la raíz, el tallo basal y medio; y para la población infectada se encontró en la raíz, tallo basal, medio y apical y de manera interesante, se encontraron niveles altos de Sa en hojas de la población infectada (Figura 4.1). Los tejidos aéreos de la población infectada de *A. mexicana* parecen tener la capacidad de producir y acumular Sa. Esto sugiere que la Sa tiene un papel en respuesta a los daños ocasionados por los organismos patógenos. Por lo tanto, tiende a acumularse en todos los órganos. La Sa es conocida por ser altamente tóxica y por sus propiedades antimicrobianas. De este modo, esto podría estar relacionado a la distribución de este alcaloide en los diferentes órganos de la planta infectada (Virsen et al., 2019; Rubio-Piña y Vázquez-Flota *et al.*, 2013; Brahmachari *et al.*, 2013).

En estudios previos del análisis de alcaloides en plantas maduras (sana) se encontró que las raíces acumularon cantidades similares tanto de Be como de Sa (alrededor de 1,2 mg g PS-1), con cantidades más bajas de Que. En las partes aéreas solo se detectó Be, donde estuvo presente en mayor cantidad que en las raíces (2,0 mg g PS-1) estos datos son comparables con los encontrados en este trabajo ya que la raíz de la población sana presentó valores similares de Sa y Be (0.6130 mg/g PS, 0.563 mg/g PS) mientras que Que se encontraba en niveles más bajos (0.1884 mg/g PS), sin embargo, para los niveles de Be encontrados en las partes aéreas, los tallos (basal, medio y apical) presentaron los valores más altos de Be en comparación con los otros órganos de la población sana analizados (0.857 mg/g PS, 0.853 mg/g PS, 0.968 mg/g PS) (Figura 4.2; Vázquez-Flota *et al.*, 2018; Monforte-González *et al.*, 2012).

Con los datos reportados previamente sobre el análisis de la distribución de los alcaloides Be y Sa en *A mexicana* se sabe que las raíces de las plantas maduras son capaces de acumular alcaloides del grupo de las benzofenantridinas, protopina y protoberberina mientras que los tejidos aéreos parecen tener la capacidad de acumular protoberberina, sin embargo, con el análisis realizado en este estudio de la población infectada se encontró que las hojas son capaces de acumular en grandes cantidades Sa que pertenece al grupo de las benzofenantridinas, probablemente al ser el órgano que atacan directamente los patógenos u otros organismos, es por ello, que requiere la acumulación de Sa como un efecto protector de *A. mexicana*, posiblemente cuando la planta detecta un ataque patogénico ocurre un transporte de Sa desde la raíz a las hojas (Vázquez-Flota *et al.*, 2018).

Como se mencionó anteriormente Be se distribuye en todos los órganos de la planta y los resultados obtenidos no fueron la excepción. No obstante, además de ello se observó que en todos los casos la población sana acumuló los niveles más altos de Be mientras que la población infectada presentaba niveles más bajos. Por lo tanto, cuando la Sa se encuentra en niveles más altos, la Be se encuentra en niveles bajos, y esto probablemente está relacionado con el nivel de toxicidad, como un método de defensa ante el ataque patogénico. De igual forma, aunque Be y Sa pertenecen a los grupos de las protoberberinas y las benzofenantridinas, comparten las primeras reacciones biosintéticas hasta la formación de S-escoulerina, para después separarse hacia sus respectivas rutas. De este modo, podemos hablar de una preferencia para la biosíntesis de Sa cuando la planta se encuentra en condiciones de infección (Figura 4.3; Xool-Tamayo *et al.*, 2017; Hagel y Facchini 2013).

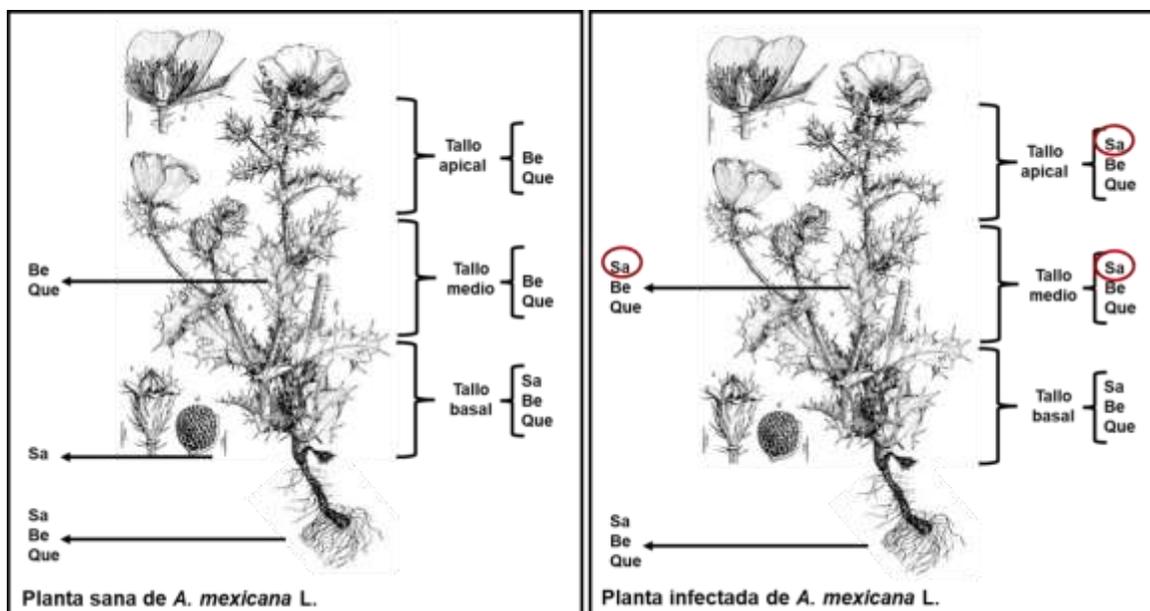


Figura 4.1. Alcaloides encontrados en las plantas analizadas de *A. mexicana* L. Lo resaltado en rojo indica la detección de Sa en los diferentes órganos analizados de la población infectada.

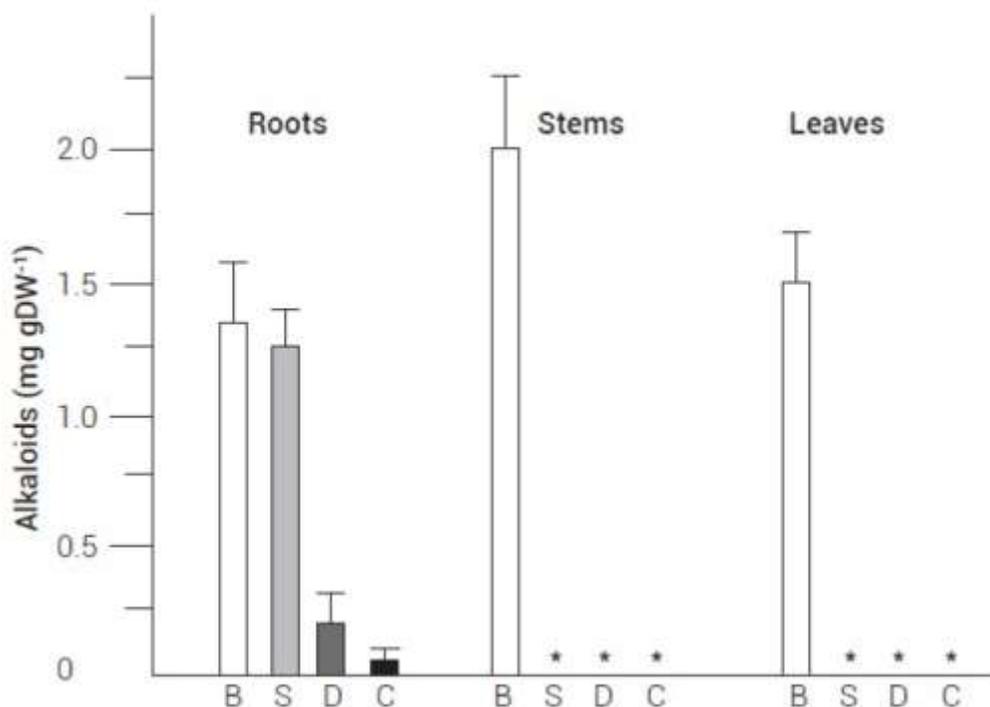


Figura 4.2. Contenido de alcaloides en raíces, tallos y hojas de plantas de *A. mexicana* L. B: Be; S: Sa; D: dihidrosanguinarina; C: Que; *: No detectado. Promedio de tres repeticiones con error estándar. Tomado de Vázquez-Flota *et al.*, 2018.

Los estudios sobre la interacción planta-patógeno en *A. mexicana* es nulo ya que los reportes sobre los patógenos que puede atacar a *A. mexicana* son escasos, se sabe que la planta presenta susceptibilidad a algunos patógenos que pueden afectar su desarrollo. Los estudios que documentan especies patógenas en *Argemone* son muy escasos por lo que lo convierte en un área para explorar ya que la interacción planta patógeno es muy compleja. Este trabajo es un primer acercamiento sobre la influencia de los ataques fúngicos en *A. mexicana* sobre los cambios inducidos en la acumulación de alcaloides en *A. mexicana* producidos como parte de una respuesta de defensa.

Entre los patógenos reportados tenemos al tizón bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *papavericola*, *A. mexicana* es hospedante de *Aspergillus niger*, que ocasiona la pudrición del collar; asimismo, es susceptible al nematodo reniforme *Rotylenchulus reniformis*, que ataca las raíces y al gusano de la yema del tabaco *Helicoverpa assulta*, que ataca el tallo (Holm *et al.*, 1977). Es interesante notar que de las hojas de *A. mexicana* se han aislado 42 especies de hongos, siendo los más frecuentes *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*,

Ulocladium atrum, *U. botrytis*, *Phoma humicola*, *Aspergillus niger* y *Curvularia ellisii* (Abdel-Hafez, 1985).

El ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA) son dos señales endógenas implicadas en la obtención de respuestas de resistencia de las plantas; están involucrados en las respuestas a las heridas, el ataque de patógenos y en la transducción de señales de la inducción de metabolitos secundarios; la acumulación inducida de JA y SA activa una variedad de respuestas de defensa de insectos y microbios en las plantas que puede culminar en la producción de alcaloides (Gregianini *et al.*, 2004).

Las plantas al estar expuestas a un sin número de patógenos en su medio natural y “como parte de su proceso evolutivo” han desarrollado múltiples y complejas estrategias de defensa, permitiendo adaptarse a diferentes entornos ambientales y defenderse del ataque a patógenos entre los mecanismos de respuestas incluye las barreras pre-existentes físicas y químicas, así como respuestas inducibles que son activadas antes y después de la percepción del patógeno (Canchignia-Martínez *et al.*, 2015; Desender *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2009).

El patógeno al entrar en contacto con la planta, pone en marcha un sistema de comunicación molecular entre ambos, que desencadena la inducción de mecanismo de defensa en la planta, como la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y la Resistencia Sistémica Inducida (RSI). La RSA es inducida por patógenos, debido a un incremento de AS sintetizado endógenamente en la planta, siendo esta molécula de señalización esencial en esta vía, la infección por un patógeno biotrófico activa la respuesta defensiva general que desencadena una resistencia sistémica y duradera e inespecífica para un amplio rango de patógenos induciendo la expresión de genes característicos, y puede actuar a nivel local o sistémicamente. La Resistencia Sistémica Inducida (RSI) proporciona a la planta una mejor capacidad de respuesta eficientemente a una infección por patógenos, esta vía está mediada por el MeJA, implicado en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos biotróficos. Así mismo la colonización de raíces por cepas no patogénicas PGPR, dan paso a la RSI, siendo esta efectiva contra el ataque de patógenos, donde son combatidos a través de un mecanismo de defensa dependiente del JA/ET (Canchignia-Martínez *et al.*, 2015)

De manera general tenemos que la resistencia sistémica RSA, es inducida por inductores abióticos o bióticos en la raíz o tejido foliar, dependiente de la fitohormona AS y asociado con la acumulación de proteínas PR; la RSI, inducida por la exposición de las raíces a cepas específicas

PGPR es dependiente de fitohormonas ET/JA, no está asociado con la acumulación de proteínas PR; sin embargo, ambas respuestas están entrelazadas molecularmente, se ha demostrado su dependencia en una versión funcional del gen NPR1 en *Arabidopsis thaliana* (Figura 4.4) (Canchignia-Martínez *et al.*, 2015; Vallad y Goodman, 2004).

Como se mencionó previamente, los estudios sobre la interacción planta-patógeno en *A. mexicana* son escasos, por lo que es necesario indagar más sobre los cambios que ocurren a nivel molecular frente al ataque patogénico, de esta forma las muestras de hojas colectadas en la población infectada se están analizando como parte de un proyecto adicional a este, se están identificando los hongos patógenos presentes en las muestras analizadas en el presente proyecto, hasta ahora se han logrado identificar como posibles agentes causales de la infección a *Lasiodiplodia theobromae*, *Neopestalotiopsis clavispora*, *Cladosporium cladosporoides*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani*—(comunicación personal de Hernández Eleria) (Figura 3.22), estos resultados son complementarios para poder entender de qué manera los patógenos de *A. mexicana* influyen en la síntesis y acumulación de los alcaloides presentes.

De manera general respecto al contenido de alcaloides los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado previamente, sin embargo, el dato que más llama la atención son los niveles de Sa encontrados en las hojas infectadas, así mismo los niveles encontrados en el tallo basal que puede estar relacionado a la cercanía de la raíz al ser un órgano que presenta células especializadas para almacenar Sa, mientras que Be se encontraba presente en todos los órganos analizados se observó un contraste en la disminución de los niveles de Be cuando Sa aumentaba esto principalmente en las hojas infectadas (Figura 4.5).

Si bien es necesario identificar a los demás alcaloides encontrados en las muestras analizadas, los resultados obtenidos nos permiten cubrir el objetivo general de este proyecto para documentar los cambios inducidos en la acumulación de alcaloides en las plantas silvestres de *A. mexicana* en condiciones de infección, producidos como parte de una respuesta de defensa.

También podemos observar que los valores encontrados en los órganos analizados presentan desviaciones estándares muy amplios esto debido a que el número de muestreo fue reducido por lo que no fue posible realizar un análisis de varianza por el método paramétrico por lo que se propuso analizarlo por el método no paramétrico. Los resultados obtenidos son un parteaguas de futuras investigaciones para profundizar de qué manera el ataque patogénico puede influir en

la distribución de los alcaloides en los diferentes órganos de *A. mexicana*, para ello se recomienda realizar un muestreo más amplio para reducir el sesgo en los resultados. Así mismo, la identificación correcta de los patógenos presentes en las muestras analizadas, permitirán entender la interacción de la planta-patógeno ya que la capacidad de respuesta inmune que poseen las plantas está directamente relacionada con la capacidad de invasión del patógeno (Sánchez-Vallet. *et al.*, 2013).

