



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

Inducción de la síntesis de alcaloides en cultivos *in vitro* y hojas de *Argemone mexicana* expuestos a preparaciones de hongos fitopatógenos

Tesis que presenta

Julia Sarahí Balam Díaz

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular

Mérida, Yucatán, México

2025

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Julia Sarahí Balam Díaz titulado “Inducción de la síntesis de alcaloides en cultivos in vitro y hojas de *Argemone mexicana* expuestos a preparaciones de hongos fitopatógenos” fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, Línea de investigación: Metabolismo integrativo, Laboratorio 25 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

A handwritten signature in blue ink is written over a solid black horizontal line. The signature is stylized and appears to be 'José Luis Hernández Stefanoni'.

José Luis Hernández Stefanoni director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de agosto del 2025

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.

Firma: _____



Nombre: Julia Sarahí Balam Díaz

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de (Biología integrativa) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Los alcaloides bencilisoquinolínicos en la interacción planta-ambiente. *Argemone mexicana* como modelo de estudio” con financiamiento de la SECIHCI (CBF2023-2024-1879), bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Innovación y Tecnología (SECIHTI) por la beca otorgada (CVU): 1200360

A mi director de tesis el Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, por sus consejos, su disposición, paciencia y, sobre todo, por el conocimiento compartido y la confianza depositada para formar parte de su grupo de trabajo.

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

Al Dr. Ignacio Islas Flores, (UBI, CICY) y al Dr. Daniel Arturo Zavala Ortiz (TecNM-Instituto Tecnológico de Veracruz) por su participación en el comité tutorial y de revisión de tesis.

A la Dras. Nancy Santana Buzzy y Elizabeta Hernández Domínguez por la revisión de esta tesis.

A la M. C. Miriam Monforte González por el acompañamiento 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.

DEDICATORIAS

Todo el trabajo realizado fue posible gracias al apoyo incondicional de mi familia. a mi hermano Arsenio, a mi hijo Gael, cuya paciencia fue puesta a prueba en incontables ocasiones. Gracias a mi madre, la Sra. Hilda Díaz, que me dio todo lo que necesité, y mis compañeros de laboratorio, que fueron más que compañeros una familia; Ramiro, Lloyd, Fernanda, Nacho, les agradezco sus consejos, apoyo moral, paciencia. A Gladys, por siempre estar a mi lado, te agradezco todo el amor que me das y la inspiración que me generas para convertirme en la mujer que quiero ser.

A todos ustedes, y a los que me faltó nombrar les digo ¡gracias!" Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

- Poster; “Acumulación de alcaloides tipo Benzofenantridina en hojas de chicalote (*Argemone mexicana* L.) expuestas a inductores” 5^{to} Congreso Mexicano de Fisiología Vegetal (23 de octubre 2023)
- Ensayo; Los alcaloides: escudos de las plantas” páginas. 101-104 (mayo, 2024). “Desde el Herbario” CICY, páginas: 101-104 (23/mayo/2024) Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES.....	5
1.1. Metabolismo secundario de las plantas	5
1.2. Descripción de <i>Argemone mexicana</i>	7
1.3. Importancia de los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs).....	9
1.3.1 Biosíntesis de los ABIs.....	10
1.3.2. Biosíntesis de los ABIs.....	10
1.4. Interacciones biológicas y físicas que afectan a <i>Argemone mexicana</i> L	14
1.5. Hongos aislados de <i>Argemone mexicana</i>	17
1.5.1. Características de <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Corynespora cassiicola</i> y <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	18
1.6. Clasificación de los inductores	19
1.7. Cultivos <i>in vitro</i>	21
1.8. Uso de inductores para la producción de metabolitos secundarios.	22
1.9. Inductores como herramienta biotecnológica para la producción de metabolitos secundarios	25
1. 10. Compuestos comerciales inductores de la defensa de las plantas.....	26
1.11. Inducción de la biosíntesis de alcaloides en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	28
1.12 RECAPITULACIÓN	30
1.13 JUSTIFICACIÓN.....	32
1.14 HIPÓTESIS.....	32

1.15 OBJETIVO GENERAL	32
1.16 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
1.17 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
CAPÍTULO II	35
MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. Material Biológico	35
2.1.1. Suspensiones celulares	35
2.1.2. Hojas escindidas	36
2.2. Procedimientos y análisis	37
2.2.1. Preparación de los inductores fúngicos	37
2.2.3. Colecta y disección de las plantas de <i>A. mexicana</i> y aplicación de los tratamientos	40
2.2.7. Extracción y cuantificación de alcaloides.	42
2.3 Extracción y cuantificación de clorofilas.	44
2.4. Programas estadísticos.....	44
CAPÍTULO III.....	45
RESULTADOS	45
3.1 Modelo de estudio Inducción de la línea AMME de <i>A. mexicana</i>	45
3.1.2 Modelo de estudio. Inducción de cultivos en suspensión de <i>A. mexicana</i> con homogenizados de micelio.....	45
3.1.2 Inducción de cultivos en suspensión de <i>A. mexicana</i> con filtrados libres de células	49
3.2 Contenido de alcaloides en suspensiones celulares de <i>A. mexicana</i> expuestas homogenizados de micelio y filtrados libres de células	51
3.2.1 Suspensiones celulares de <i>A. mexicana</i> inducidas con homogenizados de micelio.	52
3.2.2 Suspensiones celulares de <i>A. mexicana</i> Inducidas con filtrados libres de células...	54

3.3 Análisis de respuesta de la síntesis de alcaloides en suspensiones de <i>A. mexicana</i> L a las preparaciones de hongos (filtrados y homogenizados).....	56
3.4 Análisis de la síntesis de alcaloides en hojas escindidas de <i>A. mexicana</i> inducidas con homogenizados de micelio.....	57
3.5 Evaluación del contenido de clorofilas de las hojas expuestas a los homogenizados de micelio	58
3.6 Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) del perfil de alcaloides en hojas de <i>A. mexicana</i> L expuestas a homogenizados de micelio.....	59
3.6.1. Contenido de alcaloides en hojas de <i>A. mexicana</i> L expuestas a los homogenizados de micelio.	61
3.6.2 Análisis de la respuesta de las hojas escindidas de <i>A. mexicana</i> L a las preparaciones de hongos.....	63
CAPÍTULO IV	65
4. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	65
4.1 Discusión del análisis de alcaloides en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. mexicana</i> L.	65
4.1.2. Discusión del análisis de alcaloides en hojas escindidas de <i>A. mexicana</i>	68
4.2 Conclusiones	69
4.3 Perspectivas	71
BIBLIOGRAFÍA.....	74

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1. 1.** Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas (Modificado de Martínez, 2017). 6
- Figura 1. 2.** *Argemone mexicana* L. En la figura A se puede observar algunos órganos de la planta entre ellos: flores, frutos, tallo y hojas, y en la figura B se observa un acercamiento de las hojas. 8
- Figura 1. 3.** Representación esquemática de la distribución tisular de los alcaloides presentes en *A. mexicana*. 9
- Figura 1. 4.** Ejemplos de distintos grupos de ABIs. Estos alcaloides se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro anillo bencilo. Tomado de Riley-Saldaña *et al.*, 2012. 10
- Figura 1. 5.** Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs) se forman a partir de tirosina. Tirosina-d Descarboxilasa (TYDC); monofenoloxidas (MFO); monoamino oxidasa (MAO); norcoclaurina sintasa (NCS). 11
- Figura 1. 6.** Biosíntesis de ABIs. Transformación de norcoclaurina en reticulina. 6- O-metiltransferasa (6OMT); coclaurina N-metiltransferasa (CNMT); (N)-metilcoclaurina 3´hidroxilasa (NMCH), 3´-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4OMT). 12
- Figura 1. 7.** Ruta específica para la biosíntesis de berberina. Enzima puente de berberina (BBE); escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT), canadina sintasa (CAS), S-tetrahydroberberina oxidasa (STOX). 13
- Figura 1. 8.** Ruta específica para la biosíntesis de sanguinarina. Enzima puente de berberina (BBE). Para la ruta de sanguinarina: chelantiofolina sintasa (CheSyn), estilopina sintasa (StySin), tetrahydroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT), (S)-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH), protopina-6-hidroxilasa (P6H), dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX), sanguinarina reductasa (SanR). 14
- Figura 1. 9.** Alcaloides encontrados en la planta entera de *A. mexicana* L. A: Be, B: protopina, C: Que, D: coptisina E: arnottianamida F: queliantifolina, G: alocriptopina, H: jatrorrizina, I: angolina,

J: columbamina, K: oxiberberina.16

Figura 1. 10. 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.....17

Figura 1. 11. Micelios de los hongos A) *Cladosporium cladosporioides*, B) *Fusarium solani*, C) *Corynespora cassiicola* y D) *Lasiodiplodia theobromae*, aislados de hojas de *A. mexicana* (Hernández-Eleria et al., 2025).19

Figura 1. 12. Clasificación de inductores bióticos y abióticos, tejidos por acumulación de lignina, callosa, suberina, entre otros, así como por la producción de metabolitos secundarios como fenoles (Rojas et al., 2014).20

Figura 1. 13. Biosíntesis del metabolismo secundario en células infectadas del aguacate; En esta regulación se ven involucrados diversos procesos que le sirven a la planta para defenderse, Ej.; síntesis de hormonas vegetales, regulación de proteínas R, o la síntesis de metabolitos secundarios, sintetizados (ejemplificado con colores) (Michel Pale, 2020).....21

Figura 1. 14. Modo de acción del jasmonato en el proceso de inducción del metabolismo secundario (R: receptor; PL: fosfolipasa; MAPK: proteína cinasas activadas por mitógenos; ROS: especies reactivas de oxígeno; RNS: especies reactivas de nitrógeno; TF: factores de transcripción) (Ramírez-Estrada et al., 2015).24

Figura 1. 15. Estrategia experimental para el análisis del contenido de alcaloides en *A. mexicana* L. en dos modelos de estudio.33

Figura 2. 1. A) línea de callos AM1 provenientes de hojas de *A. mexicana* (Monforte-González et al., 2019). B) cultivo *in vitro* de Células en suspensión de *A. mexicana* provenientes de callos de la lienea AM1 (Monforte-González et al., 2019).33

Figura 2. 2. Esquema de la colecta de muestras de las hojas analizadas.34

Figura 2. 3. Esquema de la técnica para el mantenimiento de los cultivos *in vitro* de hongos en medio semisólido papa agar dextrosa (PDA).35

Figura 2.4. cultivos en agitación de las cuatro especies seleccionadas; A) *F. solani*, B) *C. cladosporioides*; C) *L. theobromae* y D) *C. cassiicola*.....36

Figura 2. 5. Homogenados del micelio de cultivos en agitación de las cuatro especies seleccionadas; A) *F. solani*, B) *C. cladosporioides*; C) *L. theobromae* y D) *C. cassiicola*.37

Figura 2.6. Aspecto de las plantas de *A. mexicana* y de las hojas colectadas.....38

Figura 2.7 Aspecto de hojas colectadas de *A. mexicana* colectas.....38

Figura 2.8 Aspecto de las hojas expuestas a los homogenizados de micelio de los diferentes hongos ensayados. Panel izquierdo y derecho, al inicio y término del periodo de incubación de 96 h.....39

Figura 2. 9. A) Hoja escindida, B) Hoja escindida y realización de incisión de 5 mm en la parte abaxial, C) Hoja escindida con incisión y aplicación del inductor.....40

Figura 3.1. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana*, tiempo cero T0, (antes de la exposición los tratamientos, A) y después de 24 h, sin tratamiento (B), o expuestas medio liquido de PDB (medio de cultivo de los hongos; C). Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior)44

Figura 3.2. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *F. solani* equivalentes a 1 (**A**), 2 (**B**) y 3 (**C**) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior)44

Figura 3.3. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *C. cassiicola* equivalentes a 1 (**A**), 2 (**B**) y 3 (**C**) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior)45

Figura 3.4. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *C. cladosporioides* equivalentes a 1 (A), 2 (B) y 3 (C) mg de proteína. Para los tres casos se

puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).....45

Figura 3.5. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *L. theobromae* equivalentes a 1 (A), 2 (B) y 3 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).....46

Figura 3.6. Crecimiento de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *F. solani* (Fo); *C. cassiicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). T0 corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con medio de cultivo del hongo por 24 h. Promedio de triplicados con la desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestos a PDB).....46

Figura 3.7. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *F. solani* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).....47

Figura 3. 8. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *C. cassiicola* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).....47

Figura 3.9. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *C. cladosporioides* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).....48

Figura 3.10. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *L. theobromae* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).....48

Figura 3.11. Crecimiento de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados libres de células de cultivos de *F. solani* (Fo); *C. cassicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). T0 corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con PDB por 24 h. Promedio de triplicados con la desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestos a PDB)49

Figura 3.12. Análisis de berberina en suspensiones celulares de *A. mexicana* expuestas a filtrados de libre de células de cultivos de *L. theobromae*. Carriles 1-3, T₀ (suspensiones antes de la aplicación del inductor); carriles 4 y 5, controles (suspensiones después de 24 h); carriles 6 y 7, PDB, suspensiones expuestas 24 h a medio PDB (3 mg/mL); carriles 1a-c; 2a-c y 3a-3c, cultivos expuestos a filtrados en equivalentes a 0.1, 0.5 y 1.0 mg equivalentes de proteína del filtrado. La separación se realizó con una mezcla de 8:1:1 de n-butanol: agua: hidróxido de amonio.....50

Figura 3.13. Detección de sanguinarina (SA) en suspensiones de *A. mexicana* inducidas con homogenizados de micelio de *C. cladosporioides*, T₀ (antes de la aplicación del inductor); carriles 3 y 4, controles (suspensiones después las 24 h, sin tratamiento; carriles 5 y 6, suspensiones expuestas por 24 h a medio PDB (3 mg/mL) cultivo; carriles 7- 9; 10 -12 y 13- 15, suspensiones 4expuestas a 1, 2 y 3 mg de proteína de los diferentes hongos. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema ciclohexano: etanol (94:6) para la visualización de sanguinarina.....51

Figura 3.14. Contenido de sanguinarina en suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *F. solani* (Fo); *C. cassicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). T0 corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con PDB por 24 h. Promedio de triplicados con la

desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestas a PDB).....51

Figura 3.15. Detección de sanguinarina (SA) en suspensiones de *A. mexicana* inducidas con filtrados libres de células de cultivos de *C. cladosporioides*, T₀ (antes de la aplicación del inductor); **carriles 3 y 4**, controles (suspensiones después las 24 h, sin tratamiento; **carriles 5 y 6**, suspensiones expuestas por 24 h a medio PDB (3 mg/mL) cultivo; **carriles 7- 9; 10 -12 y 13- 15**, suspensiones expuestas a 0.1, 0.5 y 1.0 mg de proteína. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema ciclohexano: etanol (94:6) para la visualización de sanguinarina.....53

Figura 3.16. Contenido de sanguinarina en suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados libres de células de *F. solani* (**Fo**); *C. cassicola* (**Coc**); *C. cladosporioides* (**Ccl**) y *L. theobromae* (**Lt**). T₀ corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con PDB por 24 h. Promedio de triplicados con la desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestas a PDB).....54

Figura 3.17. Acumulación de peso fresco de las hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (**Fo**); *C. cassicola* (**Coc**); *C. cladosporioides* (**Ccl**) y *L. theobromae* (**Lt**). **Ctl** corresponde a las hojas intactas, mientras que **Lesión** a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.....56

Figura 3.18. Contenido de clorofila en hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (**Fs**); *C. cassicola* (**Coc**); *C. cladosporioides* (**Ccl**) y *L. theobromae* (**Lt**). **Ctl** corresponde a las hojas intactas, mientras que **Lesión** a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.....57

Figura 3.19. Perfil cromatográfico de los extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio; **Be** (estándar); **T0**, hojas recién colectadas; **C**, hojas intactas; **L**, hojas lesionadas; **Fu**; **Cla**, **Co** y **La** corresponden a hojas expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani*, *C. cladosporioides*, *C. cassicola* y *L. theobromae*, respectivamente; **A**, **B** y **C** muestran placas de

hojas tratadas por 48, 72 y 96 h, respectivamente. Los cromatogramas fueron separados con una mezcla de n-butanol: agua: NH₄OH 98:1:1.....58

Figura 3. 20. Perfil cromatográfico de los extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio; **Sa** (estándar); **T0**, hojas recién colectadas; **C**, hojas intactas; **L**, hojas lesionadas; **Fu**; **Cla**, **Co** y **La** corresponden a hojas expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani*, *C. cladosporioides*, *C. cassicola* y *L. theobromae*, respectivamente; **A**; **B** y **C** muestran placas de hojas tratadas por 48, 72 y 96 h, respectivamente. Los cromatogramas fueron separados con una mezcla de ciclohexano: etanol (94:6).....58

Figura 3.21. Contenido de berberina en las hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (Fo); *C. cassicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). Ctl corresponde a las hojas intactas, mientras que Lesión a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.....59

Figura 3.22. Contenido de sanguinarina en las hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (Fo); *C. cassicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). Ctl corresponde a las hojas intactas, mientras que Lesión a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.....60

Figura 3. 23. Perfil cromatográfico de los extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio; SA (estándar); H cla, HCo, y HLa corresponden a extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio de *C. cladosporioides* a *F. solani*, *C. cassicola* y *L. theobromae*, respectivamente; por 72 h. Los cromatogramas fueron separados con una mezcla de ciclohexano: etanol (94:6).....61

Figura 4.1 acumulación de sanguinarina en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* aplicando filtrados con una dosis de 3 mg de contenido de proteína.....64

Figura 4.2 acumulación de sanguinarina en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* inducidos con homogenados con una dosis de 0.5 mg de contenido de proteína.....64

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Inductores químicos y sus efectos de sobre cultivos celulares de diferentes especies. Fuente: Wiesel et al., 2014.....	24
Cuadro 2. Listado de elicitores y su efecto en diferentes plantas. Fuente: Thakur y Singh, 2012.....	27

ABREVIATURAS

AS:	Ácido salicílico
AAS:	Ácido acetilsalicílico
ANA:	Ácido 1-naftalenacético
ABI's:	Alcaloides bencilisoquinolínicos
Be:	Berberina
BAP:	6-bencilaminopurina
CCF:	Cromatografía en capa fina
EL:	Extracto de levadura
<i>Fo:</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
JA:	Ácido jasmónico
KCl:	Cloruro de potasio
MeJA:	Jasmonato de metilo
MS:	Murashige y Skoog
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
rpm:	Revoluciones por minuto
Sa:	Sanguinarina
TF:	Factores de transcripción
UV:	Radiación ultravioleta

RESUMEN

En este trabajo se propuso desarrollar un sistema experimental adecuado para estudiar el posible papel de los alcaloides de *Argemone mexicana* en la interacción planta-hongo. Para ello, se utilizaron preparaciones elaboradas de cultivos de cuatro hongos aislados de lesiones foliares; *Corynespora cassiicola*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani* y *Lasiodiplodia theobromae* en dos modelos de estudio; suspensiones celulares (línea AMME) y hojas escindidas. Las preparaciones utilizadas como inductores consistieron en homogenizados de los micelios y filtrados libres de células. El objetivo del trabajo se centró en el análisis del cambio de los patrones de acumulación de alcaloides en tejidos de *Argemone mexicana* en condiciones de inducción con preparaciones acelulares de hongos aislados de la misma planta. Cultivos de la línea celular AMME se expusieron a diferentes dosis de las preparaciones de los diferentes hongos y se monitorearon los cambios en los perfiles de acumulación de alcaloides. Solamente se observó acumulación de sanguinarina en las suspensiones expuestas a las preparaciones de *C. cassiicola*. Esta especie de hongo es la única capaz de infectar la planta. No obstante, las cantidades detectadas fueron muy bajas superando ligera, pero consistentemente, el límite de cuantificación de la técnica utilizada. En las hojas tratadas, se observó la acumulación de sanguinarina que normalmente no se detecta en tejidos aéreos. Aunque este efecto se observó en hojas lesionadas, el tratamiento con preparaciones de *C. cassiicola* produjo una acumulación mayor. Hojas expuestas a preparaciones de las otras especies acumularon cantidades similares a las observadas por las lesiones. Las cantidades de berberina no se modificaron en las hojas y el alcaloide no se detectó en las suspensiones.

Si bien se observaron cambios en los contenidos de alcaloides en las células en suspensión inducidas con homogenados y filtrados, sin embargo, estos no fueron tan marcados como en las hojas inducidas con homogenados. Estos resultados sugieren una función protectora de la sanguinarina durante la infección por hongos. De este modo, se propone el empleo de hojas escindidas expuestas a homogenizados de *C. cassiicola* como un modelo para el estudio de la participación de los alcaloides en la interacción planta-hongo.

ABSTRACT

This work aimed to develop an appropriate experimental system to study the possible role of *Argemone mexicana* alkaloids in the plant-fungus interaction. To this end, preparations made from cultures of four fungi isolated from foliar lesions were used: *Corynespora cassiicola*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, and *Lasiodiplodia theobromae*, in two study models: cell suspensions (AMME cell line) and detached leaves. The preparations used as inducers consisted of homogenized mycelia and cell-free filtrates.

The objective of the work focused on analyzing changes in alkaloid accumulation patterns in *Argemone mexicana* tissues under induction conditions with acellular preparations of fungi isolated from the same plant. Cultures of the AMME cell line were exposed to different doses of the fungal preparations, and changes in the alkaloid accumulation profiles were monitored. Sanguinarine accumulation was observed only in suspensions exposed to preparations of *C. cassiicola*, which is also the only fungus capable of infecting the plant. However, the detected amounts were very low, slightly but consistently exceeding the quantification limit of the technique used (3.9 ng per application).

In the treated leaves, sanguinarine accumulation was observed, which is normally undetectable in aerial tissues. Although this effect was observed in wounded leaves, treatment with *C. cassiicola* preparations produced a greater accumulation. Leaves exposed to preparations of the other fungal species accumulated amounts similar to those caused by the lesions alone. Berberine levels were not altered in the leaves, and the alkaloid was not detected in the suspensions.

Although they were observed Changes in alkaloid contents in suspension cells induced with homogenates and filtrates, However, these were not as pronounced as in leaves induced with homogenates. These results suggest a protective function of sanguinarine during fungal infection. Thus, the use of detached leaves exposed to *C. cassiicola* homogenates is proposed as a model to study the role of alkaloids in the plant-fungus interaction.

INTRODUCCIÓN

Estudios bioquímicos sobre la síntesis de los compuestos han mostrado que estos se acumulan, cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como el consumo por herbívoros, el ataque de microorganismos, la competencia por el espacio de suelo, luz, nutrientes entre las diferentes especies de plantas, la exposición a la luz solar u otro tipo de estrés biótico o abiótico.

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 ambientales 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 forman 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 las 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. El cultivo *in vitro* de células y tejidos es una fuente alternativa para la producción de valiosos compuestos activos a partir de plantas. Diferentes estrategias *in vitro* han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos de gran interés en la industria farmacéutica (Pérez-Alonso *et al.*, 2011). Aunque normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren; sin embargo, una de las ventajas que presentan es que es posible controlar las condiciones de cultivo, alcanzando un mayor rendimiento (De Matos *et al.*, 2014; Arias *et al.*, 2009; Facchini, 2001).

En este trabajo, se analizaron 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 y sanguinarina. Para lograrlo se desarrollaron dos sistemas para estudiar la participación de los alcaloides de *Argemone*

mexicana con la aplicación de preparados fúngicos (homogenizados y filtrados). En el cual cultivos *in vitro* de *Argemone mexicana* fueron expuestos a preparaciones de cuatro especies de hongos, previamente aisladas de hojas con síntomas de infección fúngica. Como primer modelo experimental se propuso utilizar cultivos de suspensiones celulares de *A. mexicana* expuestas a preparaciones autoclaveadas elaboradas a partir de cultivos de hongos. Este modelo imita el proceso de interacción entre las células vegetales y los componentes infectivos de los hongos y presenta muchas ventajas. Por un lado, los cultivos *in vitro* de células vegetales permiten una disponibilidad continua de material, se mantienen en condiciones de esterilidad y son de fácil manipulación. Por su parte, las preparaciones de cultivos autoclaveados de hongos mantienen los componentes extracelulares que inducen la respuesta de defensa en los hospederos. Anteriormente se ha demostrado que homogenizados del micelio de *Fusarium oxysporum* aumentan la acumulación de alcaloides en suspensiones celulares de *A. mexicana*, aunque no existen reportes de que este hongo infecte a la planta en campo.

El segundo modelo consistió en hojas escindidas *in vitro*, mantenidas en cámaras húmedas hecha con cajas de Petri. En este modelo, la exposición a las preparaciones fúngicas se hizo depositando un volumen determinado de las preparaciones sobre la superficie de la hoja. Se utilizaron las preparaciones fúngicas de las mismas cuatro especies previas; *Fusarium solani*, *Corynespora cassicola*, *Cladosporium cladosporioides* y *Lasiodiplodia theobromae* en dosis 0.5 µg/g, por tiempos de 2, 3, 4, 6 días. Se analizó la acumulación de los alcaloides sanguinarina y berberina por cromatografía en capa fina. No se observó la acumulación de sanguinarina, sin embargo, sí de la de berberina.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Metabolismo secundario de las plantas

Los mecanismos defensivos de las plantas son muy variados entre ellos están las adaptaciones físicas como las espinas o la síntesis de sustancias químicas que pueden inhibir el consumo por los depredadores y algunos con efectos antimicrobianos (Bennett & Wallsgrove, 1994). Gran parte de las reacciones de defensa se reflejan en una diversidad de compuestos bioquímicos, los cuales son sintetizados ante las interacciones entre las plantas y organismos microbianos o algún tipo de estrés. Esta interacción activa un mecanismo de defensa de la planta que lleva a la síntesis de diferentes moléculas orgánicas también conocidas como metabolitos secundarios, los cuales son muy importantes en la interacción de la planta con su entorno. Siendo organismos obligados a sobrevivir ante las condiciones que les plantea su entorno, las plantas deben responder a tales situaciones para poder defenderse, crecer y reproducirse. Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular y de naturaleza química diversa que por sus propiedades (tóxicas, narcóticas, sedantes, etc.) son sintetizados por plantas, bacterias, hongos e incluso animales. Tienen importancia en la fisiología de las plantas y se les atribuye funciones de defensa, atracción o competencia espacial. (González E & Castro M. 2008). De igual modo la síntesis de los metabolitos puede ser inducida cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Croteau *et al.*, 2000) Fig. 1.2.

El reconocimiento de las propiedades bioactivas de los metabolitos secundarios ha resultado en el descubrimiento de nuevos fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas, tales como la aspirina, la xilocaína, el sativex, la atropina, la morfina, entre otros (Croteau *et al.*, 2000). Estos metabolitos se pueden encontrar en preparaciones hechas con partes de plantas los cuales pueden presentar propiedades medicinales, y la actividad farmacológica puede deberse a una única sustancia o a una mezcla de ellas. Estos metabolitos pueden ser clasificados en diferentes tipos, tales como alcaloides, glucósidos, fenoles, etc. (Valencia *et al.*, 1995).

Los metabolitos secundarios y en particular los alcaloides son de gran interés en la ingeniería metabólica, la cual busca incrementar la producción de estos compuestos para su aprovechamiento comercial (Verpoorte *et al.*, 2002). Sin embargo, las plantas los sintetizan en muy bajas concentraciones, 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)

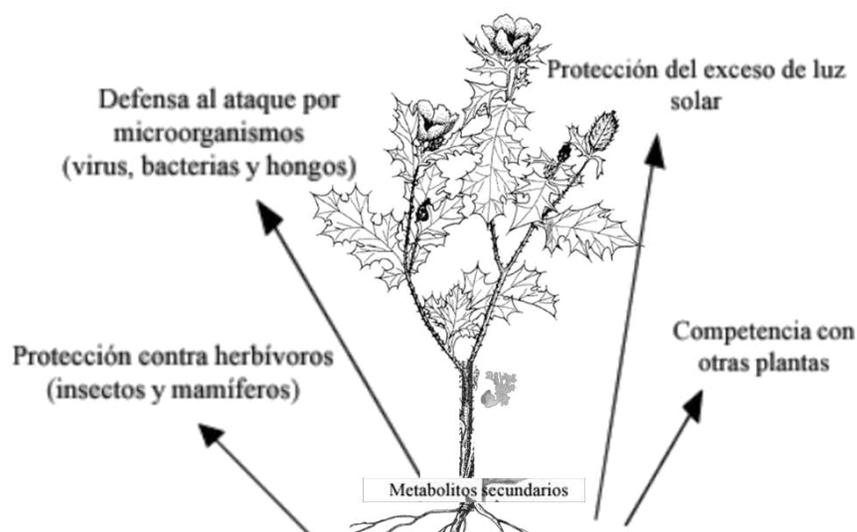


Figura 1. 1. Eventos en los cuales, los metabolitos secundarios se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas (Modificado de Martínez, 2017).

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).

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).