4.3. DISCUSIÓN GENERAL

Las inducciones ensayadas tanto en la línea AMME y en las plantas infectadas de *A. mexicana*, resultaron en cambios de la acumulación de alcaloides como parte de una respuesta de defensa. La cuantificación del contenido de Sa en las muestras analizadas de las diversas inducciones permitió observar un incremento considerable de la acumulación de Sa, así como, de otros presuntos alcaloides minoritarios. La coloración parda-rojiza fue adquirida en respuesta al proceso de inducción a la que se sometieron los cultivos de suspensiones celulares (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

De manera general es posible decir que en la inducción individual con EL a 200 mg/L resultó ser el tratamiento individual que generó la mayor acumulación de Sa, mientras que la inducción simultánea fue la que mejor respuesta generó en comparación con las otras inducciones coincidiendo con lo reportado para la línea AMMiF en donde se ha observado el efecto sinérgico de MeJA, EL y AS. De acuerdo con los perfiles obtenidos por CCF la variabilidad de los perfiles de las muestras de la línea AMME en la inducción individual y secuencial no presentaron cambios notorios de manera cualitativa, mientras que en la inducción secuencial fue posible la visualización de otros metabolitos de baja polaridad en concentraciones minoritarias, entre ellos fue posible detectar Que aunque cabe destacar que no se puso a realizar la cuantificación de este, debido a que no estaba presente de forma consistente en todas las muestras y la cuantificación por densitometría no fue posible realizarla, por lo tanto, solo se realizó la cuantificación de Sa en las inducciones realizadas en los cultivos *in vitro* de la línea AMME de *A. mexicana*.

Respecto al segundo modelo de estudio, en las plantas silvestres de *A. mexicana* se cuantificaron los niveles de Be, Sa y Que en donde se observó la presencia de Be en todos los órganos analizados. La población sana acumuló los niveles más altos de Be mientras que la población infectada presentaba niveles más bajos, probablemente esté relacionado con el nivel de toxicidad, como un método de defensa ante el ataque patogénico, por lo que seguramente existe

una preferencia para la biosíntesis de Sa cuando la planta se encuentra en condiciones de infección (Xool-Tamayo *et al.*, 2017; Hagel y Facchini 2013).

Los estudios sobre la interacción planta-patógeno en *A. mexicana* son nulos por lo que lo convierte en un área para explorar ya que la interacción planta patógeno es muy amplia y compleja. Este trabajo es un primer acercamiento sobre los cambios inducidos en la acumulación de alcaloides en *A. mexicana* producidos como parte de una respuesta de defensa, es necesario indagar más sobre los cambios que ocurren a nivel molecular frente al ataque patogénico, estos resultados son una pieza clave para entender de qué manera los patógenos de *A. mexicana* influyen en la síntesis y acumulación de los alcaloides presentes. Es fundamental identificar los alcaloides detectados en las muestras infectadas para poder generar conocimiento que permita ayudar a entender la repercusión de los patógenos en la acumulación de alcaloides en *A. mexicana*.

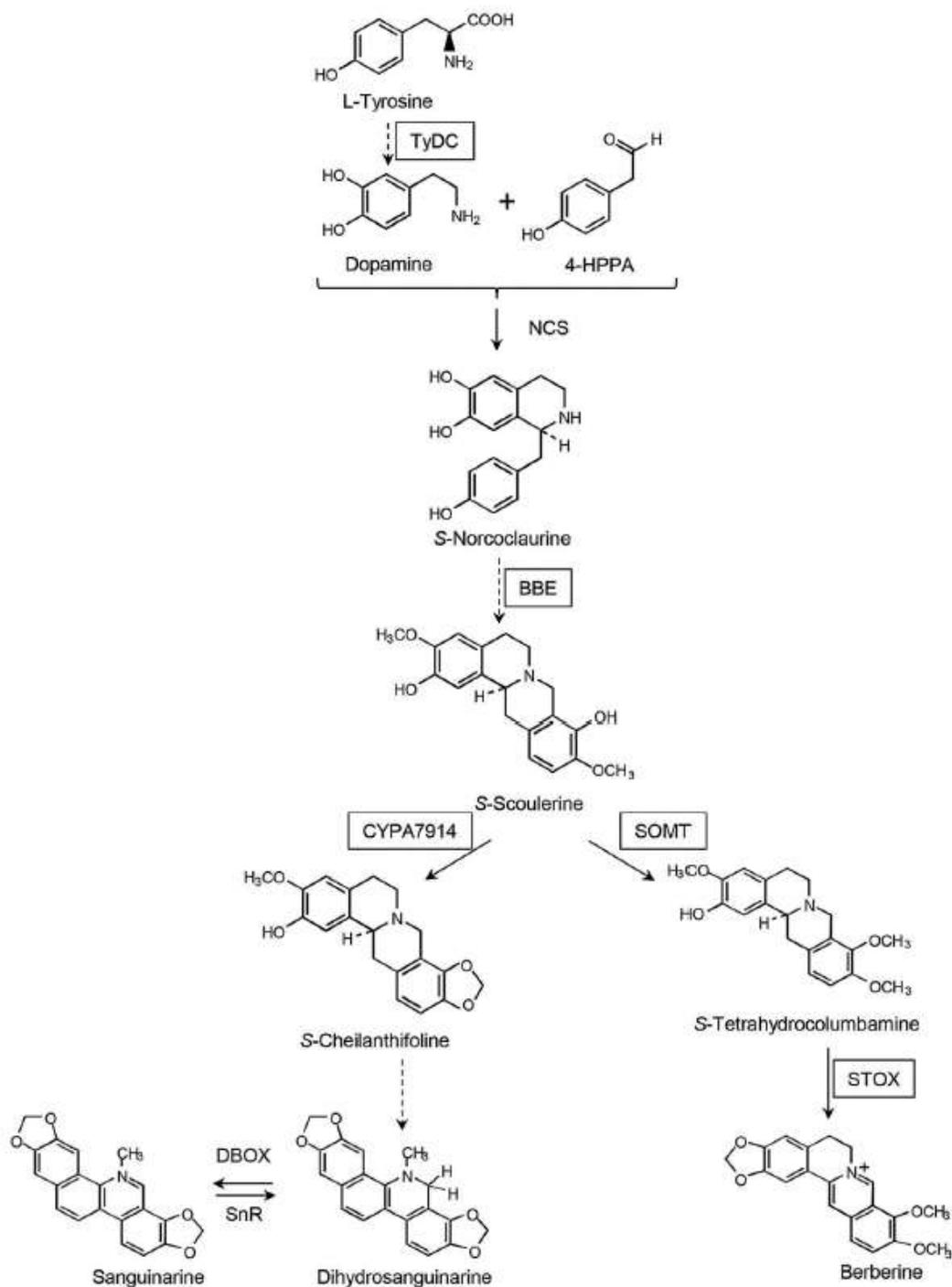


Figura 4.3: Vista esquemática de las rutas biosintéticas de Be y Sa. TyDC, tirosina descarboxilasa; NCS, norcoclaurina sintasa; BBE, enzima puente de berberina; SOMT, S-scoulerina O-metiltransferasa; STOX, tetrahidroprotoberberina oxidasa; CYP719A14 (CheSyn), queilantifolina sintasa; DBOX, dihidrobenzofenantridina sintasa; SnR, Sa reductasa.

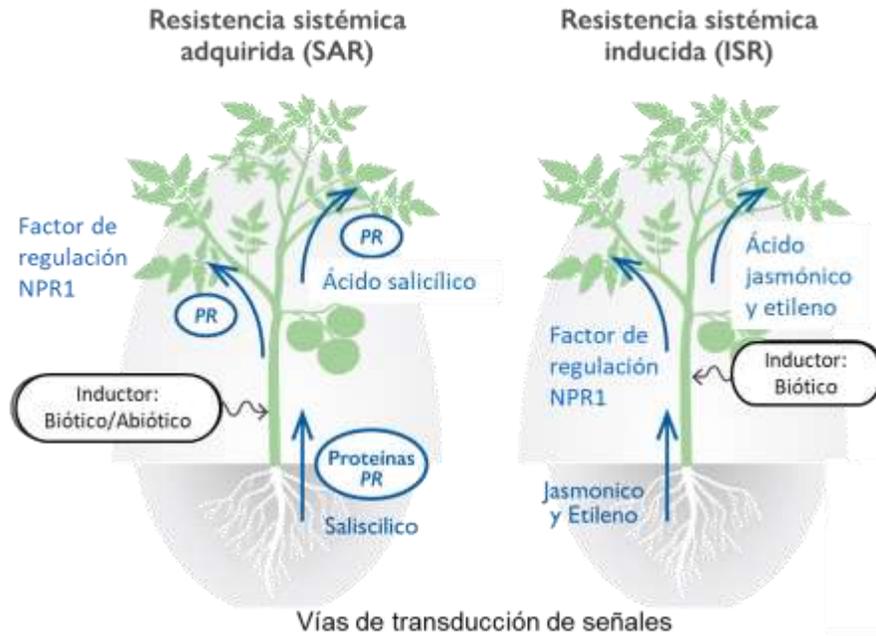


Figura 4.4. Modelo de resistencia sistémica en plantas.

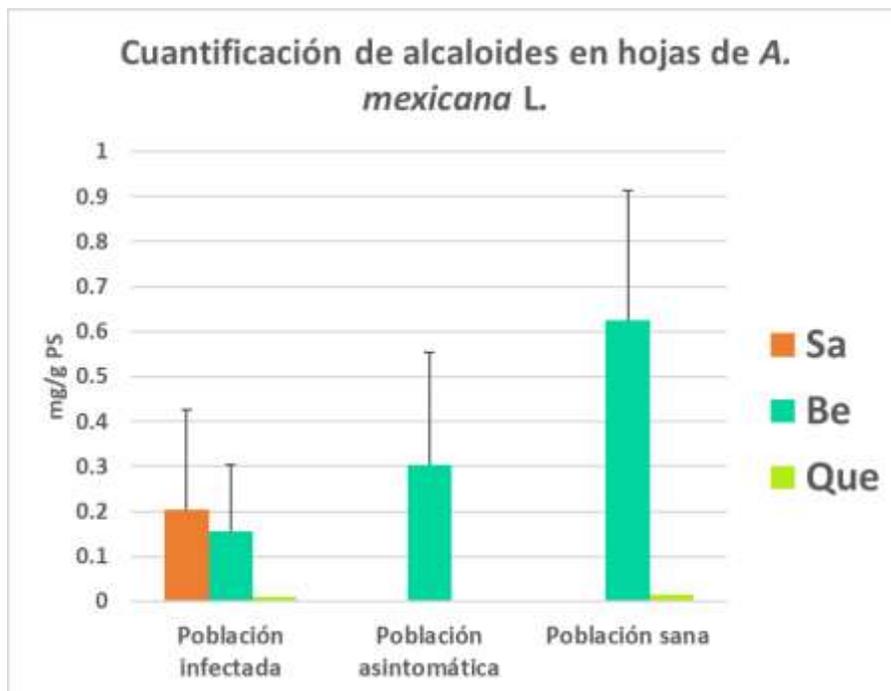


Figura 4.5. Niveles de alcaloides encontrados en las hojas analizadas de *A. mexicana* L.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1. CONCLUSIONES

5.1.1. Conclusiones referentes a los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* L.

De las inducciones ensayadas en los cultivos *in vitro* de la línea AMME de *A. mexicana*, la inducción secuencial y simultánea con EL y MeJA ejerció un efecto sinérgico para la acumulación de Sa, siendo la inducción simultánea la que presentó los niveles más altos a las 96 hrs (0.750 mg/g PS) con niveles comparados con los encontrados en la raíz vecina de plantas infectadas de *A. mexicana* (1.016 mg/g PS), así como, un perfil más variado, ya que en la CCF se pudo detectar otros presuntos alcaloides de baja polaridad, entre ellos Que, estos alcaloides minoritarios no fue posible visualizarlos en los perfiles obtenidos de la inducción individual y secuencial.

5.1.2. Conclusiones referentes a las plantas silvestres de *A. mexicana* L.

Se logró la detección de 15 alcaloides por densitometría de las placas cromatográficas obtenidas de las muestras de plantas silvestres de *A. mexicana*, entre ellos se logró identificar con muestras estándares Be, Que y Sa entre otros alcaloides minoritarios que contrastaron de acuerdo a la población analizada, las concentraciones encontradas de estos alcaloides principalmente Be y Sa fue contrastante especialmente en las hojas, ya que, en plantas adultas se ha reportado la presencia de Be en todos los órganos, mientras que, Sa se limita a los órganos subterráneos, por lo que, fue muy interesante notar que cuando la planta se encuentra en condiciones de infección Sa se localiza en las hojas, posiblemente Sa esté relacionado al método de defensa de la planta ante un ataque patogénico, debido a que Sa también es conocida por sus propiedades antimicrobianas, así como su nivel de toxicidad, por lo tanto la planta cuando no la necesita almacena la Sa en las raíces ya que ésta cuenta con células especializadas capaces de almacenarla sin afectar a la planta, sin embargo, cuando la planta detecta la presencia de algún patógeno pueden ocurrir dos cosas, tal vez existe un transporte desde la raíz a las hojas como un primer método de defensa ya que en las muestras analizadas se logró detectar la presencia de Sa en todos los órganos analizados, además se observó que la raíz almacenaba mayor niveles de Sa, seguido del tallo basal, mientras el tallo medio y apical, contenían niveles más

bajos cuando se acercaba más al ápice de la planta, o también que, en las hojas existe una biosíntesis de este alcaloide y por esta razón los niveles de Sa y Be contrastan ya que existe una preferencia para la biosíntesis de Sa que la de Be, aunque se tratan de dos alcaloides pertenecientes a grupos diferentes (benzofenantridinas y protoberberinas) comparten las primeras reacciones biosintéticas que permiten la preferencia de una ruta específica por lo que los niveles encontrados de Be se ven afectados. También es posible pensar que ocurren los dos eventos mencionados anteriormente y por esta razón los niveles encontrados de Sa en las hojas son altos, mayor a los encontrados en los tallos, esta idea se sustenta en los datos reportados previamente, en donde se han logrado identificar que los sitios de acumulación difieren con los que muestran la actividad transcripcional, por lo que estos mecanismos son complejos ya que incluso pueden ocurrir transportes a larga distancia y síntesis de un alcaloide en específico en un determinado órgano (Vázquez-Flota *et al.*, 2018; Xool-Tamayo *et al.*, 2017; Xool-Tamayo *et al.*, 2014). Podemos decir que las hojas de la población infectada parecen tener la capacidad de producir y almacenar Sa en respuesta a los daños ocasionados por un ataque patogénico, si bien, este es un primer acercamiento sobre la regulación de la síntesis de alcaloides en *A. mexicana* bajo inducción biótica sería interesante estudiar con más detalle sobre los cambios moleculares que ocurren para poder entender este complejo sistema.