Una de las plantas que se reconoce por sus propiedades medicinales es *Argemone mexicana*, conocida comúnmente como cardosanto (Siddiqui *et al.*, 2002), ya que a lo largo de la historia diversas culturas la empleaban para el tratamiento de nubes o cataratas para aliviar la fiebre, la sarna, como purgante y en ciertas enfermedades cutáneas, todas dependiendo del tejido empleado (Lozoya, 1999). Esta planta debe sus propiedades a su composición química, principalmente a los alcaloides de la familia bencilisoquinolínicos (ABI's), que acumula, principalmente sanguinarina y berberina (Chang *et al.*, 2003). La presencia de estos alcaloides en diferentes partes de la planta puede explicar las propiedades medicinales que se le atribuyen como aplicaciones para terapias anticancerígenas y para actividad antimicrobiana, entre otras (Chang *et al.*, 2003).

1.2. Descripción de *Argemone mexicana*

Argemone mexicana (Figura 1.2 A y B) es una planta con una larga historia en la medicina tradicional mexicana. Conocida comúnmente como amapola, cardo santo o chicalote. Es una hierba anual que presenta un látex amarillo brillante, mide entre 30 y 90 cm de alto, su tallo es solitario, glauco y ramoso en la base, con espinas escasas perpendiculares o ligeramente reflejas, las hojas lobuladas, de entre 2 y 8 cm de ancho y de 6 a 20 cm de largo, sus hojas basales son ovalo lanceoladas y las superiores elípticas y espinosas de color verde azulado con el borde dentado, terminando cada diente en una espina, las hojas presentan haces vasculares muy marcados en color blanco. Las flores son amarillentas, grandes, miden de 3 a 7.5 cm de diámetro. Los frutos son cápsulas alargadas y espinosas, tienen de 4 a 6 carpelos y son dehiscentes por el vértice. Las semillas son muy pequeñas, negruzcas y rugosas (Lozoya y Lozoya, 1982).



Figura 1. 2. *Argemone mexicana* L. En la figura A se puede observar algunos órganos de la planta entre ellos: flores, frutos, tallo y hojas, y en la figura B se observa un acercamiento de las hojas.

A. mexicana produce una amplia gama de ABI's, que se derivan de la tirosina. Estos productos pueden ser altamente tóxicos para 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 sanguinarina y berberina simultáneamente. Estos alcaloides se distribuyen tanto en las partes aéreas como en las subterráneas de la planta (Escobar-Chan, 2018). Ambos alcaloides son los mayoritarios en la planta. La berberina es un ABI del tipo protoberberina, mientras que la sanguinarina es una Benzofenantridina la berberina está distribuida en todos los tejidos e inclusive en semillas de estado inmaduro. La sanguinarina tiene presencia en raíz (figura 1.3) y en semillas maduras (Rubio-Piña, 2009; Lozoya y Lozoya, 1982). La berberina se encuentra presente en cantidades importantes en todos los tejidos de la planta y en bajos niveles en las semillas de estado inmaduro. En plantas adultas, la sanguinarina, sólo se presenta en raíz y en semillas maduras; mientras que en plántulas jóvenes puede encontrarse también en las partes aéreas (Rubio-Piña, 2009; Vázquez-Flota *et al.*, 2018).

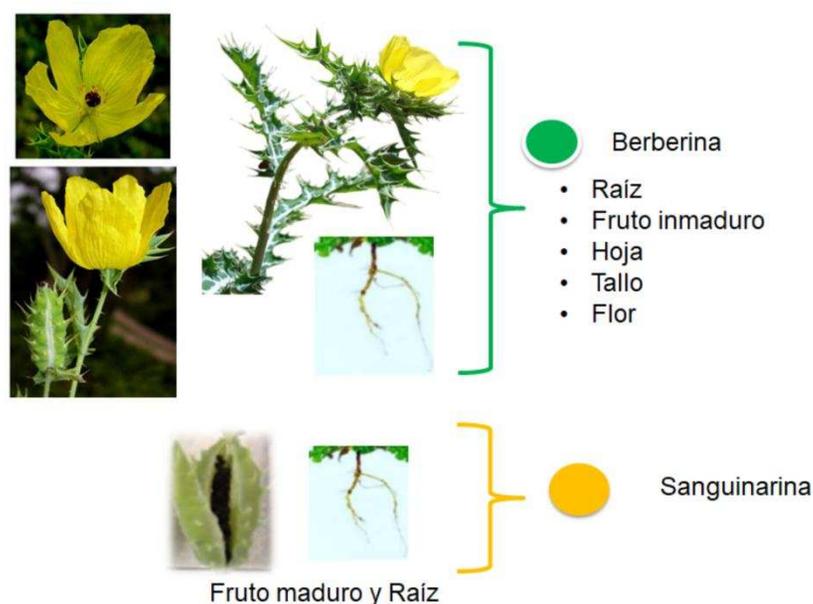


Figura 1. 3. Representación esquemática de la distribución tisular de los alcaloides presentes en *A. mexicana*.

1.3. Importancia de los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs)

Los ABI's representan aproximadamente 2500 estructuras ya elucidadas. La importancia de los ABI's ha surgido debido a que poseen múltiples propiedades farmacológicas. Los estudios sobre estos compuestos iniciaron con la purificación de la morfina en 1806 por Serturner, a partir del látex de *Papaver somniferum*, marcando el primer aislamiento de un alcaloide. La morfina se ha empleado como analgésico y narcótico, la codeína, otro ABI, como supresor de la tos, la papaverina como relajante muscular, y la sanguinarina junto con berberina como agentes antimicrobianos (Hagel y Facchini, 2013). De manera detallada las aplicaciones para sanguinarina han sido vinculadas para generar un efecto citotóxico que induce la apoptosis en células cancerígenas, al igual que propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias (Kadam *et al.*, 2020).

1.3.1 Biosíntesis de los ABIs

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados de carácter básico de donde se deriva su nombre "alkali". La clasificación de estos compuestos está basada en el esqueleto químico de su precursor. Los alcaloides bencilisoquinolinicos (ABI's) se forman a partir de tirosina y representan una de las familias más diversas de alcaloides. Estos se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro anillo bencílico (Figura 1.4) (Facchini *et al.*, 2000).

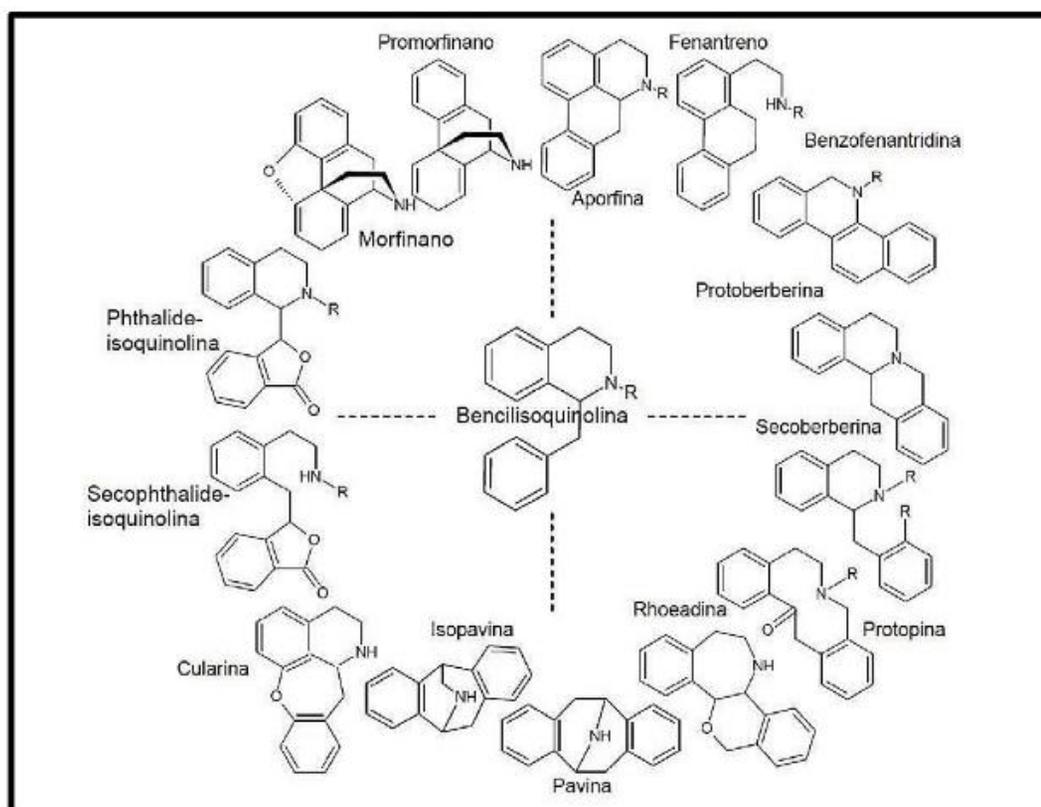


Figura 1. 4. Ejemplos de distintos grupos de ABIs. Estos alcaloides se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro anillo bencílico. Tomado de Riley-Saldaña *et al.*, 2012.

1.3.2. Biosíntesis de los ABIs

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados, de carácter básico y con efectos fisiológicos en organismos diferentes a los que los producen. Una forma de clasificación es por la molécula precursora, generalmente aminoácidos. Los ABIs se forman a partir de la tirosina y se caracterizan por presentar un esqueleto carbonado central formado por la unión entre un anillo isoquinolínico y un anillo bencílico (Facchini, 2001). El inicio de la ruta de biosíntesis de

los ABIs (Figura 1.5) implica la condensación de dos moléculas derivadas de tirosina. Por un lado, involucra la descarboxilación de la tirosina para producir tiramina, llevada a cabo por la tirosina descarboxilasa (TYDC). La tiramina es convertida en dopamina por acción de la monofenoloxidasa (MFO). Una segunda molécula de tiramina es convertida en 4-hidroxifenil acetaldehído (4-HPA) por una monoaminoxidasa (MAO). La dopamina y el 4-hidroxifenil acetaldehído son acoplados en una reacción de condensación, catalizada por la norcoclaurina sintasa (NCS), formando la norcoclaurina, el intermediario a partir del cual se formarán todos los alcaloides de este tipo.

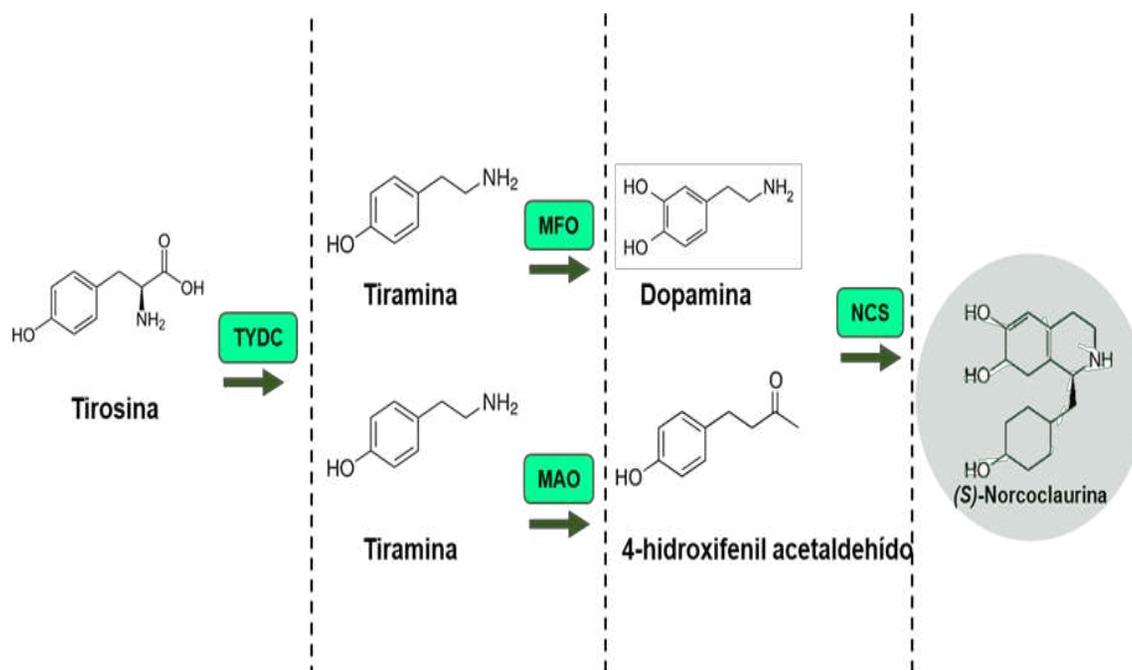


Figura 1. 5. Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs) se forman a partir de tirosina. Tirosina-descarboxilasa (TYDC); monofenoloxidas (MFO); monoamino oxidasa (MAO); norcoclaurina sintasa (NCS).

La ruta de biosíntesis de los ABIs se puede resumir en dos etapas la primera implica la descarboxilación de la tirosina para producir tiramina, esta reacción es llevada a cabo por la tirosina-descarboxilasa (TYDC). La tiramina es convertida en dopamina por acción de la monofenoloxidas (MFO). Otra molécula de tiramina es convertida en 4-hidroxifenil acetaldehído por una monoamino-oxidasa (MAO). La dopamina y la 4-hidroxifenil acetaldehído son acoplados por una reacción de condensación catalizada por la norcoclaurina sintasa (NCS) (Frenzel y Zenk, 1990). En la segunda etapa (figura 1.5), la (S)-norcoclaurina por medio de dos metilaciones catalizadas por la enzima 6-O-metiltransferasa (6OMT), y la enzima coclaurina N-metiltransferasa (CNMT) mientras que la enzima N-metilcoclaurina 3'hidroxilasa (NMCH) se

encarga de la reacción de hidroxilación (Pauli y Kutchan, 1998). Al final, la enzima 3-hidroxy-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4OMT), lleva a cabo la última reacción para obtener la (S)-reticulina (Pauli y Kutchan, 1998; Sato *et al.*, 1994).

El primer paso para la formación de berberina implica la desmetilación del N-metilo de la reticulina (figura 1.6) por acción de la enzima puente de berberina (BBE), formando a la escoulerina (Liscombe y Facchini, 2008). La biosíntesis de berberina (Figura 1.7) continua con la conversión de la escoulerina en tetrahidrocolumbamina, llevada a cabo por la escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT), seguida por la conversión de ésta en canadina, por la canadina sintasa (CAS). Finalmente, la canadina se oxida a berberina por acción de la (S)-

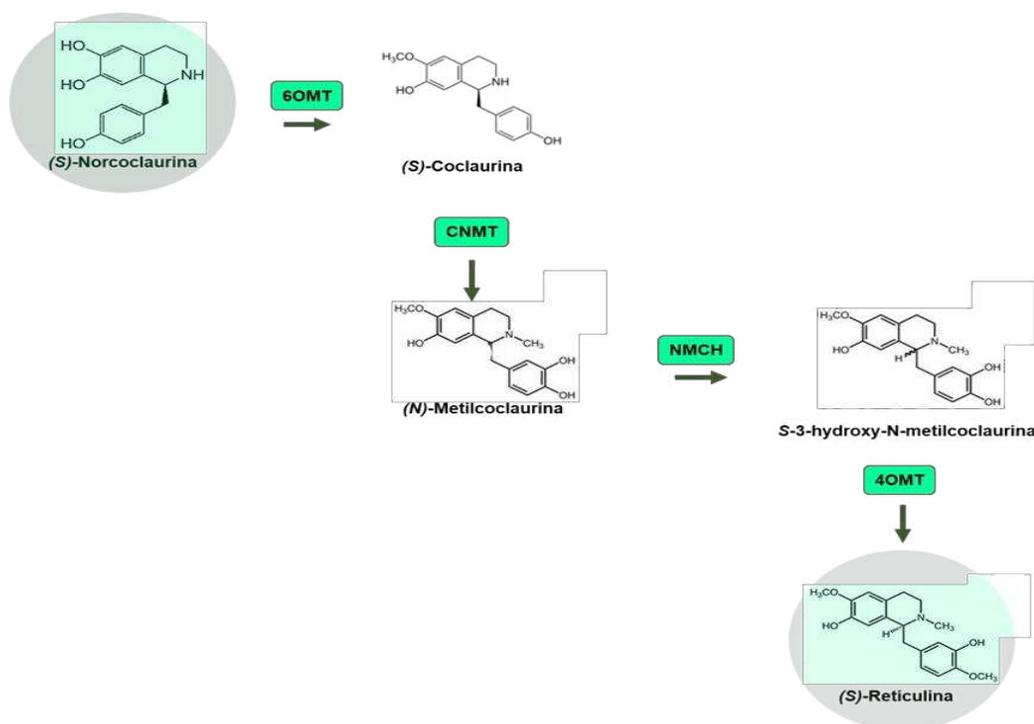


Figura 1. 6. Biosíntesis de ABIs. Transformación de norcoclaurina en reticulina. 6- O-metiltransferasa (6OMT); coclaurina N-metiltransferasa (CNMT); (N)-metilcoclaurina 3'hidroxilasa (NMCH), 3'-hidroxi-N-metilcoclaurina O-metiltransferasa (4OMT).

tetrahydroberberina oxidasa (STOX) (Facchini, 2001; Liscombe y Facchini, 2008; De La Cruz *et al.*, 2012), la ruta para la formación de berberina implica menos pasos enzimáticos en comparación con la ruta específica para la sanguinarina.

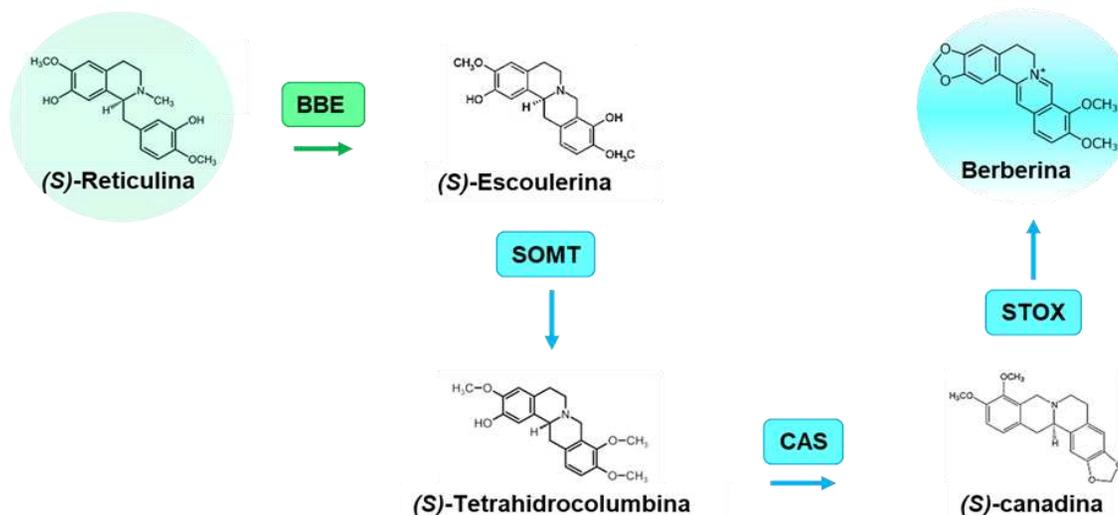


Figura 1. 7. Ruta específica para la biosíntesis de berberina. Enzima puente de berberina (BBE); escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT), canadina sintasa (CAS), S-tetrahidroberberina oxidasa (STOX).

Para la formación de sanguinarina (Figura 1.8) primero ocurre la conversión de la (S)-reticulina en el componente del puente de metileno de la (S)-escoulerina por la enzima puente de berberina (BBE). Después, la (S)-escoulerina es convertida a (S)-estilopina por la acción de dos enzimas oxidadas: la (S)chelantiofolina sintasa (CheSyn) y la (S)-estilopina sintasa (StySin). La (S)-estilopina es Nmetilada por una enzima llamada tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT).

Posteriormente la enzima (S)-cis-N-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH) conduce a la formación de protopina. La conversión de protopina a hidrosanguinarina involucra una hidroxilación, realizada por la protopina-6-hidroxilasa (P6H). La dihidrosanguinarina se convierte a sanguinarina por la dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX). Una sanguinarina reductasa (SanR) que cataliza la conversión de la sanguinarina en dihidrosanguinarina (Liscombe y Facchini 2008; De La Cruz, *et al*, 2012; Facchini, 2001).

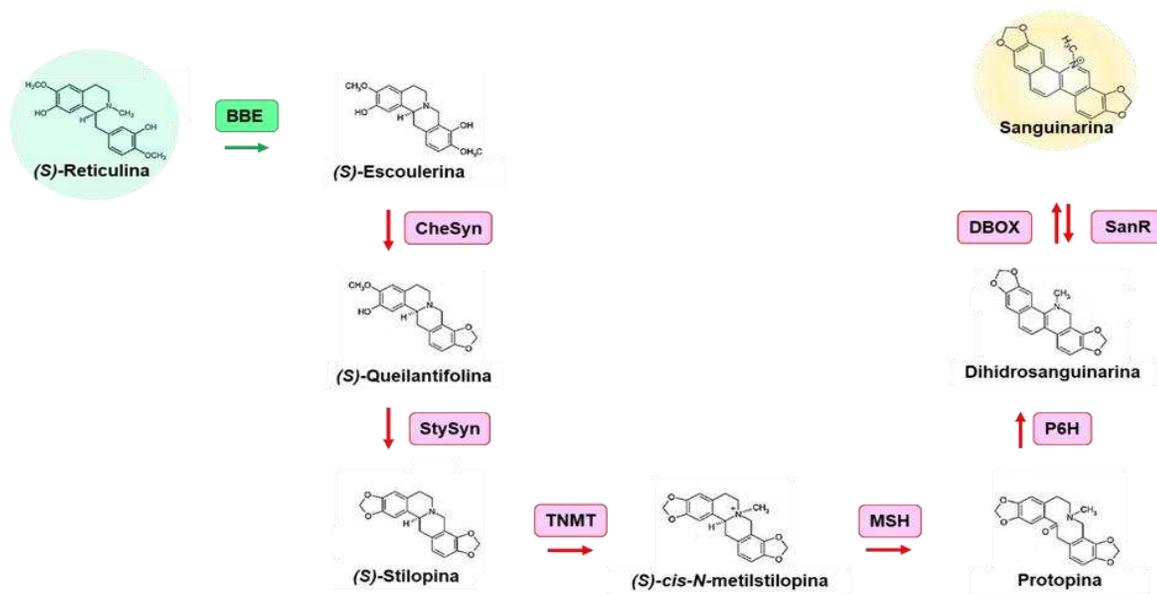


Figura 1. 8. Ruta específica para la biosíntesis de sanguinarina. Enzima puente de berberina (BBE). Para la ruta de sanguinarina: chelantiofolina sintasa (CheSyn), estilopina sintasa (StySyn), tetrahidroprotoberberina-cis-N-metiltransferasa (TNMT), (S)-cis-N-metilstilopina 14-hidroxilasa (MSH), protopina-6-hidroxilasa (P6H), dihidrosanguinarina oxidasa (DBOX), sanguinarina reductasa (SanR).

1.4. Interacciones biológicas y físicas que afectan a *Argemone mexicana* L

La infección por fitopatógenos genera cambios en el metabolismo primario y secundario de las plantas susceptibles, afectando su crecimiento y desarrollo, dependiendo de la eficiencia 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.

Por otro lado, los patógenos también han desarrollado estrategias para sobrepasar el sistema inmunológico de las plantas, mediante la liberación de proteínas efectoras, que se unen con los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) y evitan que el patógeno sea detectado por la planta con lo que logran invadir los tejidos para su alimentación y reproducción (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013).

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) se

acumula después de la infección por patógenos y produce una disminución de la fotosíntesis poco después de la aplicación. La regulación a la baja de los genes fotosintéticos, a su vez, disminuye la tasa neta de fotosíntesis. Aunque los datos de varias interacciones planta-patógeno, especialmente con patógenos fúngicos.

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 ciertos patógenos que pueden afectar su desarrollo. Es interesante notar que, de las hojas de *A. mexicana* se han aislado hongos de carácter fitopatógenos (Hernández-Hernández, 2022).

En las figuras 1.9 y 1.10 se muestran algunos de los metabolitos secundarios identificados como alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIS), que produce *A. mexicana* y que podrían actuar como defensa ante un ataque por patógenos.

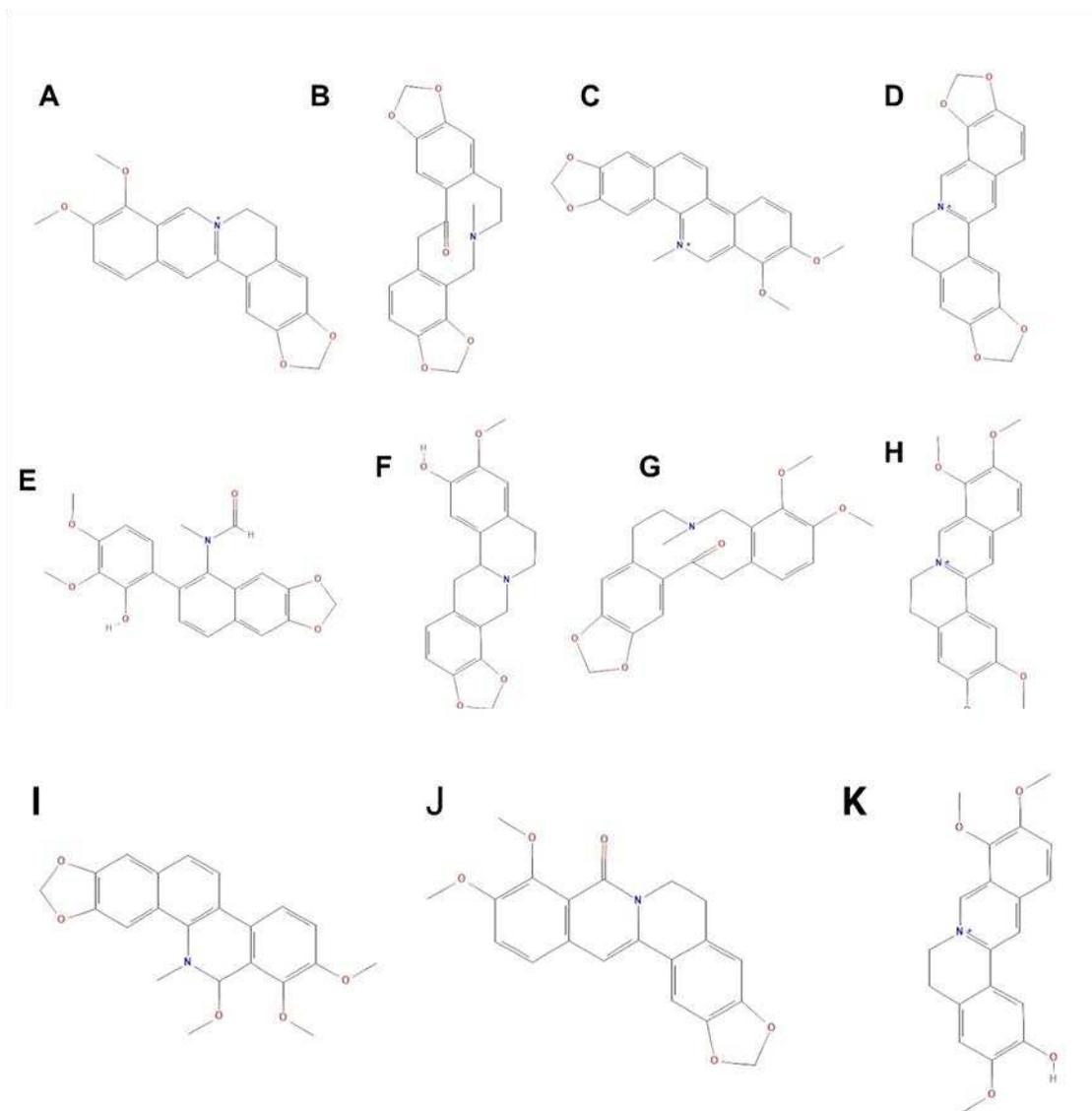


Figura 1. 9. Alcaloides encontrados en la planta entera de *A. mexicana* L. A: Be, B: protopina, C: Que, D: coptisina E: arnottianamida F: queliantifolina, G: alocriptopina, H: jatrorrizina, I: angolina, J: columbamina, K: oxiberberina.