5.1.3. Conclusiones generales.

La inducción biótica tanto en cultivos *in vitro* de la línea AMME y plantas silvestres de *A. mexicana* respondieron a una modificación en los niveles de biosíntesis de los alcaloides presentes, por medio de la CCF fue posible observar el contraste en los perfiles de las inducciones principalmente cuando estos son combinados (EL y MeJA) ejercen un efecto sinérgico para la acumulación de Sa, el perfil obtenido de la inducción simultánea permitió detectar otros alcaloides de baja polaridad que no fueron visualizados en los perfiles obtenidos de la inducción individual y secuencial, se encontró niveles hasta de 0.750 mg/g PS a las 96 hrs. en la inducción secuencial, estos valores son casi similares a los encontrados en las raíces infectadas de plantas silvestres de *A. mexicana*. En el segundo modelo de estudio se logró detectar 15 alcaloides entre ellos Be, Que y Sa, los niveles encontrados contrastaron de acuerdo con la población tratada, principalmente en las hojas de *A. mexicana* en donde se encontraron niveles altos de Sa mientras que los niveles de Be disminuyeron, así mismo los perfiles cromatográficos obtenidos permitieron observar un perfil más variado en todos los órganos analizados cuando éstos proveían de una población infectada, por lo que, se concluye que la inducción biótica en las muestras de *A. mexicana* repercute en la biosíntesis de alcaloides encontrándose los mayores contraste en los

metabolitos mayoritarios (Be y Sa), así mismo, la inducción en la línea AMME con EL y MeJA activaron la biosíntesis de Sa y los niveles encontrados fueron similares a los que normalmente se presentan en las plantas silvestres, esto está relacionado a que EL contiene restos de pared celular y MeJA es un mediador bioquímico que en las plantas activan sistemas de defensa, por lo tanto estos dos modelos de estudio son ideales para entender estos procesos biosintéticos que ocurre en *A. mexicana*.

5. 2. PERSPECTIVAS

- Se propone utilizar otras técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas u otras técnicas que permitirán detectar e identificar los alcaloides que se sintetizan en concentraciones más bajas en la línea celular AMME y en los diversos órganos analizados de plantas silvestres de *A. mexicana* y de esta forma poder contrastar los niveles de cada uno de ellos, con la identificación adecuada de los alcaloides se podrá analizar con mayor precisión su papel en la estrategia de defensa de *A. mexicana*, a la inducción biótica.
- El presente trabajo específicamente con los resultados obtenidos de las plantas silvestres de *A. mexicana* son un primer acercamiento de la regulación de la biosíntesis de los alcaloides presentes en *A. mexicana*, por lo que se propone el indagar más sobre el mecanismo de transporte en los tejidos de *A. mexicana* en condiciones de infección. Puede resultar muy interesante el analizar los cambios que ocurren a nivel molecular frente al ataque patogénico.
- Para comprender mejor sobre las estrategias de defensa de *A. mexicana*, se propone analizar la interacción planta-patógeno para saber si los hongos identificados son los responsables de la acumulación y biosíntesis de Sa, ya que las estrategias de defensa en la planta, depende del tipo de hongo patógeno hospedado en *A. mexicana*.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Hafez, S. I. I. (1985). Leaf surface fungi of *Argemone mexicana* growing in Saudi Arabia. *Cryptogamie. Mycologie*, 6(1), 69-78.
2. Ahmad, I., Hussain, T., Ashraf, I., Nafees, M., Maryam, R. M., y Iqbal, M. (2013). Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am Eurasian J Agric Environ Sci*, 13(4), 539-547.
3. Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., y Restrepo, J. (2009). Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*, 76(157), 109-121.
4. Berger, S., Benediktyová, Z., Matouš, K., Bonfig, K., Mueller, M. J., Nedbal, L., y Roitsch, T. (2007a). Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 58(4), 797-806 (B).
5. Berger, S., Sinha, A. K., y Roitsch, T. (2007b). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of experimental botany*, 58(15-16), 4019-4026 (A).
6. Brahmachari, G., Gorai, D., y Roy, R. (2013). *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 559-567.
7. Bribi, N. (2018). Pharmacological activity of alkaloids: A review. *Asian Journal of Botany*, 1(1), 1-6.
8. Bru, R., Sellés, S., Casado-Vela, J., Belchí-Navarro, S., y Pedreño, M. A. (2006). Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 65-71.
9. Canchignia Martínez, H., Cruz Rosero, N., Barrera Alvarez, A., Morante Carriel, J., Canchignia Malagón, G., y Peñafiel Jaramillo, M. (2015). Aplicación de rizobacterias que promueven el crecimiento en plantas (PGPR) del género "*Pseudomonas*" spp como

- controladores biológicos de insectos y nematodos-plagas. Ciencia y tecnología (Quevedo), 8(1), 25-35.
10. Castroviejo (1986). *Argemone mexicana*. Recuperado el 28 de diciembre de 2020 de: http://www.floraiberica.es/anthos_fotos/index.php
 11. Chaita, E., Gikas, E., y Aligiannis, N. (2017). Integrated HPTLC-based Methodology for the Tracing of Bioactive Compounds in Herbal Extracts Employing Multivariate Chemometrics. A Case Study on *Morus alba*. *Phytochemical Analysis*, 28(2), 125-131.
 12. De Matos Nunes, J., Bertodo, L. O. O., Da Rosa, L. M. G., Von Poser, G. L., y Rech, S. B. (2014). Stress induction of valuable secondary metabolites in *Hypericum polyanthemum* acclimatized plants. *South African Journal of Botany*, 94, 182-189.
 13. Desender, S., Andrivon, D., y Val, F. (2007). Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity. *Cellular microbiology*, 9(1), 21-30.
 14. Devanathan, K. (2020). *Argemone mexicana* L. Papaveraceae. *Ethnobotany of the Mountain Regions of Southeast Asia*, 1-13.
 15. Escobar-Chan Z. (2018). Análisis quimiométrico de la diversidad de alcaloides en tres especies del género *Argemone* L. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C (CICY). Mérida, Yucatán, México.
 16. Estrada Alfaro, N (2018). Validación de un método para la cuantificación de sanguinarina y berberina en *Argemone mexicana*, por cromatografía de capa fina-densitometría. - Mérida, Yucatán: UADY.
 17. Facchini, P. J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 29-66.
 18. Ferrari, S. (2010). Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals. In *Bio-farms for nutraceuticals* (pp. 152-166). Springer, Boston, MA.
 19. Gregianini, T. S., Porto, D. D., Nascimento, N. C. D., Fett, J. P., Henriques, A. T., y Fett-Neto, A. G. (2004). Environmental and ontogenetic control of accumulation of

- brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras*. Journal of Chemical Ecology, 30(10), 2023-2036.
20. Guízar González, C., Monforte-González, M., y Vázquez-Flota, F. (2016). Yeast extract induction of sanguinarine biosynthesis is partially dependent on the octadecanoic acid pathway in cell cultures of *Argemone mexicana* L., the Mexican poppy. Biotechnology letters, 38(7), 1237-1242.
 21. Hagel, J. M., y Facchini, P. J. (2013). Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. Plant and Cell Physiology, 54(5), 647-672.
 22. Halder, M., Sarkar, S., y Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. Engineering in life sciences, 19(12), 880-895.
 23. Holm LG, Plucknett DL, Pancho JV y Herberger JP. (1977). The World's Worst Weeds. Distribution and Biology. Honolulu, Hawaii, USA: University Press of Hawaii. pp.621 pp. Ref.p. 565-586.
 24. Kaur, G., Prakash, P., Srivastava, R., y Verma, P. C. (2021). Enhanced secondary metabolite production in hairy root cultures through biotic and abiotic elicitors. Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites: Fundamentals and Applications, 625-660.
 25. Kessler, A., y Baldwin, I. T. (2002). Plant responses to insect herbivory. Annu Rev Plant Biol, 53, 299-328.
 26. López Arnaldos, T., Muñoz, R., Ferrer, M. A., y Calderón, A. A. (2001). Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, cv. Chandler) callus culture. Physiologia Plantarum, 113(3), 315-322.
 27. Loyola Vargas, V. M., De-la-Peña, C., Galaz-Avalos, R. M., y Quiroz-Figueroa, F. R. (2008). Plant tissue culture. In Molecular Biomethods Handbook (875-904). Humana Press.
 28. Martínez Peralta Sixta Tulia y Ramírez Edilene. (2016). Determinación del contenido extra e intracelular de algunas enzimas líticas relacionadas con pared celular en raíces de

- clavel (*Dianthus caryophyllus* L). Revista Colombiana de Química, 45 (2):5
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.60370>
29. Martínez-Cruz, J., y Rueda, A. B. (2017). El estudio de los efectores, ¿La vía para descubrir nuevas dianas para fitoterapias antioídios? Encuentros en la Biología, 10(163), 237-239.
 30. Monforte González, M., Guízar-González, C., Rubio-Piña, J., Carrillo-Pech, M., y Vázquez-Flota, F. (2012). Berberine and sanguinarine quantitation in *Argemone mexicana* L (Papaveraceae) tissues by TLC-in situ fluorography. JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 25(4), 358-360.
 31. Monforte-González, M., Serrano-Gamboa, J., Guízar-González, C., Miranda-Ham, M., y Vázquez-Flota, F. A. (2019). Alkaloid synthesis is coupled to shoot morphogenesis in *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) in vitro cultures. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 55(6), 695-701.
 32. Narayani, M., y Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in *in vitro* plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. Phytochemistry Reviews, 16(6), 1227-1252.
 33. Newman, D. J., y Cragg, G. M. (2020). Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of natural products, 83(3), 770-803.
 34. O'Connor S. E. (2010). In Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology; Mander, L., Lui, H.-W., Eds.; Elsevier: Oxford, 2010; volume 1, pp. 977–1007.
 35. Oliver, R. P., y Ipcho, S. V. (2004). *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. Molecular Plant Pathology, 5(4), 347-352.
 36. Petrovska B. B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. Pharmacognosy Reviews, 6(11), 1–5. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
 37. Polonio Á., Pérez-García A., Martínez-Cruz J., Fernández-Ortuño D. y de Vicente A. (2020). The Haustorium of Phytopathogenic Fungi: A Short Overview of a Specialized Cell of Obligate Biotrophic Plant Parasites. En: Cánovas FM, Lüttge U., Risueño MC. y Pretzsch

-
- H. (eds) Progress in Botany Vol. 82. Progreso en botánica, vol. 82. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/124_2020_45
38. Ramachandra, R. S y Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20: 2, 101-153
 39. Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R., y Palazon, J. (2016). Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*, 21(2), 182. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21020182>
 40. Reich, E., y Schibli, A. (2006). High-performance Thin-layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants Thieme. New York: Thieme.
 41. Rubio Piña J y Vázquez-Flota F (2013). Pharmaceutical applications of the benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Curr Top Med Chem* 13:2200–2207
 42. Sabater Jara A. B. (2013). Estudio de las respuestas de defensa inducidas por elicitores en cultivos de células vegetales (Memoria doctoral). Universidad de Murcia
 43. Sánchez-Vallet A, Saleem-Batcha R, Kombrink A, Hansen G, Valkenburg D-J, Thomma BP y Mesters JR (2013). Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife* 2:e00790.
 44. Singh A y Dwivedi P (2018). Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(1): 750-757.
 45. Singh, S., Pandey, VB y Singh, TD (2012). Alcaloides y flavonoides de *Argemone mexicana*. *Investigación de productos naturales*, 26 (1), 16-21.
 46. Thakur M; Bhattacharya S, Kumar Khosla P y Puri S. (2018). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* (12) 1–12.
 47. Thomma BPHJ, Penninckx IA, Broekaert WF y Cammue BP. (2001). The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*, *Current Opinion in Immunology*. 13 (63-68).

48. Trujillo-Villanueva K, Rubio-Piña J, Monforte-González M y Vázquez-Flota F. (2010). *Fusarium oxysporum* homogenates and jasmonate induce a limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnol Lett* 32:1005–1009. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0252-6>
49. Trujillo-Villanueva K, Rubio-Piña J, Monforte-González M, Ramírez-Benítez E y Vázquez-Flota F. (2012). The sequential exposure to jasmonate, salicylic acid and yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnol Lett.* 34(2): 379-385.
50. Vázquez-Flota, F., Rubio-Piña, J., Xool-Tamayo, J., Vergara-Olivares, M., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., Guizar-González C. y Mirón-López, G. (2018). Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Revista fitotecnia mexicana*, 41(1), 13-21.
51. Verhagen, B., Trotel, P., Couderchet, M., Hofte, M. y Aziz, A. 2009. *Pseudomonas* spp, induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany* 12: 1-12.
52. Virsen Tawre GR, Lokesh K y Pal Jain A. (2019). Compressive review on plant profile, phytochemistry and pharmacology of *Argemone mexicana* Linn. *Journal of the Gujarat Research Society.* 21, 1292 -1308.
53. Voegelé, R. T., y Mendgen, K. (2003). Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. *New Phytologist*, 159(1), 93-100. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00761.x>
54. Waterman, P. G. (1998). Alkaloid chemosystematics. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 50, pp. 537-565). Academic Press.
55. Xool-Tamayo J, Monforte-González M, Serrano-Gamboa G, Mirón-López G, Vázquez-Flota F (2014) Synthesis of alkaloids in *Argemone mexicana* developing seedlings. In: ASPB 2014 Plant Biology Meeting, Portland: Abstracts, P. 39026-B
56. Xool-Tamayo, J., Serrano-Gamboa, G., Monforte-González, M., Mirón-López, G., y Vázquez-Flota, F. (2017). Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity *in*

in vitro rootless shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy. *Biotechnology letters*, 39(2), 323-330. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2250-9>

ANEXOS

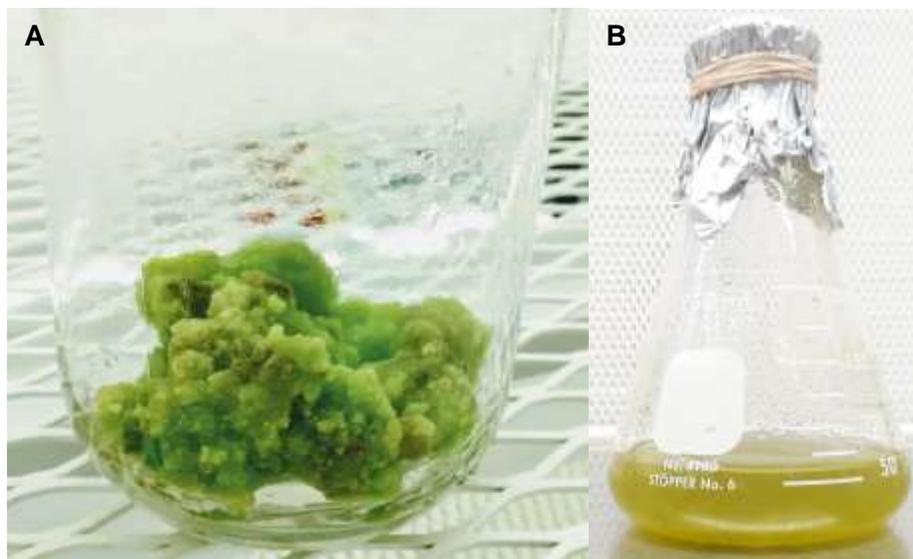
6.1. ASPECTO DE LOS CULTIVOS *IN VITRO* DE *A. mexicana* L.