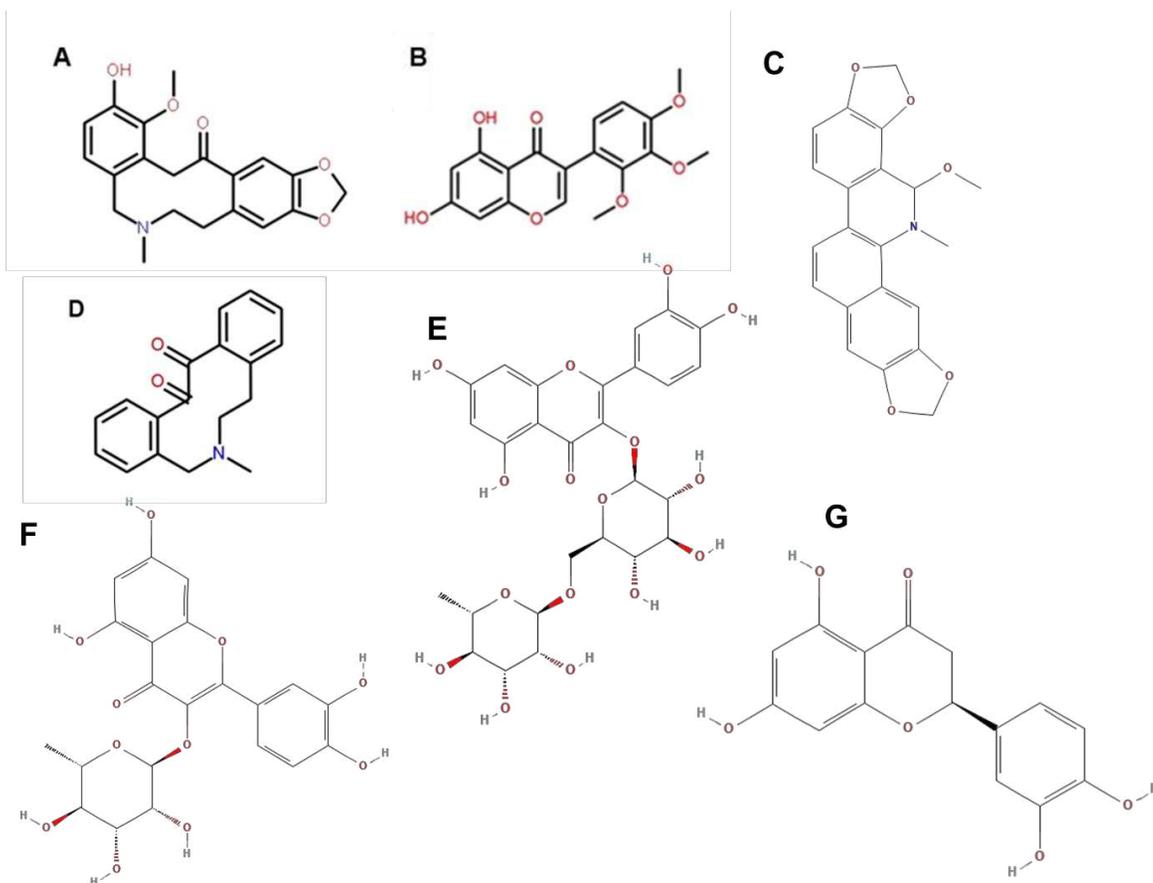


Figura 1. 10. Metabolitos secundarios presentes en las hojas de *A. mexicana* L. A: protomexicina, B: mexitina, C: 8-metoxidihidrosanguinarina, D: 13-oxoprotopina, E: rutina, F: quercetrina, G: eriodictiol.

1.5. Hongos aislados de *Argemone mexicana*

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.

En investigaciones y aplicaciones de técnicas en el laboratorio en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, se han aislado e identificados hongos fitopatógenos en hojas de esta planta (Hernández-Eleria et al., 2025). Para la identificación morfológica se realizaron observaciones microscópicas y macroscópicas al igual que marcadores moleculares tipo ITS1 -4 y TEF-1 α . De este modo los aislamientos fueron identificados como *Lasiodiplodia theobromae*, *Corynespora*

cassiicola, *Fusarium solani*, el complejo *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Neopestalotiopsis clavispora* y *Trichoderma harzianum*. Se han realizado pruebas de patogenicidad para *L. theobromae*, *C. cladosporioides*, *F. solani*, y *C. cassiicola* mediante las cuales se estableció que solamente la última, fue capaz de infectar hojas sanas (Hernández-Eleria *et al.*, 2025).

Más aún, se ha encontrado que hojas con síntomas de infección por hongos, acumularon sanguinarina, a pesar de que en plantas sanas este alcaloide solamente se encuentra en la raíz (Hernández-Hernández, 2022) y analizando los efectos de los diferentes hongos aislados sobre la acumulación de sanguinarina, se observó que ésta solamente ocurrió en hojas expuestas al *C. cassiicola*, que también fue el único capaz de producir la infección primaria (Hernández-Eleria *et al.*, 2025). Por tal motivo resulta interesante el evaluar el efecto de estos hongos (homogenados y filtrados), al inducir cultivos *in vitro* de argemone mexicana, evaluando el perfil metabólico de cada uno de ellos, evaluando la producción de metabolitos secundarios, estableciendo tiempos y dosis específicas y condiciones controladas.

1.5.1. Características de *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium solani*, *Corynespora cassiicola* y *Lasiodiplodia theobromae*

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 y royas, necesitan tejido vivo para su crecimiento y reproducción. Los patógenos necrotróficos son los que obtienen nutrientes a partir de las células muertas. Esto implica que, durante el proceso de infección, el patógeno pudiera promover la activación de mecanismos que dieran lugar a la muerte de cientos de células en el sitio de infección (Yang & Wang, X. *et al.*, 2007). Los hemibiotróficos se caracterizan por una fase biotrófica, más o menos extendida, antes de cambiar al crecimiento necrotrófico y matar a su hospedero.

De los hongos aislados de las hojas de *A. mexicana*, *C. cladosporioides*, que causa manchas foliares en frutales como el papayo entre otros, se comporta como un biotrófico, mientras que *Fusarium* spp., asociado con la pudrición interna de frutos de papayo en madurez comercial, y *C. cassiicola* son necrotróficos (APS, 2011; Chávez *et al.*, 2011) y *L. theobromae* es un hemibiotrófico (Chen *et al.*, 2009). Como biotrófico, *C. cladosporioides*, sin embargo, sobrevive en material vegetal senescente o en hojas frescas como invasor secundario y también se considera un hongo endofítico (Bensch *et al.*, 2012). La principal vía de entrada de *L. theobromae*, a los tejidos hospederos, de comportamiento hemibiotrófico, es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos, etc (Ploetz, 2003). Se ha reportado que durante

los periodos lluviosos hay mayor producción de esporas de este hongo las cuales pueden ser diseminadas por las gotas de lluvia y el viento (Vázquez *et al.*, 2009). Este hongo puede colonizar el sistema vascular y avanzar previo a la manifestación de síntomas visibles (Burgess *et al.*, 2006; Shahbaz *et al.*, 2009). Reservorios de este hongo sobreviven sobre tejidos muertos aún unidos a las plantas o en el suelo (Pegg *et al.*, 2003) y, especialmente en frutos momificados (Ploetz, 2003). Finalmente, los patógenos necrotróficos como *F. solani* y *C. cassiicola*, matan el tejido del huésped al comienzo de la infección y se alimentan del tejido muerto (Berger *et al.*, 2007b; Voegelé y Mendgen, 2003). El hongo *C. cassiicola* produce clamidosporas a medida que el cultivo envejece. Es un patógeno que sobrevive en los residuos de cultivo, las semillas y el suelo. Esto implica que, durante el proceso de infección, el patógeno pudiera promover la activación de mecanismos que dieran lugar a la muerte de cientos de células en el sitio de infección (Yang, & Wang, X. *et al.*, 2007). El hongo *F. solani* ataca principalmente la zona de la base del tallo y raíz provocando marchitez y amarillamiento de las hojas, así como crecimiento retardado. Este hongo es identificable por la necrosis de raíces principales y secundarias, así como en la corona. Estos hongos en el suelo sobreviven como micelio o esporas cuando no tienen hospedantes. En contacto con algún hospedero penetran la raíz y a su vez colonizan el tallo, ingresando por el sistema vascular (Ma *et al.*, 2013)

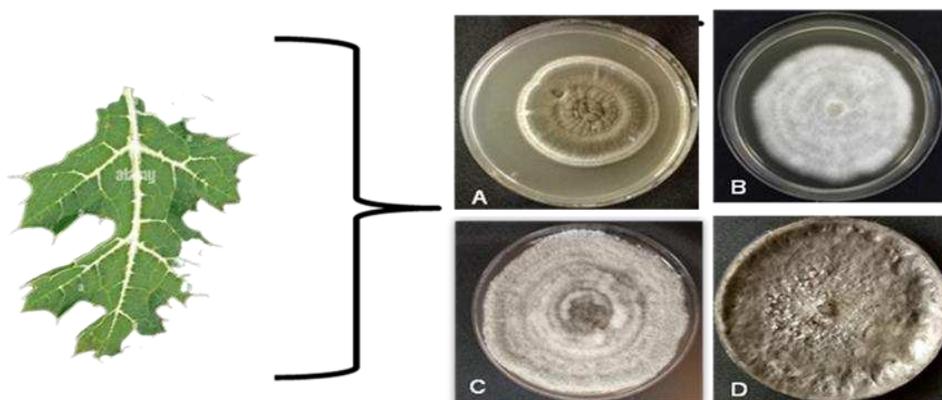


Figura 1. 11. Micelios de los hongos A) *Cladosporium cladosporioides*, B) *Fusarium solani*, C) *Corynespora cassiicola* y D) *Lasiodiplodia theobromae*, aislados de hojas de *A. mexicana* (Hernández-Elería *et al.*, 2025).

1.6. Clasificación de los inductores

Los inductores se dividen en dos categorías según su origen; abióticos y bióticos, los primeros pueden ser, a su vez de dos tipos; físicos y químicos. Los físicos incluyen el déficit hídrico, la

temperatura extrema, radiación luminosa excesiva o insuficiente, anaerobiosis por encharcamiento o factores mecánicos, incluyendo viento, compactación del suelo y las lesiones. Por su parte, los inductores químicos incluyen el estrés iónico (por salinidad), nutricional y por contaminantes. Por otro lado, los inductores abióticos corresponden a componentes no biológicos que pueden alterar la integridad de la membrana o que funcionan a través de otros mecanismos. Los inductores bióticos tienen su origen en los seres vivos y pueden ser de dos tipos; exógenos o endógenos. Los exógenos incluyen compuestos de patógeno, en tanto que los endógenos son compuestos producidos por las propias plantas después de la acción del patógeno (Chavdarova., 2019). Así, los inductores bióticos exógenos incluyen compuestos liberados por microorganismos y otros patógenos, o los 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 (quitina y glucanos). Por otro lado, 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.j 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 tiene composiciones complejas (Kaur *et al.*, 2021; Ramírez-Estrada *et al.*, 2016; Atanasov *et al.*, 2015; Rao y Ravishankar, 2002).

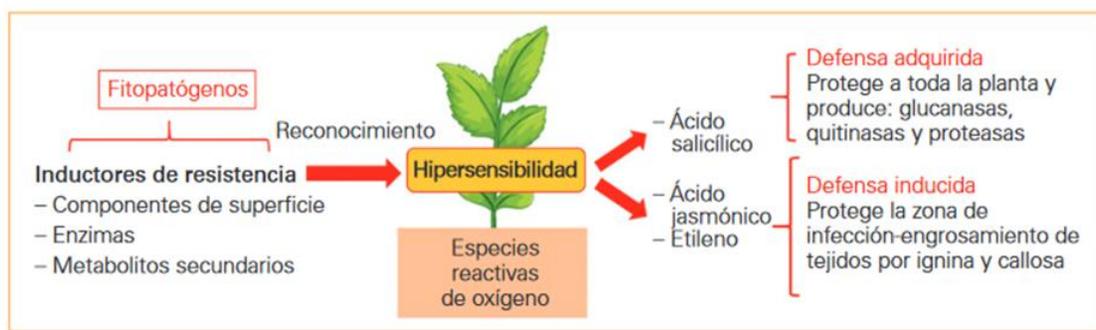


Figura 1. 12. Clasificación de inductores bióticos y abióticos, tejidos por acumulación de lignina, callosa, suberina, entre otros, así como por la producción de metabolitos secundarios como fenoles (Rojas et al., 2014).

Una vez que un microorganismo es percibido por la planta se inicia una rápida reprogramación celular que desencadena una respuesta efectiva contra el ataque. Una de estas respuestas es la síntesis de enzimas que degradan la pared celular de los microorganismos o bien, la síntesis de proteínas con el potencial de inactivar compuestos tóxicos que son producidos por algunos

patógenos y son dañinos para las plantas. Las plantas pueden también sintetizar metabolitos secundarios con actividad contra herbívoros o antimicrobiana, o inducir la producción localizada de especies reactivas de oxígeno, cuya función se centra principalmente en ejercer una acción tóxica directa sobre los patógenos y causar la inducción de la muerte celular programada en el sitio de infección a fin de limitar la invasión o diseminación de los patógenos y actuar como activadores de otras respuestas que se inducen para combatir al patógeno. La figura 1.13, muestra un ejemplo en el cual intervienen otros tipos de mecanismos de defensa orquestados por micro-ARN en plantas de aguacate infectadas por el hongo ascomiceto *Fusarium solani*. La planta es capaz de reconocer al patógeno gracias a proteínas específicas que se encuentran en su membrana celular. Una vez reconocido, se generan señales que se translocan al núcleo de la célula permitiendo la activación de genes relacionados con la defensa. Al mismo tiempo, micro-ARNs que tienen la capacidad de regular la expresión de algunos de dichos genes.

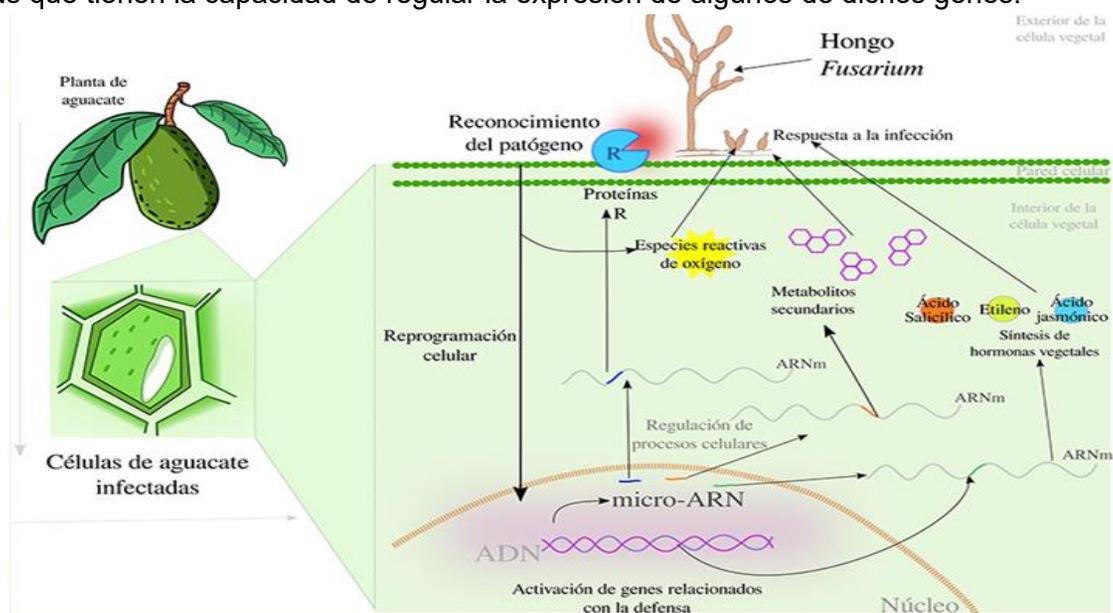


Figura 1. 13. Biosíntesis del metabolismo secundario en células infectadas del aguacate; En esta regulación se ven involucrados diversos procesos que le sirven a la planta para defenderse, Ej.; síntesis de hormonas vegetales, regulación de proteínas R, o la síntesis de metabolitos secundarios, sintetizados (ejemplificado con colores) (Michel Pale, 2020).