Figura A.1. Aspecto de callos (A) y suspensiones celulares (B) de la línea AM1 de *A. mexicana* L.

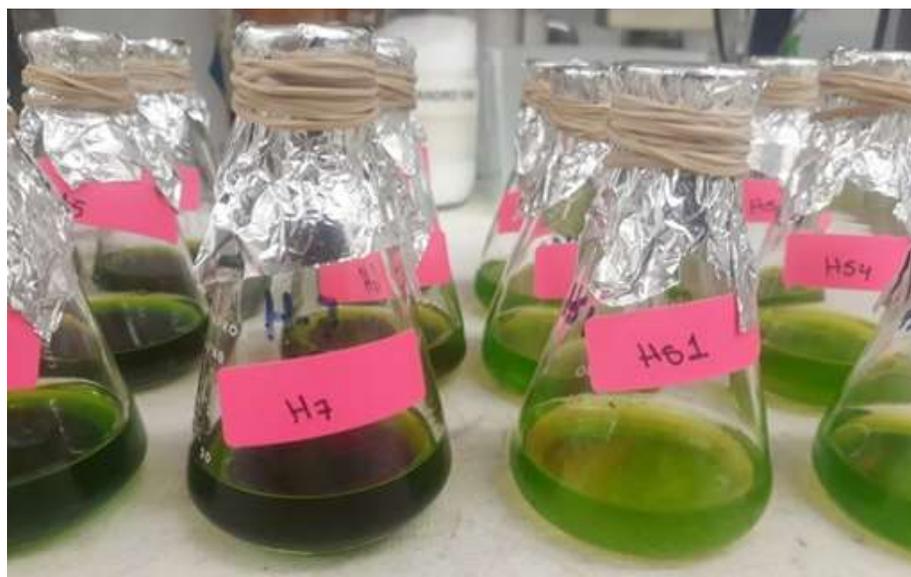


Figura A.2. Aspecto de la extracción de alcaloides a partir de los cultivos *in vitro* de la línea AMME *A. mexicana* L.

6.2. PARÁMETROS DE LA CORRELACIÓN LINEAL DE LOS ESTÁNDARES DE ALCALOIDES.

Cuadro A.1. Parámetros de correlación lineal para los alcaloides analizados en este trabajo. LLD, límite de detección, LDC, límite de cuantificación; ambos en ng/punto en la placa; b y m corresponden a la ordenada al origen y pendiente, respectivamente, de acuerdo la función $y = m(x) + b$; r^2 , coeficiente de regresión. Tomado de Estrada-Alfaro, 2018.

Alcaloide	LLD	LDC	b	m	r^2
Be	1.19 ng/punto	3.9 ng/punto	17.481	15.07	0.997
Que			526.88	194.23	0.994
Sa	1.06 ng/punto	3.5 ng/punto	3.8567	14.146	0.998

6.3. ANÁLISIS POR CCF DEL CONTENIDO DE SA DE CALLOS EN MEDIO LÍQUIDO DE *A. mexicana* L.

Dado la formación de dos grupos al tratar de realizar el experimento de inducción se monitoreó el contenido de Sa a las 0 y 168 hrs. en los cultivos a partir de los cuales se generó la línea AMME. Se incluyeron muestras de los callos que no mostraron ninguna respuesta en medio líquido (carriles 4 y 8-10 en la Figura A.4. A y B), los que cambiaron de coloración (carriles 3 y 11-13 en la Figura A.4. A y B) y los utilizados al inicio (carriles 2 y 3-7 en la Figura A.4. A y B). La figura 3.4 muestra el perfil cromatográfico en los sistemas 1 y 2, que permiten la separación de Be y Sa, respectivamente. La presencia de Sa se observa como una mancha amarilla, a la misma altura que el estándar. Este alcaloide se pudo detectar, de manera tenue, en los cultivos iniciales (carriles 3-7; Figura A.4. B), así como en los cultivos que no mostraron ningún cambio (carriles 8-10; Figura A.4. B) y en mayor medida en el grupo que mostró la respuesta de coloración espontánea (carriles 11-13; Figura A.4. B). En las condiciones del análisis, no se observaron otras bandas en este sistema de disolventes. No se observó la presencia de Be en ninguna de las muestras incluidas (Figura A.4. A) como lo refieren otros trabajos (Escobar-Chan, 2018; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2012; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

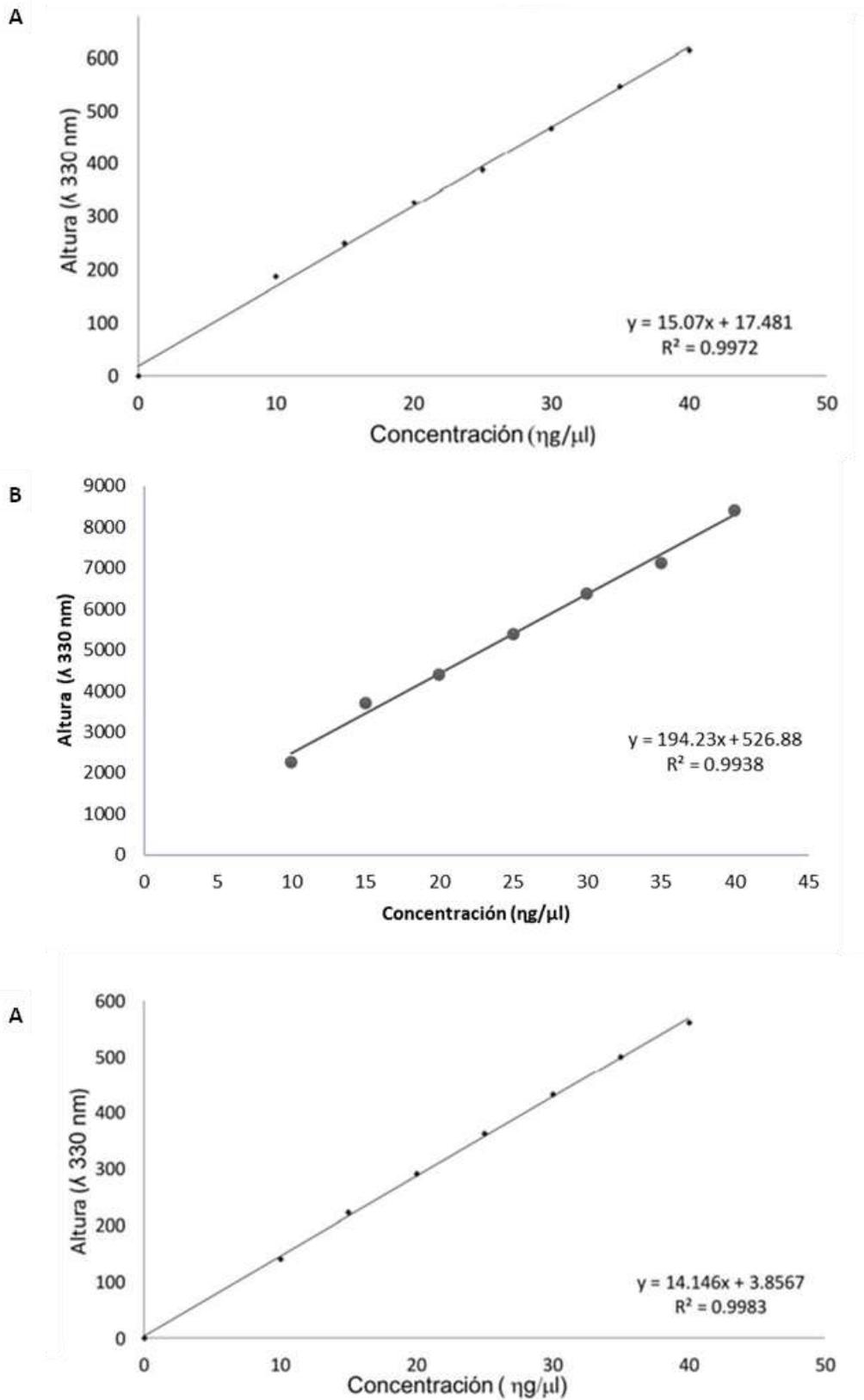


Figura A.3. Curvas de calibración para Sa (A), Que (B) y Be (C).

El grupo control al que denominamos sin daño mecánico (DMT7) debido a que no presentó cambios en la coloración del medio los niveles encontrados de Sa fueron bajos (0.054 mg/g PS), mientras que para el grupo con daño mecánico (DM) los niveles encontrados de Sa fueron de 0.685 mg/g PS un nivel comparable con los resultados obtenidos en la inducción simultánea con MeJA y EL a las 96 hrs. de exposición (0.750 mg/g PS) (Cuadro A.3. y Figura A.5.).

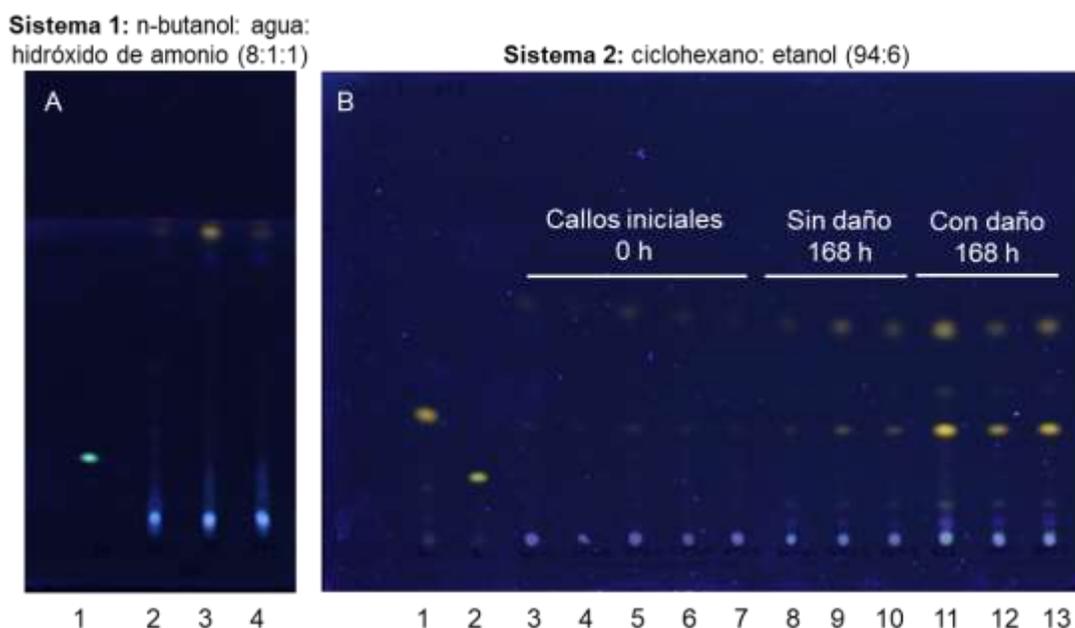


Figura A.4. Detección de Be (A) y Sa (B) durante la obtención de la línea de suspensiones celulares de AMME a partir de callos. (A) Carril 1) estándar de Be; 2) Callos iniciales; 3) células afectadas a las 168 hrs; 4) células no afectadas a las 168 hrs. (B) Carril 1 y 2) estándares de Sa y Que; 3-7) Callos iniciales; 8-10) células no afectadas a las 168 hrs; 11-13) células afectadas a las 168 hrs.

Cuadro A.2. Contenido de Sa en callos en medio líquido de la línea AMME de *A. mexicana* L. Experimento de daño mecánico en la línea celular. Promedio de triplicados con desviación estándar.

Inducción de callos en medio líquido		
Tratamiento	Tiempo de exposición / Contenido de Sa (mg/g PS)	
	0 hrs.	168 hrs.
DM7: Daño mecánico	ND: por debajo del límite de detección	0.685 ± 0.313
DMT7: Grupo control sin daño mecánico	ND: por debajo del límite de detección	0.054 ± 0.040

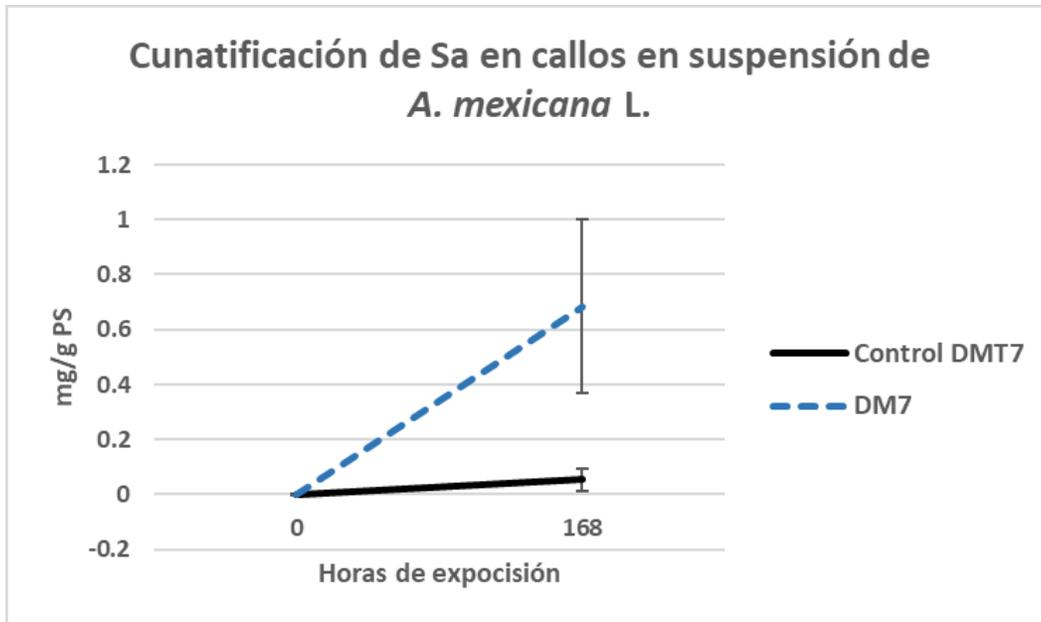


Figura A.5: Contenido de Sa en los callos en medio líquido de la línea AMME de *A. mexicana* L. Promedio de triplicados con desviación estándar. DMT7: Grupo control, DM7: Daño mecánico.