1.7. Cultivos *in vitro*

Los cultivos de células vegetales *in vitro* son una herramienta biotecnológica muy valiosa para diferentes propósitos que abarcan desde los estudios básicos y el mejoramiento genético hasta la producción de metabolitos secundarios. Actualmente existen diversas alternativas para la producción de metabolitos secundarios, ya sea de manera directa o indirecta. La obtención directa se refiere a la extracción o síntesis química. La primera, sin embargo, está limitada por la

disponibilidad del material vegetal que, depende a su vez, 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 síntesis química, por su parte, suele presentar dificultades como la disponibilidad de los precursores, la estereo especificidad de las reacciones, la inestabilidad de los productos, la dificultad de algunas reacciones químicas y los elevados costos de producción (Sabater-Jara., 2013).

Para la producción de metabolitos secundarios, los cultivos de células en suspensión pueden presentar numerosas ventajas, aunque también presentan varias limitaciones, principalmente por 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
- b) Cultivo de células diferenciadas, la inmovilización de células vegetales.
- c) Empleo de inductores y la aplicación de condiciones de estrés, entre otros.

De este modo, 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. Por ello, 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).

1.8. Uso de inductores para la producción de metabolitos secundarios.

Aunque las plantas tienen un bajo potencial para la síntesis de metabolitos secundarios, se han realizado diversos estudios dirigidos al desarrollo de estrategias para incrementarla en cultivo *in vitro*. Entre estas alternativas se encuentra el uso de inductores (Sabater-Jara, 2013; Bru *et al.*, 2006). La inducción consiste en la aplicación de tratamientos que activan la formación de metabolitos y se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas con este propósito. Un inductor puede ser cualquier factor biótico o abiótico que, aplicado 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). 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. Hay metabolitos secundarios capaces de ser inducidos, un ejemplo es el alcaloide nicotina presente siempre en *Nicotiana tabacum* (Preis-ser *et al.*, 2007). El daño en las hojas por herbívora incrementa su síntesis en raíces, luego se transporta a los brotes donde puede ser letal para los herbívoros (Karban y Baldwin, 1997), es decir, el consumo de hojas induce un incremento en el alcaloide; también, cuando hay infección por nematodos en las raíces, la planta deja de crecer e incrementa la producción del alcaloide para hacer frente a la enfermedad.

El proceso descrito (Figura 1.14) estimula la producción de las hormonas de defensa. Principalmente el ácido jasmónico (AJ) y compuesto que actúa localmente y sistémicamente, induciendo las rutas metabólicas de las que resultan las proteínas PR (*Pathogenesis-related*), la fitoalexinas, las defensinas, los inhibidores de proteínas. “Con los compuestos elicitors buscamos preparar a la planta para la interacción con los patógenos. Entre los factores a considerar en la inducción 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, pueden influir en la producción exitosa de un metabolito secundario (Halder *et al.*, 2019; Singh y Dwivedi, 2018).

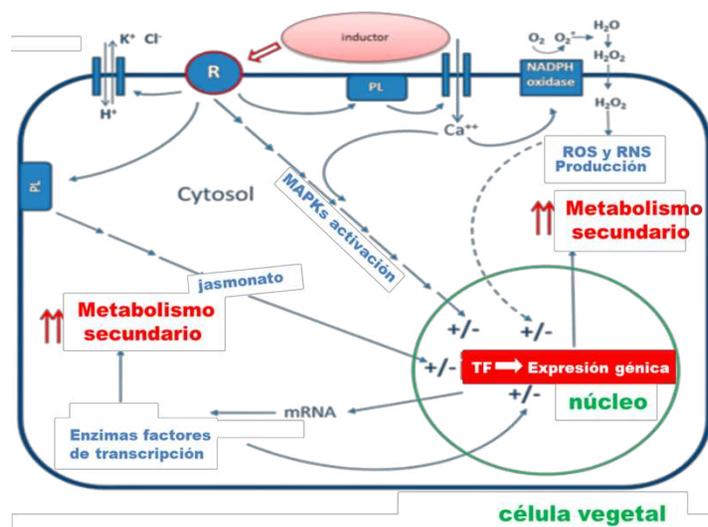


Figura 1. 14. Modo de acción del jasmonato en el proceso de inducción del metabolismo secundario (R: receptor; PL: fosfolipasa; MAPK: proteína cinasas activadas por mitógenos; ROS: especies reactivas de oxígeno; RNS: especies reactivas de nitrógeno; TF: factores de transcripción) (Ramírez-Estrada *et al.*, 2015).

Los inductores participan desde la etapa de infección temprana en el reconocimiento del patógeno. Esto es muy importante para que la planta logre defenderse. Se propone que el reconocimiento del inductor por la planta está mediado por receptores celulares específicos, los

cuales inician los procesos de señalización que termina activando las defensas de las plantas. Un mecanismo general para la elicitación biótica en plantas puede resumirse sobre la base de la interacción inductor-receptor, mostrado en la Fig. 1.14.

Cuando una planta o cultivo de células vegetales es expuesto a un inductor se produce una serie de actividades bioquímica como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis como quitinasas y glucanasas, muerte celular en el sitio de infección (respuesta hipersensible), cambios estructurales en la pared celular (lignificación de la pared celular), activación transcripcional de los correspondientes genes de respuesta de defensa, y la síntesis de moléculas defensivas, como los taninos y las fitoalexinas, síntesis de ácidos jasmónicos y salicílicos como mensajeros secundarios, y finalmente la resistencia sistémica adquirida. (Fig.1.14)

Cuadro 1. Sustancias elicitoras y su efecto de control en cultivos específicos. Inductores químicos y sus efectos de sobre cultivos celulares de diferentes especies. Fuente: Wiesel *et al.*, 2014.

Inductores	Efectivo contra	Cultivo (Referencia)
Oligogalacturónidos	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Blumeria graminis</i>	Varios (Aziz et al., 2007; Randoux et al., 2010; Galletti et al., 2011)
Extracto de <i>Reynoutria sachalinensis</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Leveillula taurica</i>	Pepino, tomate (Daayf et al., 1997, 2000; Konstantinidou-Doltsinis et al., 2006)
Fructooligosacárido de <i>Arctium lappa</i>	<i>Colletotrichum lagenarium</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , TMV	Pepino, tomate, tabaco (Wang et al., 2009; Guo et al., 2012)
Elicitor peptídico 1	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> , <i>Colletotrichum graminicola</i>	Maíz (Huffaker et al., 2011)
Carragenanos	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , TMV	<i>A. thaliana</i> , tabaco (Sangha et al., 2010; Vera et al., 2011)
Fucanos	TMV	Tabaco (Vera et al., 2011)
Ulvans	Varios	Varios (Jaulneau et al., 2011; Vera et al., 2011)
Laminarina	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Plasmopara viticola</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium solani</i>	Frijol, uva de vino, tabaco (Craigie, 2011; Vera et al., 2011)

1.9. Inductores como herramienta biotecnológica para la producción de metabolitos secundarios

Como ya se indicó, los inductores son productos o factores químicos que activan la respuesta de defensa de las plantas. Puesto que parte de ésta incluye la síntesis de metabolitos secundarios específicos, puede ser utilizada para aumentar su producción como estrategia biotecnológica. Se ha observado que los inductores promueven el reordenamiento del flujo metabólico de una vía constitutiva, hacia una vía específica que es activada por el agente. Esta regulación diferencial en la biosíntesis de productos alternos refleja una característica importante del papel del metabolismo secundario en las plantas, que es mediada por el inductor (Kaur *et al.*, 2021; Ferrari, 2010).

Los inductores actúan como una señal, cuya percepción por receptores específicos presentes en la membrana de la célula vegetal inicia el proceso de respuesta. Esto continúa con una cascada de transducción de señales que implica eventos reversibles de fosforilación y desfosforilación de proteínas, tanto membranales como citosólicas, 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 proteínas cinasas 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 en las vías metabólicas secundarias. Esto da 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. 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).

Uno de los aspectos esenciales para el empleo de la inducción en la producción biotecnológica de metabolitos secundarios es la optimización del tipo de inductor, así como la dosis y el tiempo de exposición y depende tanto para la especie vegetal, como para la ruta biosintética. Por lo tanto, un inductor podría o no estimular el metabolismo secundario de la misma manera en diferentes especies o no afectar del mismo modo a los diferentes grupos de metabolitos secundarios aún en la misma especie.

Los inductores no solo ayudan a mejorar la acumulación de un metabolito, sino que también pueden estimular su excreción al medio extracelular, lo que incide en su recuperación y purificación. Por ello, 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 uno. 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).

Por otro lado, la transducción de las señales activada por inductores, que consiste en la red de múltiples componentes que establece la respuesta de defensa, actúa mediante diversas reacciones secuenciales, con vías de señalización paralelas o reticuladas que conducen a las diferentes respuestas requeridas para la defensa eficaz. Así, las vías de señalización activadas por un inductor pueden variar en la percepción de diferentes estímulos o respuestas de defensa del objetivo, incluso puede generar, además de la acumulación de metabolitos, 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). Por ello, 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).

1. 10. Compuestos comerciales inductores de la defensa de las plantas

Algunos compuestos que se emplean como inductores corresponden a productos comerciales, como los siguientes.

Fosfito de potasio. Se ha empleado como inductor de la síntesis de fitoalexinas al estimular a la enzima PAL (fenilalanina amonio-liasa), clave en la producción de compuestos tipo fenoles, (como el resveratrol), ligninas, suberinas y compuestos derivados del ácido cinámico. Todos estos son parte de los mecanismos de defensa de la planta. Los fosfitos en general cuentan con alta movilidad dentro de la planta y las fitoalexinas inducidas tienen efecto sobre hongos de la familia de los oomicetos. Su uso se recomienda cuando no existen deficiencias de fósforo, ya que puede presentar efectos contraproducentes.

El Glutatión; es un compuesto tripéptido formado por la unión de ácido glutámico, cisteína y glicina. Actúa como reductor en diferentes reacciones metabólicas, es un componente de la

resistencia de plantas a enfermedades y tiene acción desintoxicante en las células. Las Oligosacarinas, consisten en cadenas de glucósidos que se forman como productos de la hidrólisis enzimática de las paredes celulares por acción de patógenos. Estas moléculas activan genes de resistencia por hipersensibilidad que inducen la producción de compuestos de protección.

Las saponinas se encuentran en el tejido de soporte de las plantas, cumplen función de protección desintegrando la membrana del organismo patógeno.

Por otro lado, existen compuestos no comerciales los cuales actúan como inductores biológicos estos, 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.

Debido a que existen especies de hongos como por ejemplo como *Fusarium* la cual es causante de una gran cantidad de enfermedades en cultivos de todo el mundo que generan importantes pérdidas económicas, se han implementado y desarrollando la aplicación y el uso de inductores, los cuales actúan como simuladores de los factores bióticos los cuales desencadenan un cambio en el metabolismo de la planta al generar liberación de compuestos específicos, los cuales son utilizados como defensas contra diferentes agentes patógenos como por ejemplo *Fusarium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Alternaria spp.*, entre otros por lo tanto en el siguiente (cuadro 2) podemos observar las diferentes especies de plantas que al ser inducidas por diferentes compuestos abióticos y que en reacción a ello producen algún compuesto el cual tiene una aplicación específica.

Cuadro 2. Listado de inductores y su efecto en diferentes plantas. Fuente: Thakur y Singh, 2012.

Planta	inductor	Aplicación
Tomate	Ácido Salicílico	Disminuye la susceptibilidad a patógenos y estrés abiótico. Induce síntesis de proteínas de estrés, que incrementan resistencia al frío. (Shirasu <i>et al.</i> , 1997; García <i>et al.</i> , 2002)
Tomate	Ácido Oligogalacturónico	Reducen apertura estomática; acelera el cierre de estomas. (Lee <i>et al.</i> , 1999)
Tomate	Quitosano	Inhibe apertura estomática inducida por luz y produce mayor resistencia a <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Phytophthora capsici</i> . (Ortega <i>et al.</i> , 2003; Ortega <i>et al.</i> , 2007)

Tomate	Genes Antivirulentos (AVR)	Activación de respuesta hipersensitiva. (Leach and White, 1996)
Colza	Jasmonato de Metilo	Acumulación de indolil glucosinolatos (repelentes) en las hojas. (Doughty <i>et al.</i> , 1995)
Colza	Ácido Salicílico y Óxido Nítrico	Aumenta actividades de enzimas antioxidantes, mejora el contenido de clorofila y disminuye el nivel de peroxidación de lípidos. (Kazemi <i>et al.</i> , 2010)
Arroz	Benzotiazol	Protege contra mildiu polvoso afectando el ciclo de vida del patógeno. (Görlach <i>et al.</i> , 1996)
Col	Benzotiazol	Induce síntesis de quitinasa y resistencia al virus de necrosis del tabaco y mildiu veloso en plantas de semillero y de 30 días. (Godard <i>et al.</i> , 1999)
Col	Ácido salicílico, Quitosano, Jasmonato de metilo	Inducen incremento en contenido de vitamina C. Tratamientos con jasmonato de metilo y ácido salicílico incrementaron la concentración de flavonoides. (Pérez <i>et al.</i> , 2011)
Frijol	Ácido Salicílico y Jasmonato de Metilo	Controlan infestaciones de ácaros, incrementa crecimiento y rendimiento. (Farouk y Osman, 2011)
Soya	Benzotiazol	Disminución de la decoloración del tallo, aumento de la germinación, pigmentos fotosintéticos, compuestos fenólicos y flavonoides. (Nafie y Mazen, 2008)
Soya	Benzotiazol y ácido húmico	Reduce Damping-off y marchitez, e incrementa parámetros de crecimiento. (Abdel <i>et al.</i> , 2011)
Remolacha	Benzotiazol	Induce síntesis de quitinasa y provee resistencia al virus de necrosis del tabaco. (Burketová <i>et al.</i> , 1999)

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

La presencia de alcaloides bencilisoquinolínicos, como la berberina ha sido registrada en suspensiones celulares de *C. japonica*, *T. flavum*, *T. minus* y *T. rugosum* (Nakagawa *et al.*, 1986; Funk *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 1990). Por su parte, la sanguinarina se ha encontrado en suspensiones celulares de *A. mexicana*, donde se acumula en cantidades significativas, aún en condiciones de mantenimiento (Campos-Tamayo, 2002). Esto es interesante ya que este alcaloide solamente se detecta como trazas en suspensiones celulares de otras especies como *E. californica* y *S. canadensis* (Ikuta, 1998). Esto indica que los cultivos celulares de *Argemone* producen cantidades importantes, aún antes de aplicar algún tratamiento de inducción (Rubio-Piña, 2009; Trujillo-Villanueva, 2010) y que los procesos de síntesis de este alcaloide pueden presentar características particulares en las diferentes especies que los producen. Sin embargo,

en las suspensiones celulares de *A. mexicana* no ha sido posible encontrar la presencia de berberina (Eilert et al., 1986; Ikuta et al., 1998; Weiss et al., 2006).

Los cultivos celulares de *A. mexicana* responden al tratamiento con inductores acumulando alcaloides, esta respuesta varía de acuerdo con el inductor utilizado. La acumulación de sanguinarina en cultivos tratados con jasmonato de metilo (MeJA) 100 μ M puede alcanzar valores de hasta 0.12 mg/g de peso seco, duplicando el rendimiento de los cultivos no expuestos. Por su parte, el ácido salicílico (AS) en la misma concentración (100 μ M) no indujo este aumento, aunque tampoco la inhibió. Por otro lado, la aplicación de homogenizados de *F. oxysporum* (equivalente a 1 cm² de micelio) produjo un aumento significativo después de 96 h, con valores superiores a los 0.4 mg/g PS que equivale a 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 extracto de levadura (EL) (200 mg/L) a cultivos celulares de *A. mexicana* resultó en la mayor acumulación de sanguinarina alcanzando valores de 0.190 mg/g PS a las 96 h comparada con la aplicación simultánea (0.108 mg/g PS a las 96 h) e individual, donde la inducción con MeJA duplicó la acumulación de sanguinarina (0.040 mg/g PS) comparadas con las muestras control (0.020 mg/g PS). (Trujillo-Villanueva et al., 2010) y la exposición a EL (extracto de levadura) resultó en una importante acumulación de sanguinarina (108 mg/g PS). Estos resultados demostraron 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).

Aun cuando el uso de inductores en cultivos celulares de *A. mexicana* L. puede generar un aumento en la producción de sanguinarina, 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 sanguinarina. De aquí, el interés por comprender de qué manera los inductores intervienen en la síntesis de otros alcaloides en cultivos celulares de *A. mexicana*.

Por otro lado, los inductores que hasta ahora se han utilizado son compuestos que intervienen en la mediación de la respuesta de defensa, como el ácido salicílico y el MeJa, inductores genéricos con contienen residuos de componentes de pared de hongos, como el extracto de levadura o bien, preparaciones de hongos patógenos, pero que no son propios de *Argemone*. Aunque los trabajos previos sobre la inducción de cultivos in vitro de *Argemone* han permitido

establecer las bases de la respuesta a la interacción con hongos y sugieren una posible participación de la sanguinarina, analizar los efectos de la interacción de esta planta con hongos que pueden colonizar sus tejidos, permitirá conocer de manera más precisa los componentes bioquímicos de la misma.

1.12 RECAPITULACIÓN

Las moléculas que pueden desencadenar respuestas de defensa de las plantas se definen como elicitores o inductores los cuales son sustancias o microorganismo que, al ser aplicado a una planta, desencadena sus mecanismos de defensa natural contra patógenos (hongos, bacterias, virus, etc.) y plagas. Estos inductores no atacan directamente al patógeno, sino que preparan a la planta para que pueda defenderse mejor por sí misma.

Los inductores son agentes que pueden activan la síntesis de metabolitos secundarios en plantas, como parte de una respuesta de defensa. Los de origen biótico pueden ser de dos tipos; los exógenos que incluyen sustancias producidos por microorganismos y algunos patógenos. Entre estos se encuentran algunas enzimas microbianas, lisados de hongos y bacterias, extracto de levadura y los polisacáridos. Por otro lado, los endógenos son producidos por las propias plantas después de la acción del patógeno como las hormonas vegetales, los jasmonato o el ácido salicílico.

Por otra parte, *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae), es una planta productora de alcaloides bencilisoquinolínicos, principalmente sanguinarina y berberina, que corresponden a los tipos benzofenantridina y protoberberina, respectivamente, con propiedades antimicrobianas (Rubio-Piña y Vázquez-Flota, 2013). Se espera que durante el proceso de infección ocurran cambios en la acumulación de estos alcaloides, sugiriendo que el incremento de estos alcaloides se presente como respuesta a la defensa ante un ataque del patógeno.

Estudios previos han reportado la acumulación de sanguinarina o dihidrosanguinarina en una línea de células en suspensión de *A. mexicana* sometidos a inductores del metabolismo secundario como MeJA, ácido salicílico y homogenizados fúngicos de *F. oxysporum* (Guizar-González et al., 2016; Trujillo-Villanueva et al., 2012; Trujillo- Villanueva et al., 2010).

Por último, recientemente se han aislado e identificado diversas especies de hongos asociados a lesiones foliares en plantas de *A. mexicana*. Pruebas de patogenicidad realizadas con cuatro de éstas; *F. solani*, *C. cassicola*, *C. cladosporioides* y *L. theobromae*, encontrándose que solamente

C. cassicola fue capaz de producir una infección primaria. Por ello, en este trabajo se planteó el utilizar preparaciones elaboradas de cultivos de estos hongos como inductores en *A. mexicana*.

1.13 JUSTIFICACIÓN

Argemone mexicana es una especie productora de ABIs, principalmente berberina y sanguinarina. Sin embargo, es posible encontrar otros alcaloides como queleritrina, protopina, pancorina, argenaxina entre otros. Algunos de estos alcaloides tienen actividad antimicrobiana. 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 genéricos del metabolismo secundario como MeJA, ácido salicílico, extracto de levadura y los homogenizados de *F. oxysporum* sobre la acumulación de sanguinarina o dihidrosanguinarina en una línea celular de *A. mexicana*. Sin embargo, aún no se ha estudiado lo que yo hice en mi tesis, Consecuentemente, en este trabajo se plantea utilizar preparaciones de hongos aislados de la propia planta por lo que se espera tener una respuesta más apegada a las posibles reacciones de defensa que esta planta pueda presentar al ataque por hongos.

1.14 HIPÓTESIS

Células y tejidos de *A. mexicana* expuestos a preparaciones de hongos aislados de la propia planta inducen la síntesis de alcaloides.

1.15 OBJETIVO GENERAL

Analizar la acumulación de alcaloides en cultivos *in vitro* de *Argemone mexicana* expuestos a inductores elaborados a partir de hongos aislados de la misma planta.

1.16 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el contenido de alcaloides en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* expuestos a filtrados de cultivos de los hongos *L. theobromae*, *C. cladosporoides*, *F. solani* y *C. cassicola*.
- Analizar el contenido de alcaloides en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* expuestos a homogenizados de cultivos de los hongos *L. theobromae*, *C. cladosporioides*, *F. solani* y *C. cassicola*.

- Analizar el contenido de alcaloides en hojas escindidas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de cultivos de los hongos *L. theobromae*, *C. cladosporioides*, *F. solani* y *C. cassiicola*.

1.17 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental (Fig. 1. 15) se planteó con dos modelos de estudio: Cultivos *in vitro* y hojas escindidas provenientes de poblaciones silvestres de *Argemone mexicana*. En ambos casos los tejidos fueron expuestos a inductores preparados a partir de los hongos seleccionados.

Los hongos se cultivaron en medios líquidos y el micelio fue aislado por filtración y se esterilizó por autoclave. Las preparaciones utilizadas como inductores fueron tanto los filtrados como los homogenizados que se aplicaron en diferentes tiempos y dosis.

El contenido de alcaloides de los tejidos colectados en los diferentes tratamientos se analizó por cromatografía en capa fina (CCF) y los resultados se analizaron estadísticamente. Utilizando el programa Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (versión 2111).



Figura 1. 15. 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

Se emplearon dos tipos de material vegetal y cuatro especies de hongos para las preparaciones de inductores. Los materiales vegetales fueron suspensiones celulares y hojas escindidas.

2.1.1. Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares (Fig. 2.1) se obtuvieron a partir de una línea de callos AM1 provenientes de hojas de *A. mexicana* (Figura 2.1 A; Monforte-González et al., 2019). La resiembra de los callos se realizó cada 21 días en medio semisólido 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).

Las suspensiones se obtuvieron cultivando un gramo de tejido de callo en medio líquido con agitación. Una vez obtenidas, la resiembra de las suspensiones celulares se realizó cada 14 días en medio MS líquido con la composición previamente descrita, pero sin adicionar el gelificante. Las suspensiones de *A. mexicana* se mantuvieron en 50 mL medio de MS en matraces de 250 mL y con resiembras cada 14 días, en agitación continua a 100 rpm (Gyrotory Shaker G10, New Brunswick Scientific Co.Inc), 25° C, con 70% de humedad relativa e iluminación continua provista con lámparas de luz blanca fluorescentes de 39 W.

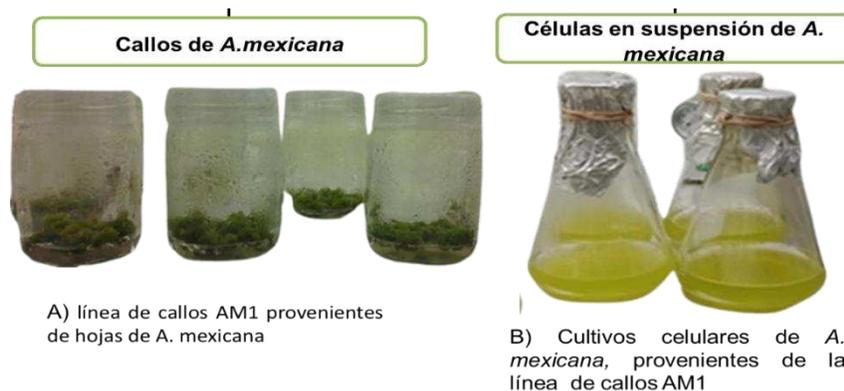


Figura 2. 1. A) línea de callos AM1 provenientes de hojas de *A. mexicana* (Monforte-González et al., 2019). B) cultivo *in vitro* de Células en suspensión de *A. mexicana* provenientes de callos de la línea AM1 (Monforte-González et al., 2019).

2.1.2. Hojas escindidas

Las plantas analizadas provenían de poblaciones silvestres colectadas en zonas urbanas de la localidad de Cholul, Municipio de Mérida Yucatán. Se colectaron plantas completas y se trasladaron al laboratorio donde se seleccionaron hojas completamente expandidas del segundo tercio del tallo, libres de lesiones evidentes. Las hojas seleccionadas fueron escindidas de la base, se lavaron con agua corriente se secaron con toallas de papel absorbente y se pesaron antes de los tratamientos (Figura 2.2).

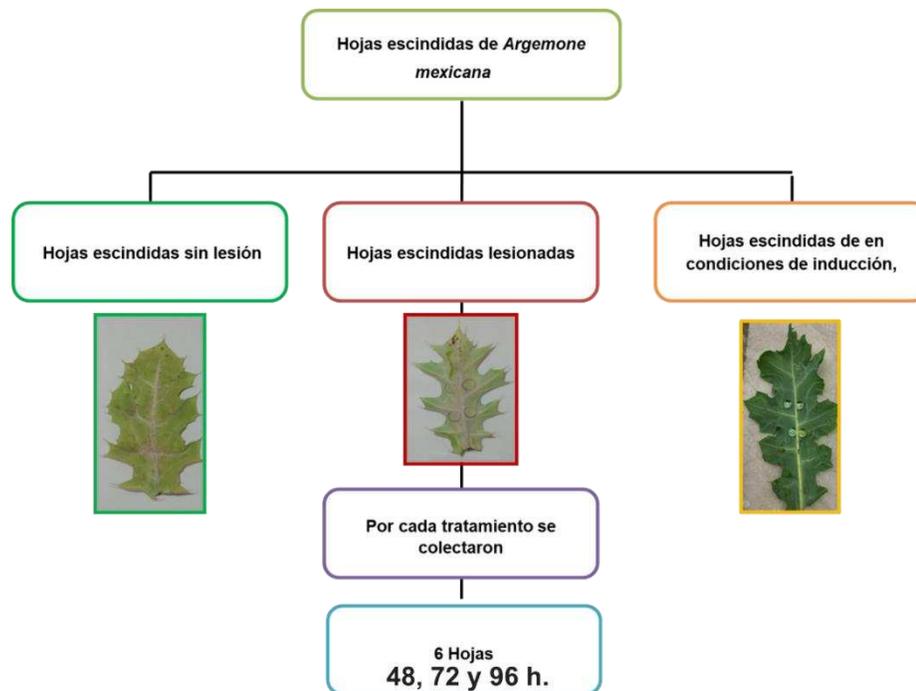


Figura 2. 2. Esquema de los tratamientos en las hojas de *A. mexicana* colectadas y analizadas.

2.1.3 Cultivos de hongos

Los cultivos de hongos de las cuatro especies seleccionadas; *L. theobromae*, *C. cladosporioides*, *F. solani* y *C. cassicola*, provienen de aislamientos a partir de hojas infectadas (Hernández-Eleria et al., 2025). Estas cepas han sido mantenidas de manera axénica en cajas Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) a temperatura ambiente e iluminación constante. Las cepas han sido resembradas cada siete días tomando como explante un disco de micelio de un cm de diámetro y colocándolo sobre medio fresco (Hernández-Eleria et al., 2025). Todas las manipulaciones se hacen en una campana de flujo laminar (Fig. 2.3).



Figura 2. 3. Esquema de la técnica para el mantenimiento de los cultivos *in vitro* de hongos en medio sólido papa agar dextrosa (PDA). No es un medio semisólido es sólido.