6.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL CONTENIDO DE SA EN PLANTAS COLECTADAS EN POBLACIÓN INFECTADA, ASINTOMÁTICA Y SANA DE *A. mexicana* L.



Figura A.6: Contenido de Sa en hojas de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. La población asintomática y sana presentaron valores por debajo del límite de cuantificación (0.005 mg/g PS).

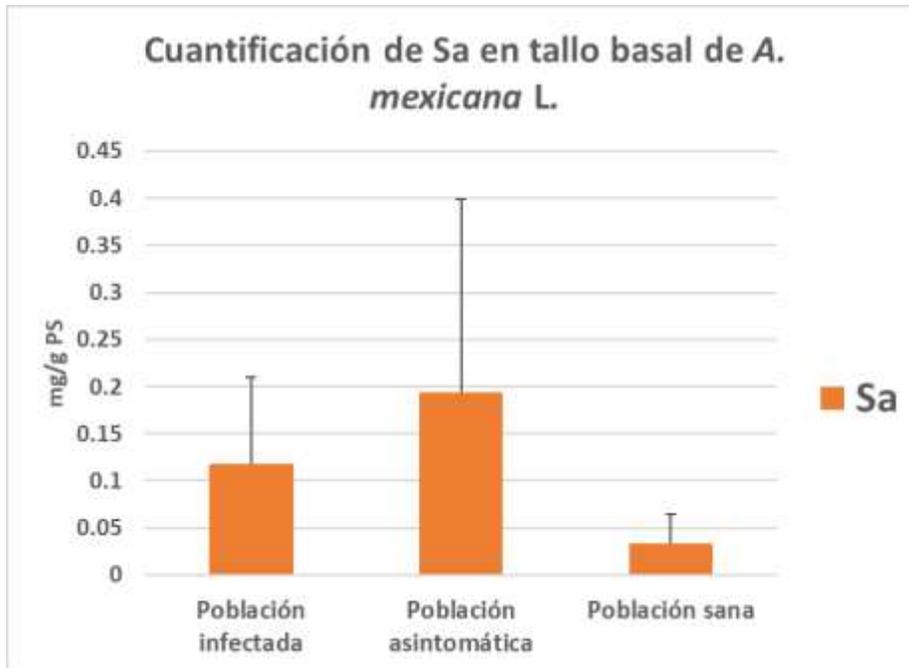


Figura A.7: Contenido de Sa en tallo basal de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar.

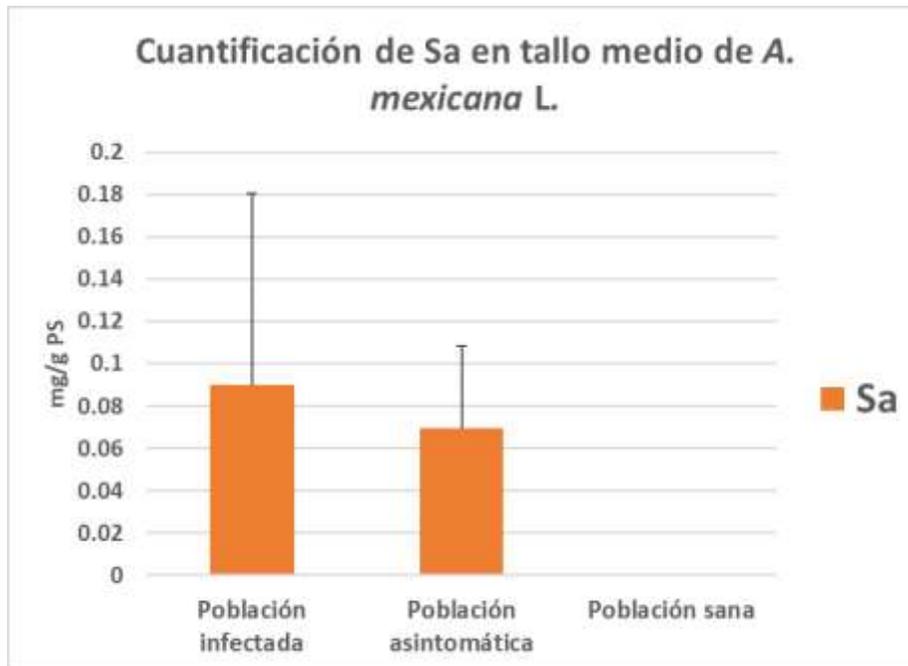


Figura A.8: Contenido de Sa en tallo medio de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. La población sana presentó valores por debajo del límite de cuantificación (0.005 mg/g PS).

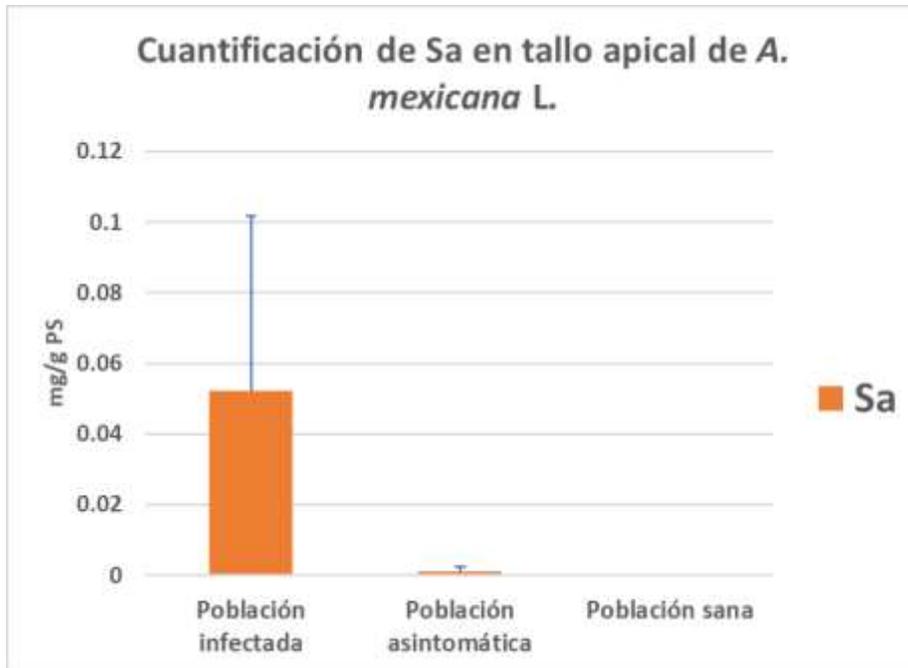


Figura A.9: Contenido de Sa en tallo apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. La población asintomática y sana presentaron valores por debajo del límite de cuantificación (0.005 mg/g PS).

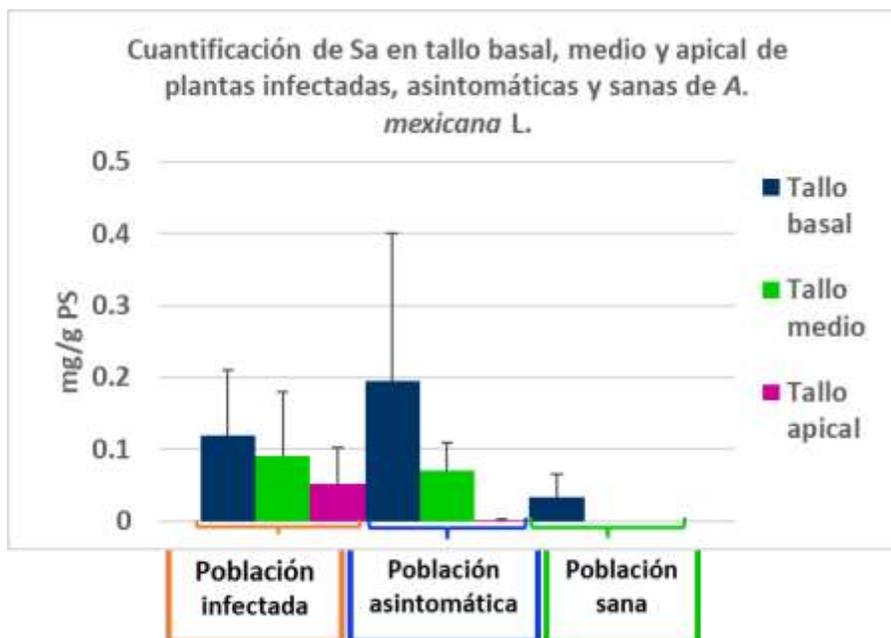


Figura A.10: Contenido de Sa en tallos de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos comparar mejor los niveles encontrados de Sa en los tallos de cada población.

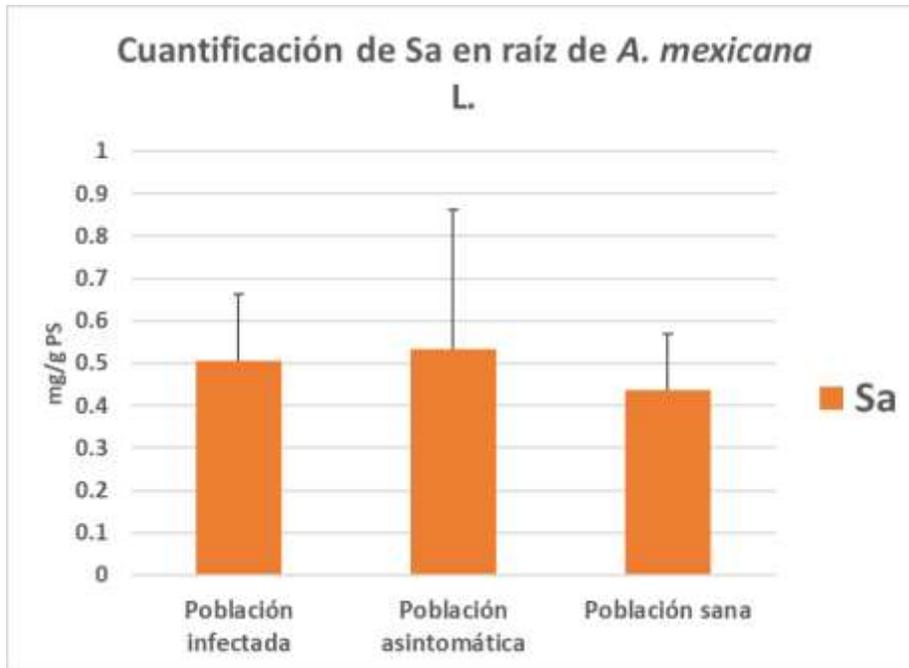


Figura A.11: Contenido de Sa en raíz de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar.



Figura A.12: Contenido de Sa en raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar.

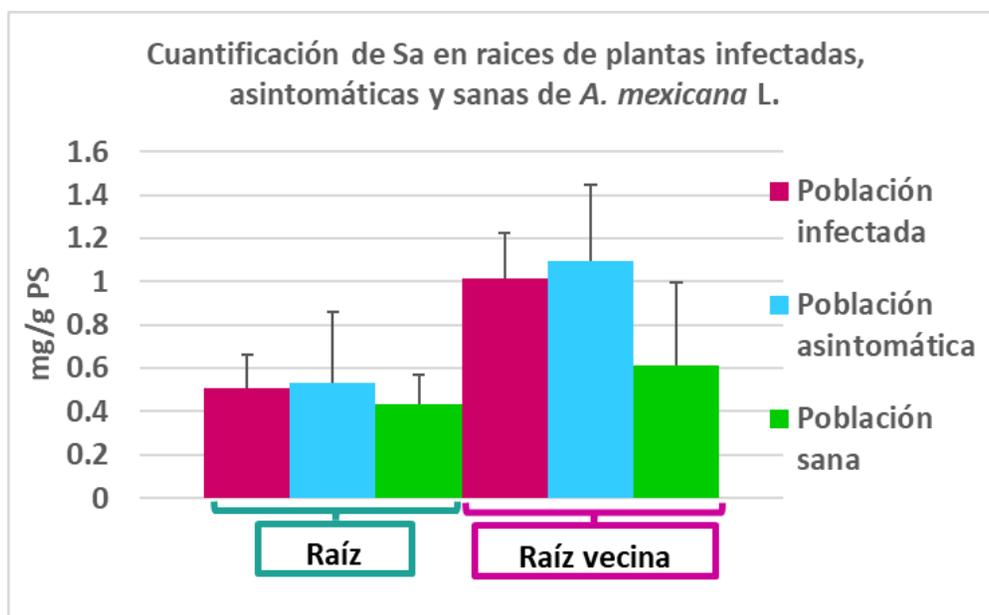


Figura A.13: Contenido de Sa en raíces de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que tanto la población infectada y asintomática presenta niveles similares de Sa.

6.4.1. Análisis estadístico del contenido de Sa en plantas infectadas de *A. mexicana* L.

Cuadro A.3. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Sa en hojas de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	30	0.144128	70.8	6.50
Asintomática	30	0.000000	34.1	-2.93
Sana	30	0.000000	31.6	-3.56
General	90		45.5	
Prueba				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H	Valor p	
No ajustado para empates	2	42.34	0.000*	

*estadísticamente significativo

Cuadro A.4. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Sa en hojas entre cada población.

H ₀ :		$\eta_1 - \eta_2 = 0$	
H ₁ :		$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$	
α :		0.05	
Método		Valor W	Valor p
Infectada/Asintomática	No ajustado para empates	1289.00	0.000*
Infectada/Sana	No ajustado para empates	1300.00	0.000*
Asintomática/Sana	No ajustado para empates	946.50	0.647

*estadísticamente significativo

Cuadro A.5. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Sa en tallos de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas para tallo basal				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.106719	5.3	0.26
Asintomática	3	0.120350	6.3	1.03
Sana	3	0.039722	3.3	-1.29
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para tallo medio				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.0882585	6.7	1.29
Asintomática	3	0.0782244	6.3	1.03
Sana	3	0.0000000	2.0	-2.32
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para tallo apical				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.0476620	8.0	2.32
Asintomática	3	0.0007490	4.5	-0.39
Sana	3	0.0000000	2.5	-1.94
General	9		5.0	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :		0.05		
H ₀ :		Todas las medianas son iguales		
H ₁ :		Al menos una mediana es diferente		
Método		GL	Valor H	Valor p
Tallo basal		2	1.87	0.393
Tallo medio	No ajustado para empates	2	5.42	0.066
Tallo apical	No ajustado para empates	2	6.20	0.045*

*estadísticamente significativo

Cuadro A.6. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Sa en tallos entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$					
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$					
Método	Valor W			Valor p		
	T. basal	T. medio	T. apical	T. basal	T. medio	T. apical
Infectada/Asintomática	9.00	11.00	15.00	0.663	1.00	0.081
Infectada/Sana	13.00	X	X	0.383	X	X
Asintomática/Sana	13.00	X	X	0.383	X	X

X: No se pudieron hacer las comparaciones por la ausencia de datos en la población sana.

Cuadro A.7. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Sa en raíces de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas para raíz				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.468288	5.7	0.52
Asintomática	3	0.444451	5.0	0.00
Sana	3	0.401576	4.3	-0.52
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para raíz vecina				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.962252	5.7	0.52
Asintomática	3	0.932741	6.0	0.77
Sana	3	0.468128	3.3	-1.29
General	9		5.0	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H		Valor p
Raíz	2	0.36		0.837
Raíz vecina	2	1.69		0.430

Cuadro A.8. Prueba de Kruskal-Wallis, niveles de Sa en raíces.

Estadísticas descriptivas para raíces infectadas				
Órgano	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.468288	2.0	-1.96
Raíz vecina	3	0.962252	5.0	1.96
General	6		3.5	
Estadísticas descriptivas para raíces asintomáticas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.444451	2.3	-1.53
Raíz vecina	3	0.932741	4.7	1.53
General	6		3.5	
Estadísticas descriptivas para raíces sanas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.401576	3.0	-0.65
Raíz vecina	3	0.468128	4.0	0.65
General	6		3.5	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H		Valor p
Raíces infectadas	1	3.86		0.050
Raíces asintomáticas	1	2.33		0.127
Raíces sanas	1	0.43		0.513

Cuadro A.9. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Sa en raíces entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$	
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$	
Método	Valor W	Valor p
Raíz/Raíz vecina infectada	6.00	0.081
Raíz/Raíz vecina asintomática	7.00	0.190
Raíz/Raíz vecina Sana	9.00	0.663

6.5. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL CONTENIDO DE BE EN PLANTAS COLECTADAS EN POBLACIÓN INFECTADA, ASINTOMÁTICA Y SANA DE *A. mexicana* L.

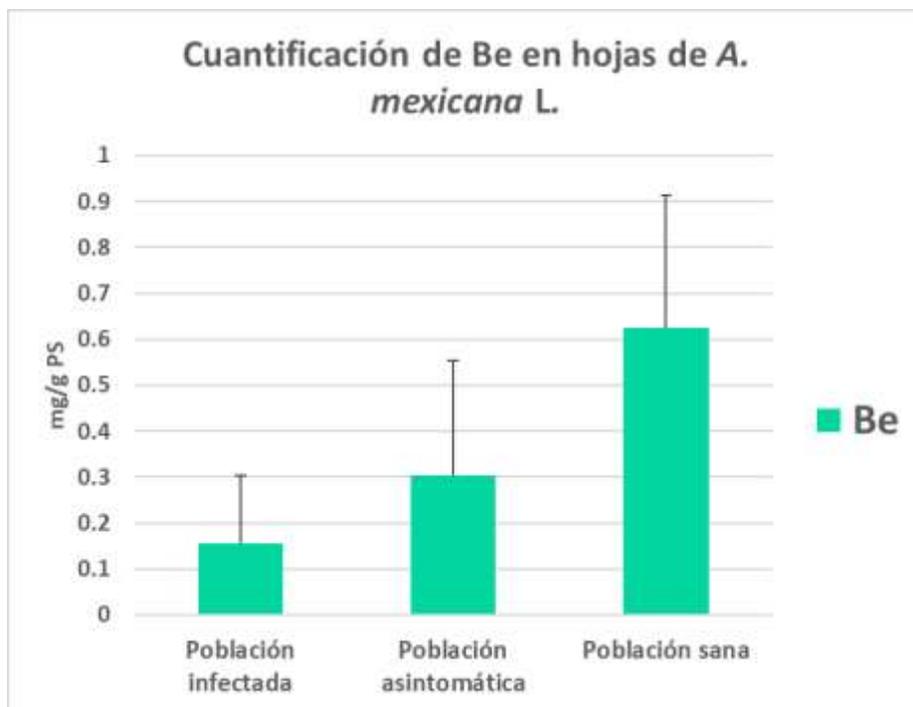


Figura A.14: Contenido de Be en hojas de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población sana.

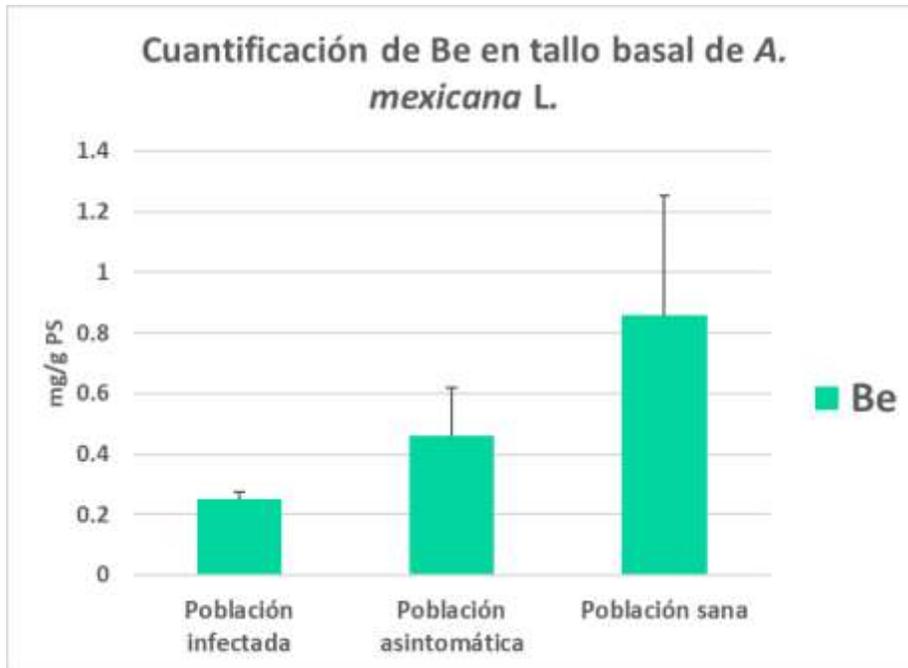


Figura A.15: Contenido de Be en tallo basal de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población sana.

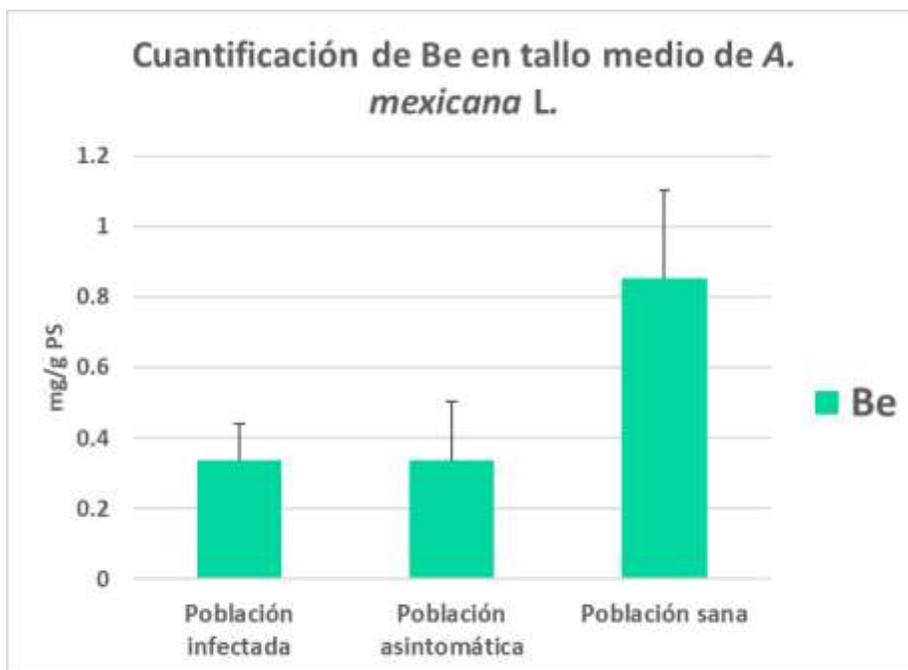


Figura A.16: Contenido de Be en tallo medio de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población sana, mientras que la población infectada y asintomática presentan niveles similares.

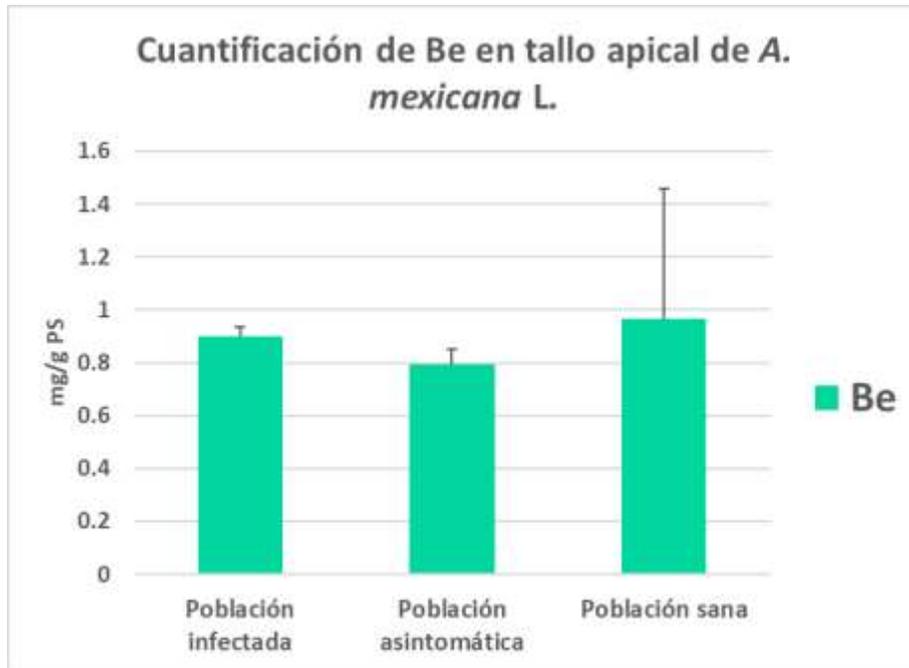


Figura A.17: Contenido de Be en tallo apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población sana, seguido de la población infectada y asintomática presentando niveles similares en las tres poblaciones.

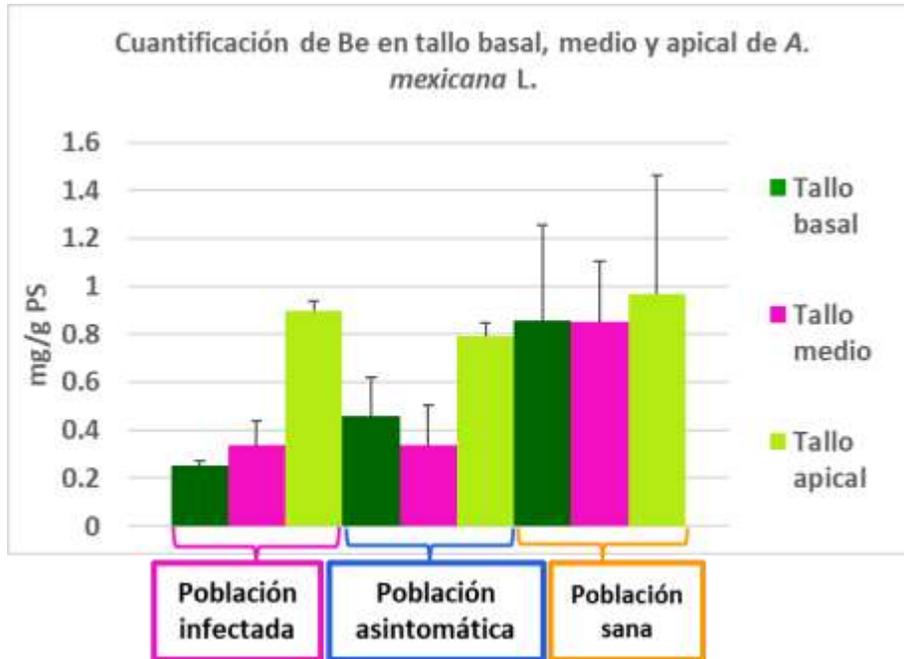


Figura A.18: Contenido de Be en tallo basal, medio y apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población sana, tanto en tallo basal, medio y apical, seguido de la población asintomática e infectada.

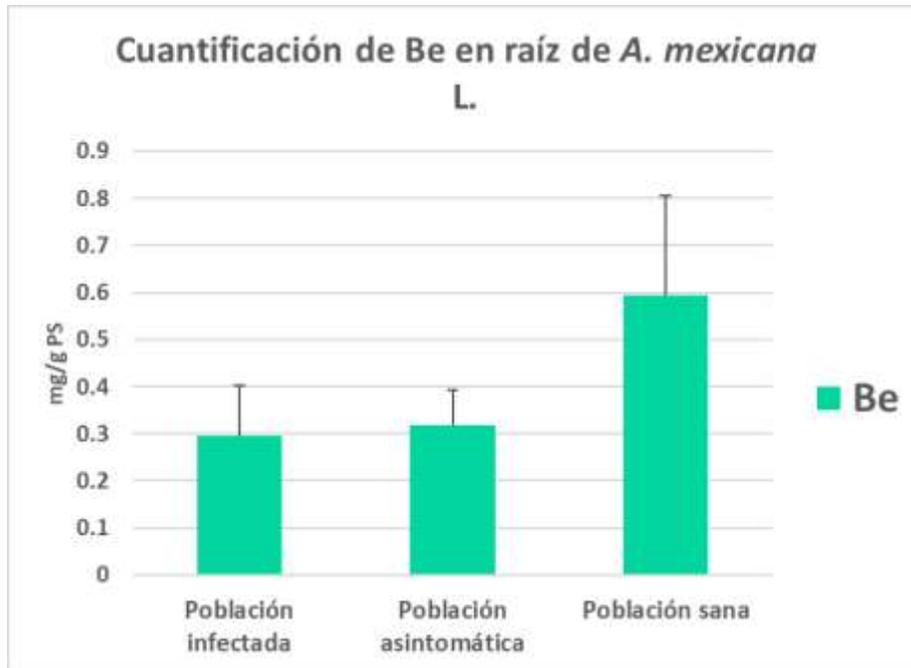


Figura A.19: Contenido de Be en raíz de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población sana, seguido de la población asintomática e infectada, presentando niveles similares en la población infectada y asintomática.

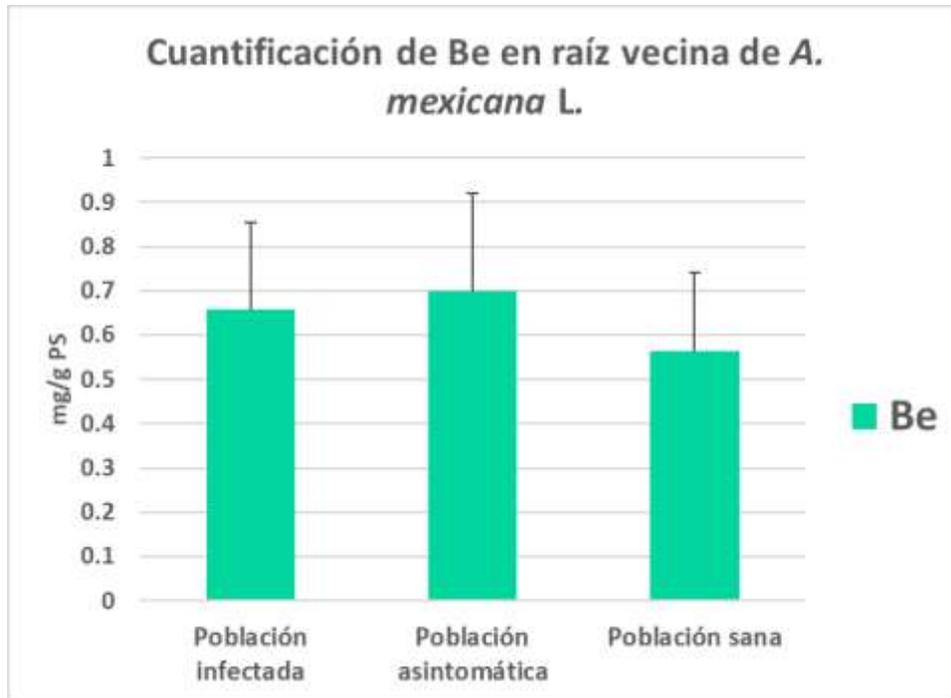


Figura A.20: Contenido de Be en raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población infectada y asintomática presentando niveles similares, mientras que la población sana presentó niveles más bajos.

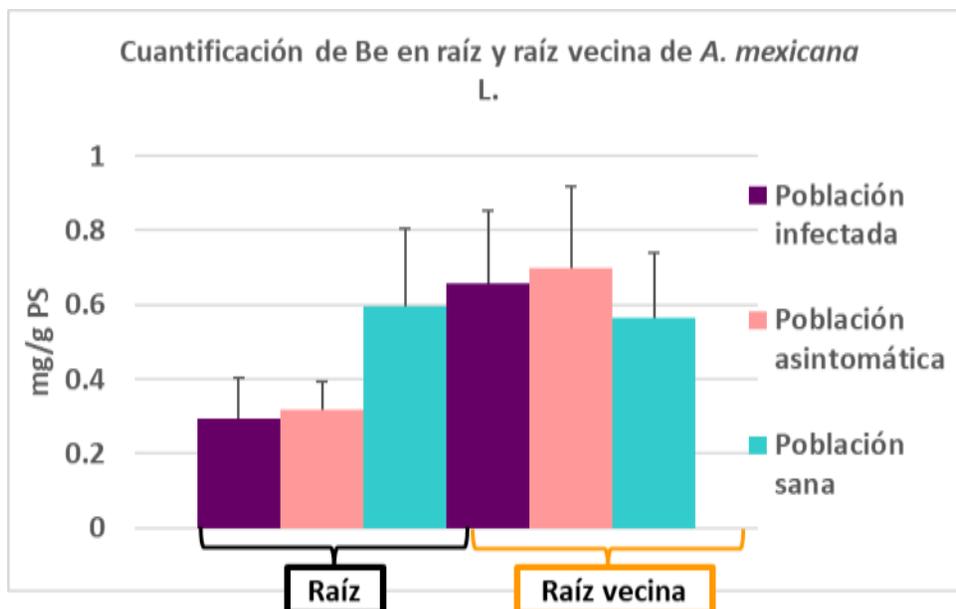


Figura A.21: Contenido de Be en raíz y raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que los niveles más altos fueron encontrados en la población infectada y asintomática presentando niveles similares, mientras que la población sana presentó niveles más bajos.

6.5.1. Análisis estadístico del contenido de Be en plantas infectadas de *A. mexicana* L.

Cuadro A.10. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Be en hojas de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	30	0.119998	25.2	-5.20
Asintomática	30	0.262559	41.4	-1.04
Sana	30	0.509497	69.8	6.25
General	90		45.5	
Prueba				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H	Valor p	
No ajustado para empates	2	44.81	0.000*	

*estadísticamente significativo

Cuadro A.11. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Be en hojas entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$		
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$		
Método		Valor W	Valor p
Infectada/Asintomática	No ajustado para empates	720.00	0.004*
Infectada/Sana		502.00	0.000*
Asintomática/Sana	No ajustado para empates	598.00	0.000*

*estadísticamente significativo

Cuadro A.12. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Be en tallos de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas para tallo basal				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.263757	2.0	-2.32
Asintomática	3	0.538757	5.7	0.52
Sana	3	0.803628	7.3	1.81
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para tallo medio				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.383335	3.7	-1.03
Asintomática	3	0.373239	3.3	-1.29
Sana	3	0.974748	8.0	2.32
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para tallo apical				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.88120	6.0	0.77
Asintomática	3	0.78967	3.0	-1.55
Sana	3	1.05211	6.0	0.77
General	9		5.0	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H		Valor p
Tallo basal	2	5.96		0.051
Tallo medio	2	5.42		0.066
Tallo apical	2	2.40		0.301

Cuadro A.13. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Be en tallos entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$					
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$					
Método	Valor W			Valor p		
	T. basal	T. medio	T. apical	T. basal	T. medio	T. apical
Infectada/Asintomática	6.00	11.00	15.00	0.081	1.00	0.081
Infectada/Sana	6.00	6.00	9.00	0.081	0.081	0.663
Asintomática/Sana	8.00	6.00	9.00	0.383	0.081	0.663

Cuadro A.14. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Be en raíces de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas para raíz				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.468288	5.7	0.52
Asintomática	3	0.444451	5.0	0.00
Sana	3	0.401576	4.3	-0.52
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para raíz vecina				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.611725	5.7	0.52
Asintomática	3	0.769348	5.7	0.52
Sana	3	0.461810	3.7	-1.03
General	9		5.0	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H		Valor p
Raíz	2	0.36		0.837
Raíz vecina	2	1.07		0.587

Cuadro A.15. Prueba de Kruskal-Wallis. Niveles de Be en raíces por población.

Estadísticas descriptivas para raíces infectadas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.330063	2.0	-1.96
Raíz vecina	3	0.611725	5.0	1.96
General	6		3.5	
Estadísticas descriptivas para raíces asintomáticas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.279820	2.0	-1.96
Raíz vecina	3	0.769348	5.0	1.96
General	6		3.5	
Estadísticas descriptivas para raíces sanas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.641525	3.7	0.22
Raíz vecina	3	0.461810	3.3	-0.22
General	6		3.5	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H		Valor p
Raíces infectadas	1	3.86		0.050
Raíces asintomáticas	1	3.86		0.050
Raíces sanas	1	0.05		0.827

Cuadro A.16. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Be en raíces entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$	
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$	
Método	Valor W	Valor p
Raíz/Raíz vecina infectada	6.00	0.081
Raíz/Raíz vecina asintomática	6.00	0.081
Raíz/Raíz vecina Sana	11.00	1.000

6.6. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL CONTENIDO DE QUE EN PLANTAS COLECTADAS EN POBLACIÓN INFECTADA, ASINTOMÁTICA Y SANA DE *A. mexicana* L.

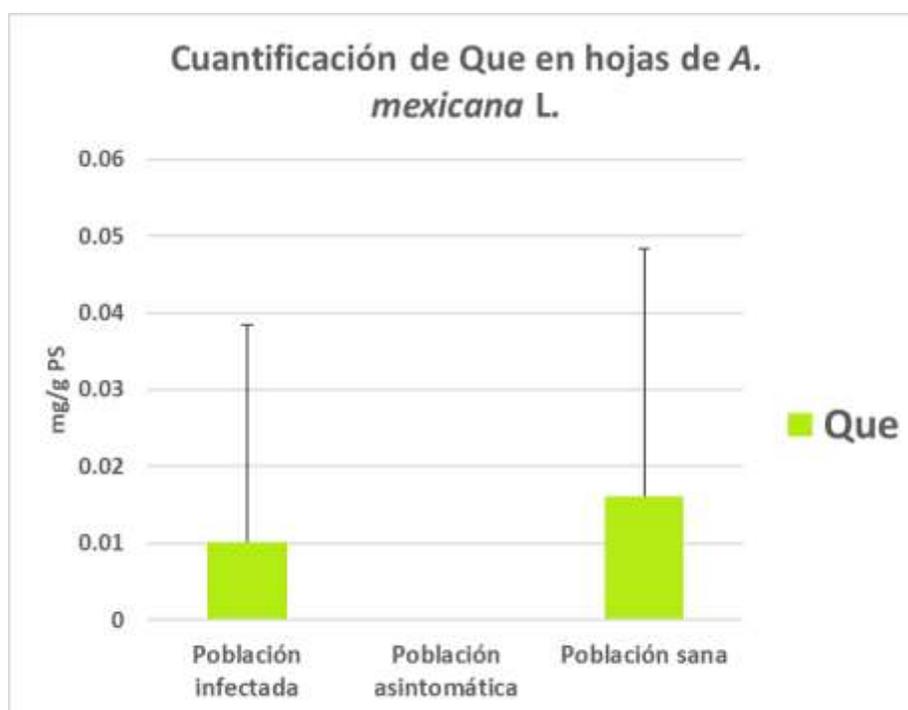


Figura A.22: Contenido de Que en hojas de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que la población sana presentó niveles más altos que la población infectada, mientras que en la población asintomática no fue posible detectarlo.

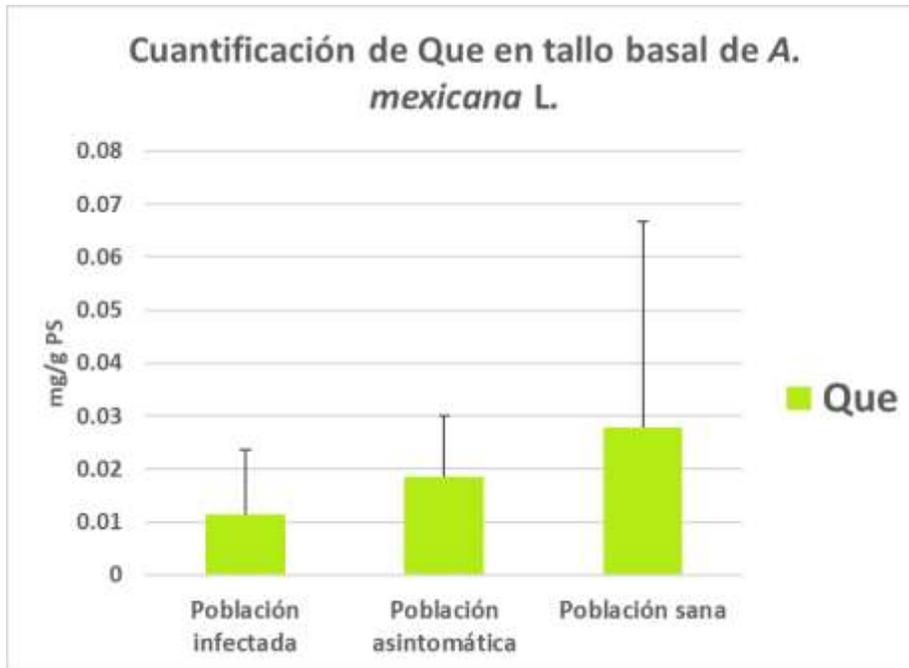


Figura A.23: Contenido de Que en tallo basal de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que la población sana presentó niveles más altos seguido de la población asintomática y sana.

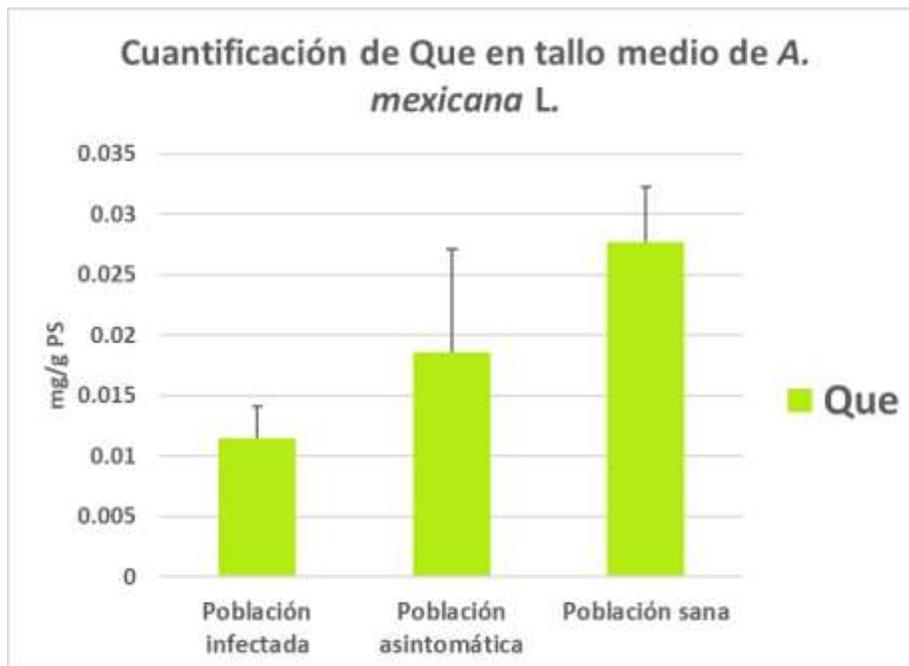


Figura A.24: Contenido de Que en tallo medio de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que la población asintomática presentó niveles más altos seguido de la población sana e infectada.

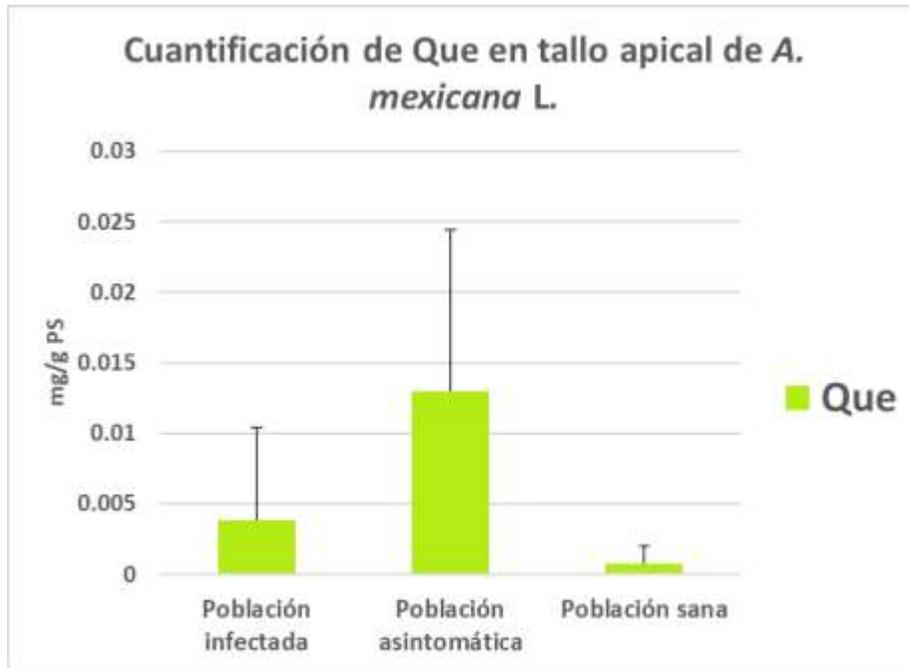


Figura A.25: Contenido de Que en tallo apical de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que la población asintomática presentó niveles más altos que la población infectada y sana.

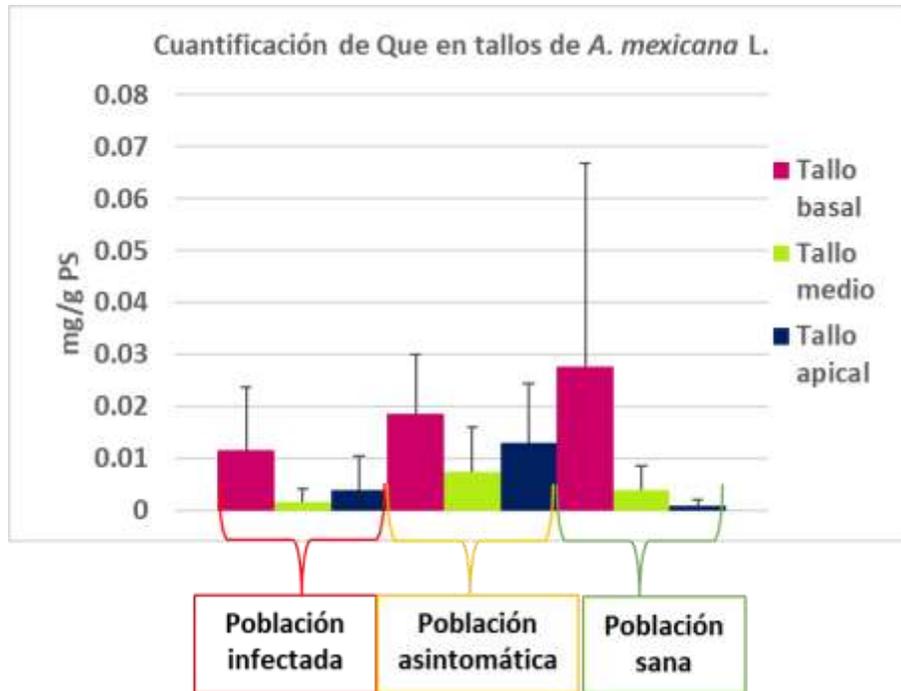


Figura A.26: Contenido de Que en tallos (basal, medio y apical) de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos comparar cada población y observaremos que los tallos basales presentaron los niveles más altos de Que siendo la población sana la principal.

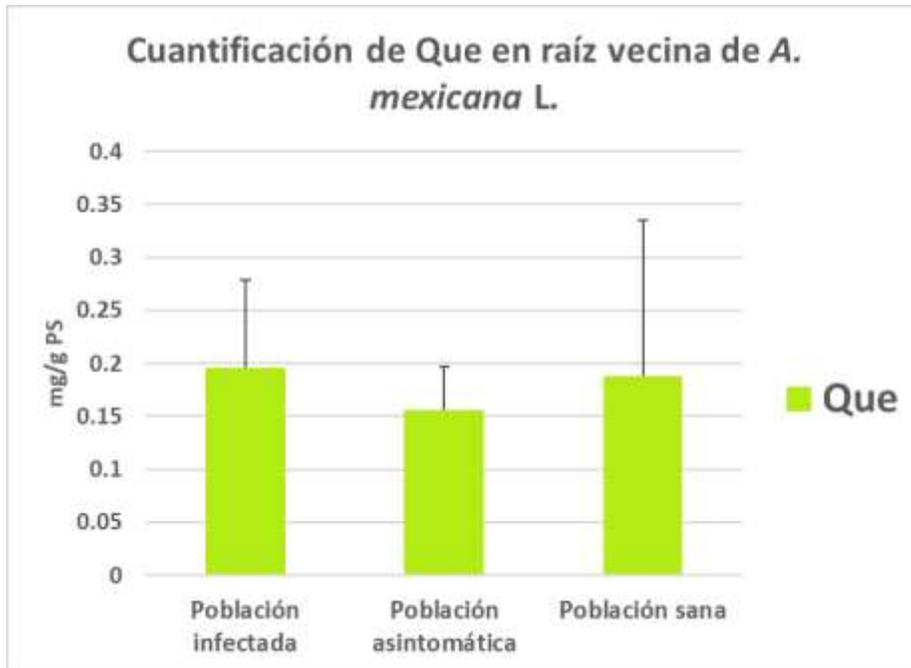


Figura A.27: Contenido de Que en raíz de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que la población sana presentó niveles más altos que la población sana, mientras que en la población asintomática no fue posible detectarlo.

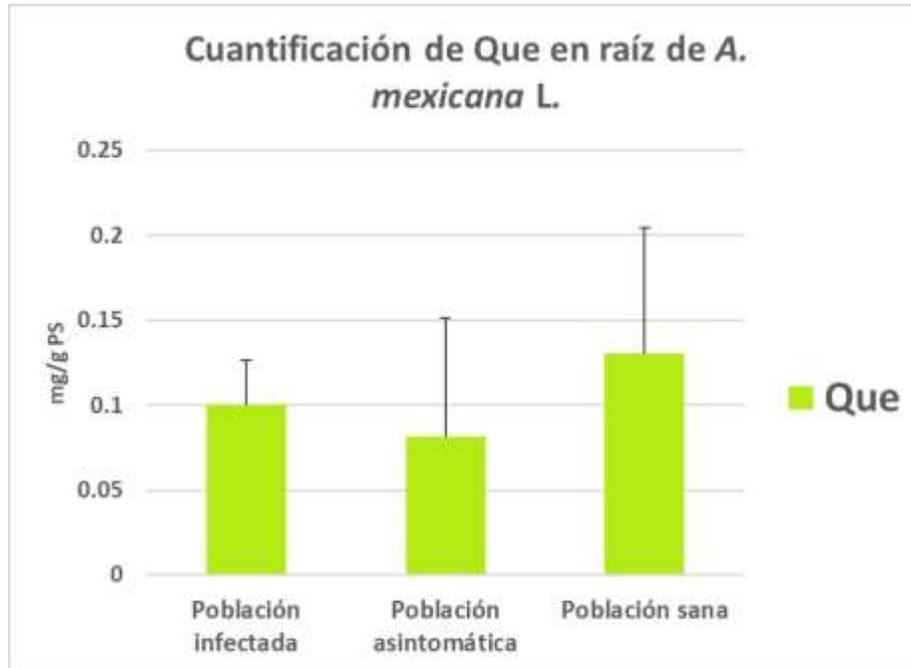


Figura A.28: Contenido de Que en raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que la población sana presentó niveles más altos que la población sana, mientras que en la población asintomática no fue posible detectarlo.

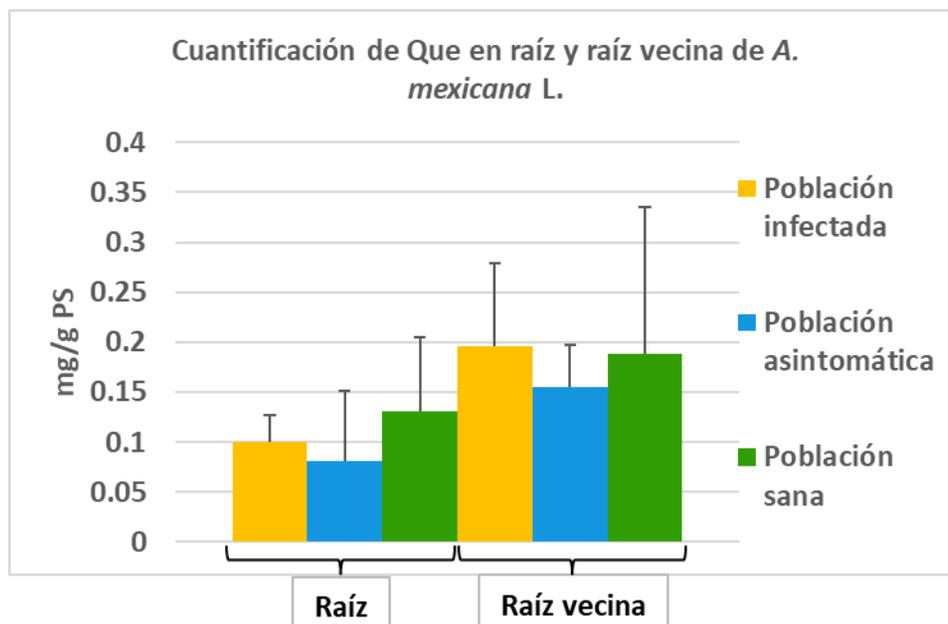


Figura A.29: Contenido de Que en raíz y raíz vecina de *A. mexicana* L. colectadas en población infectada, asintomática y sana. Promedio de triplicados con desviación estándar. Podemos observar que la población sana presentó niveles más altos que la población sana, mientras que en la población asintomática no fue posible detectarlo.

6.1.6.1. Análisis estadístico del contenido de Que en plantas infectadas de *A. mexicana*

L.

Cuadro A.17. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Que en hojas de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	30	0	50.9	1.38
Asintomática	30	0	36.5	-2.31
Sana	30	0	49.1	0.93
General	90		45.5	
Prueba				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H	Valor p	
No ajustado para empates	2	5.41	0.067	

Cuadro A.18. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Que en hojas entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$		
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$		
Método		Valor W	Valor p
Infectada/Asintomática	No ajustado para empates	720.00	0.004*
Infectada/Sana		502.00	0.000*
Asintomática/Sana	No ajustado para empates	598.00	0.000*

*estadísticamente significativo

Cuadro A.19. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Que en tallos de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas para tallo basal				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.0102785	3.8	-0.90
Asintomática	3	0.0132781	6.0	0.77
Sana	3	0.0108193	5.2	0.13
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para tallo medio				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.0000000	3.7	-1.03
Asintomática	3	0.0053113	6.2	0.90
Sana	3	0.0027775	5.2	0.13
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para tallo apical				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.0002202	4.8	-0.13
Asintomática	3	0.0171780	6.5	1.16
Sana	3	0.0000000	3.7	-1.03
General	9		5.0	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método		GL	Valor H	Valor p
Tallo basal	No ajustado para empates	2	0.96	0.620
Tallo medio	No ajustado para empates	2	1.27	0.531
Tallo apical	No ajustado para empates	2	1.62	0.444

Cuadro A.20. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Que en tallos entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$					
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$					
Método	Valor W			Valor p		
	T. basal	T. medio	T. apical	T. basal	T. medio	T. apical
Infectada/Asintomática	8.00	8.00	8.50	0.383	0.383	0.513
Infectada/Sana	9.50	9.00	12.00	0.827	0.663	0.663
Asintomática/Sana	11.00	11.50	13.00	1.000	0.827	0.383

Cuadro A.21. Prueba de Kruskal-Wallis. Niveles de Que en raíces por población.

Estadísticas descriptivas para raíz				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.098943	5.0	0.00
Asintomática	3	0.042833	3.7	-1.03
Sana	3	0.133444	6.3	1.03
General	9		5.0	
Estadísticas descriptivas para raíz vecina				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Infectada	3	0.160428	6.0	0.77
Asintomática	3	0.152414	4.7	-0.26
Sana	3	0.117100	4.3	-0.52
General	9		5.0	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H		Valor p
Raíz	2	1.42		0.491
Raíz vecina	2	0.62		0.733

Cuadro A.22. Análisis estadístico (Kruskal-Wallis), de los contenidos de Que en raíces de *A. mexicana* L. de las diferentes poblaciones.

Estadísticas descriptivas para raíces infectadas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.098943	2.0	-1.96
Raíz vecina	3	0.160428	5.0	1.96
General	6		3.5	
Estadísticas descriptivas para raíces asintomáticas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.042833	2.7	-1.09
Raíz vecina	3	0.152414	4.3	1.09
General	6		3.5	
Estadísticas descriptivas para raíces sanas				
Población	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Raíz	3	0.133444	3.3	-0.22
Raíz vecina	3	0.117100	3.7	0.22
General	6		3.5	
Prueba para tallo basal, medio y apical				
α :	0.05			
H_0 :	Todas las medianas son iguales			
H_1 :	Al menos una mediana es diferente			
Método	GL	Valor H		Valor p
Raíces infectadas	1	3.86		0.050
Raíces asintomáticas	1	1.19		0.275
Raíces sanas	1	0.05		0.827

Cuadro A.23. Prueba de Mann-Whitney para comparación de los niveles de Que en hojas entre cada población.

H_0	$\eta_1 - \eta_2 = 0$	
H_1	$\eta_1 - \eta_2 \neq 0$	
Método	Valor W	Valor p
Raíz/Raíz vecina infectada	6.00	0.081
Raíz/Raíz vecina asintomática	8.00	0.383
Raíz/Raíz vecina Sana	10.00	1.000