2.2. Procedimientos y análisis

2.2.1. Preparación de los inductores fúngicos

La elaboración de los inductores se llevó a cabo de la siguiente manera: colecta del tejido; Explantes de tejidos de hogos (*L. theobromae*, *C. cladosporioides*, *C. cassicola* y *F. solani*). fueron cultivados durante 7 días en medio sólido, papa agar dextrosa (PDA). Al pasar el tiempo de crecimiento se colecto un explante de 1 cm de diámetro del micelio el cual fue vertido a un cultivo líquido para el crecimiento del hongo, elaborado de agua destilada y medio de caldo papa dextrosa (PDB). Se utilizaron matraces de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio PDB. Después de seis días de ser expuestos en un cuarto de cultivo a 25°C y agitación a 110 rpm fueron colectados. Para la obtención de los filtrados; fueron separados el micelio del caldo de cultivo utilizando gasas esterilizadas colectando los micelios y estos se congelaron a -20 °C. El sobrenadante (caldo de cultivo), fue esterilizado en la autoclave, posterior a ello antes de

realizar las inducciones, el (caldo de cultivo) paso por un filtro estéril de nylon de 0.22 μm de poro, utilizando una jeringa y colectando el filtrado en un tubo estéril (Fig. 2.4). El filtrado se dividió en alícuotas de 50 mL que se mantuvieron en congelación hasta su uso.

para la elaboración del homogenizado; de igual modo, los explantes de tejidos de hogos (*L. theobromae*, *C. cladosporioides*, *C. cassicola* y *F. solani*). fueron cultivados durante 7 días en medio sólido, papa agar dextrosa (PDA). Al pasar el tiempo de crecimiento se colecto un explante de 1 cm de diámetro del micelio, el cual fue vertido a un cultivo líquido para el crecimiento del hongo; elaborado de agua destilada y medio de caldo papa dextrosa (PDB). Posterior a ello el sobrenadante junto con el micelio presente en el cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 30 min en 15 mL de amortiguador de fosfato 100 Mm y 7.0.(Figura 2.5). Después todo el cultivo fue triturado, de igual manera antes de realizar las inducciones, lo colectado paso por un filtro estéril de nylon de 0.22 μm de poro, utilizando una jeringa y colectando el filtrado en tubos esterilizados, siendo divididos en alícuotas de 50mL.

El contenido de proteína soluble del homogenizado y del filtrado se determinó por el método de Bradford (Cerna et al., 2010).

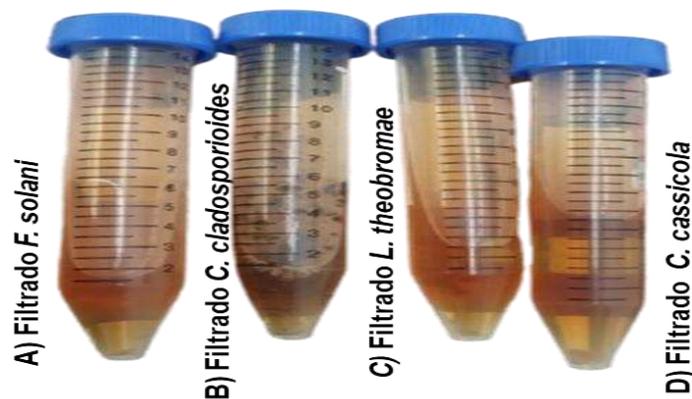


Figura 2.4. cultivos en agitación de las cuatro especies seleccionadas; A) *F. solani*, B) *C. cladosporioides*; C) *L. theobromae* y D) *C. cassicola*.

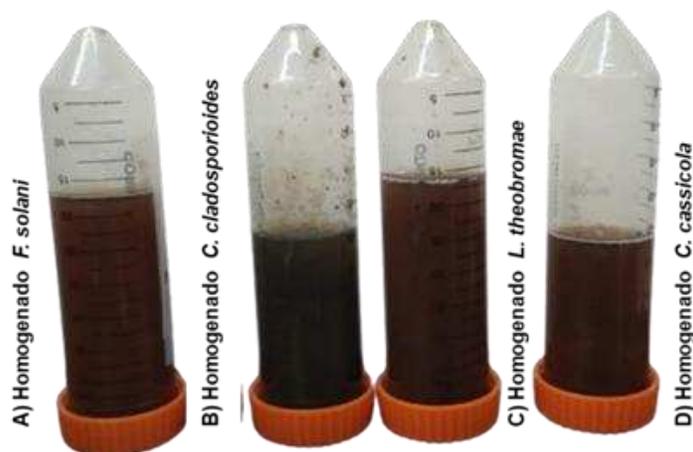


Figura 2.5. cultivos en agitación de las cuatro especies seleccionadas; A) *F. solani*, B) *C. cladosporioides*; C) *L. theobromae* y D) *C. cassicola*.

Cultivos *in vitro* de *Argemone mexicana* fueron inducidos con (homogenizados y filtrados) de las especies de hongos previamente mencionadas. Las células en suspensión fueron inducidas con homogenizados y filtrados de las cuatro especies de hongos, para las hojas se emplearon únicamente homogenizados.

2.2.2. Aplicación de inductores a cultivos *in vitro*

Para la aplicación de las inducciones se partió de cultivos de células en suspensión de *A. mexicana* de 14 días. Cumpliendo ese tiempo establecido se colectaron de los matraces previos 10 mL del cultivo de células de *A. mexicana* equivalente a (2 g PF de la suspensión y estos se vertieron en matraces de 250mL, los cuales contenían 50 mL de medio Ms (Murashige y skoog). Los cultivos se mantuvieron durante 10 días en el cuarto de cultivo, bajo iluminación continua y agitación constante a 100 rpm.

Una vez cumplido el tiempo (10 días), se procedió a realizar la inducción con las preparaciones fúngicas de *L. theobromae*, *C. cladosporioides*, *C. cassicola* y *F. solani*.

Los tratamientos de inducción se llevaron a cabo utilizando los dos tipos de preparaciones; células en suspensión de *A. mexicana* fueron inducidas con filtrados y homogenizados de las especies previamente seleccionadas. Las dosis y tiempos de exposición se describen en la sección de Resultados. Cada tratamiento se aplicó por triplicado.

2.2.3. Colecta y disección de las plantas de *A. mexicana* y aplicación de los tratamientos

Se colectaron plantas sanas, provenientes de un lote ubicado en el norte de la ciudad de Mérida. (fig.2.6), de las cuales se tomaron sus hojas para ser expuestas a homogenizados de hongos. Las plantas colectadas tenían entre 40 y 60 cm de altura, con flores y frutos maduros (edad aproximada de entre 2 y 3 meses). Las colectas se hicieron entre febrero y marzo de 2024.



Figura 2.6. Aspecto de las plantas de *A. mexicana* y de las hojas colectadas

Se colectaron tres individuos de cada población y, de cada individuo, se colectaron muestras de hojas para los análisis (Fig. 2.7).



Figura 2.7 Aspecto de hojas colectadas de *A. mexicana* colectas

Los tratamientos se aplicaron sobre hojas sanas incubadas en contenedores de tereftalato de polietileno (PET). Para cada tratamiento se emplearon seis hojas. A cinco de ellas se les realizaron cortes superficiales con un sacabocados de 5 mm de diámetro (lesión). Se hicieron cuatro incisiones paralelas a la nervadura central de la hoja, sobre la cara abaxial. Los homogenizados se aplicaron sobre las lesiones. Una hoja lesionada se mantuvo sin ningún tratamiento (control lesión), al igual que una hoja intacta (control intacto), en el mismo contenedor

a lo largo del experimento. Una hoja más se colectó al inicio del experimento, sin recibir ningún tratamiento (T0) (Fig. 2.8). Las hojas se expusieron a la dosis de 4 mL , equivalente a 0.25 mg de proteína de los homogenizados de micelio de *F. solani*, *C. cassiicola*, *C. cladosporioides* y *L. theobromae* y se mantuvieron en los contenedores sobre papel toalla húmedo durante 48, 72 y 96 h a temperatura ambiente e iluminación natural (Fig. 2.8). Las preparaciones se aplicaron sobre las lesiones, con una micropipeta y tomando las precauciones para que la aplicación se hiciera como una sola gota y que ésta se mantuviera sobre la zona de la lesión. Cada tratamiento se aplicó por triplicado.



Figura 2.8 Aspecto de las hojas expuestas a los homogenizados de micelio de los diferentes hongos ensayados. Panel izquierdo y derecho, al inicio y término del periodo de incubación de 96 h

2.2.4 Inducción con homogenizados a hojas escindidas de *A. mexicana*

Previo a la exposición de los inductores, las hojas fueron sometidas a leve daño mecánico, aplicado con un sacabocado metálico de 5 mm de diámetro. Se realizaron cuatro incisiones a cada lado de la nervadura central, en la parte abaxial de la hoja, aplicando una ligera presión con el sacabocado, y las preparaciones de los inductores se aplicaron con una micropipeta en el centro de la lesión. Después de la exposición a los inductores, las hojas se mantuvieron en una cámara húmeda hecha con contenedores de polipropileno con toallas de papel y se mantuvieron a temperatura ambiente y a las condiciones de iluminación del laboratorio. Como controles se usaron hojas dañadas, pero no expuestas a los inductores y hojas sin lesionar (Figura 2.7). Se colectaron 6 hojas por cada grupo y los tejidos, se pesaron, y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

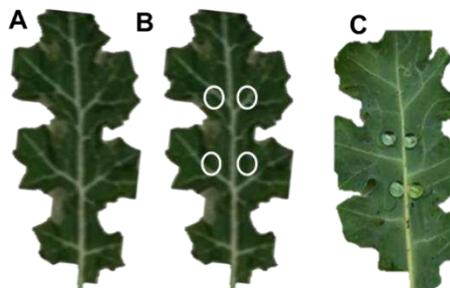


Figura 2. 9. A) Hoja escindida, B) Hoja escindida y realización de incisión de 5 mm en la parte abaxial, C) Hoja escindida con incisión y aplicación del inductor.

2.2.6. Extracción y cuantificación de proteína soluble

El contenido de proteína fue cuantificado con el fin de estandarizar el método, por lo tanto se obtuvieron contenidos de proteína soluble de los filtrados libres de células y de los homogenizados de micelio se determinó por el método de Bradford utilizando el colorante azul de Coomasie del paquete BioRad Protein Assay II (Cat. 5000002). Se tomaron 100 y 500 μL de homogenizados y filtrados, respectivamente y se completaron a 1 mL con agua desionizada. Se añadió un mL del reactivo del reactivo de Bradford del paquete diluido 1 en 10 en agua desionizada, las muestras se agitaron por 10 seg en el vortex, se incubaron por 5 min y se tomaron las lecturas de absorbancia a 595 nm. Los valores se interpolaron en un curva estándar elaborada con una solución de albúmina sérica bovina entre 0 y 1.0 mg mL^{-1} .

2.2.7. Extracción y cuantificación de alcaloides.

Los tejidos, células en suspensión u hojas, se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se secaron por liofilización a una temperatura de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una presión al vacío de 0.070mBar. en el equipo (Free Zone 4.5, 7750020, LABCONCO). Las hojas fueron secadas durante 2 días y para las células fueron secadas durante tres días, una vez liofilizados, se almacenaron en un ambiente anhidro hasta su análisis. Para las suspensiones celulares, solamente se analizó el componente celular que se colectó por filtración al vacío.

Para las extracciones se tomaron 0.12 g de tejido seco que se colocaron en matraces de 25 mL, se mezclaron con 15 mL de MeOH grado analítico y se incubaron a $46\text{ }^{\circ}\text{C}$, en agitación a 100 rpm, durante 2 h. El tejido se colectó por decantación en tubos falcón de 15 mL que se centrifugaron 8,000 rpm por 5 min para eliminar residuos. Se tomaron alícuotas de 500 μL , del

extracto que se pasaron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se redujeron por vacío en el equipo Centrivap (Heto RU) por 3 h.

Para su cuantificación, los alcaloides fueron separados por cromatografía en capa fina (CCF) y analizados por densitometría *in situ*. La cromatografía se realizó en placas de gel de sílica de 20 x 10 cm (Merck, cat. No. 1.05554.0004) con indicador fluorescente (F254). 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; una de ciclohexano: etanol 94:6 (v: v), que permite la separación de la sanguinarina. La segunda mezcla contenía; n-butanol: agua: hidróxido de amonio (8:1:1), que separa a la berberina. Las mezclas se prepararon al momento de su uso 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 3 segundos. 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 Rf de las muestras aplicadas con los estándares de sanguinarina (Rf, 0.36) y berberina (Rf 0.29), así como por los patrones de autofluorescencia que para la sanguinarina es de color naranja rojizo y para la berberina verde azulado. 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). Una vez separados, la cuantificación de sanguinarina y berberina 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 (Rf) y el área del componente y se registró el color de la auto fluorescencia.

2.3 Extracción y cuantificación de clorofilas.

Para la cuantificación de clorofilas, las hojas fueron extraídas con acetona al 80% y las concentraciones de clorofila a y b se determinaron midiendo la absorbancia a 663 y 645 nm, (Hiscox, J., & Israelstam., G 1979). Brevemente, para la obtención de los extractos, se tomaron 150 mg de peso fresco las muestras que se molieron con 1.5 mL de acetona al 80%. Las muestras fueron colectadas en microtubos de 1.5 mL y llevadas al vortex durante 2 minutos, se centrifugaron y se colectó el sobrenadante. La absorbancia se determinó en celdas de cuarzo de 3.5 mL, utilizando un espectrofotómetro DU-65. Los contenidos, en mg/mL se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

Para la determinación de clorofila a, b y total se utilizaron las ecuaciones descritas por Arnon (1949), usando los coeficientes de absorción específicos donde:

$$\text{Clorofila A} = (12.7 \times \text{Abs } 663) - (2.69 \times \text{Abs } 645),$$

$$\text{Clorofila B} = (22.9 \times \text{Abs } 645) - (4.68 \times \text{Abs } 663)$$

Clorofila Total = $(20.2 \times \text{Abs } 645) + (8.02 \times \text{Abs } 663)$ De acuerdo con los resultados obtenidos se realizó un análisis para determinar diferencias entre las muestras.

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), así como para el análisis de varianza.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Modelo de estudio Inducción de la línea AMME de *A. mexicana*

La exposición *in vitro* de suspensiones celulares a preparaciones fúngicas conduce a la acumulación de metabolitos secundarios. Por ello células en suspensión fueron expuestas a inductores (filtrados y homogenizados) de hongos, analizando la acumulación de alcaloides en cada uno de los tratamientos aplicados.

En algunos tratamientos se pudieron observar cambios de coloración en el medio como parte de las respuestas detectadas. También se registraron los cambios en la acumulación de peso fresco descritos a continuación, para los diferentes tratamientos de inducción de la línea AMME.

3.1.2 Modelo de estudio. Inducción de cultivos en suspensión de *A. mexicana* con homogenizados de micelio

Células en suspensión con 10 días de incubación, fueron inducidas con homogenizados de cuatro especies de hongos, aplicando diferentes dosis. Después de cumplir un tiempo de incubación de 24h al ser inducidas con homogenizados, estas fueron colectadas separando el medio de cultivo y el peso fresco de las células. Tanto el medio como el peso fresco las cuales fueron observadas, evaluando si sufrieron algún cambio de coloración, disminución en el crecimiento de peso fresco al haber aplicado los homogenizados en ellas.

Para las células que no fueron expuestas a ningún inductor consideradas el tiempo cero, no presentaron ningún cambio de coloración (Fig.3.1), puesto que son las células con un tiempo de exposición de 24h. ellas no tuvieron ninguna aplicación de algún tratamiento.

Para las dosis de 1, 2 y 3 mg equivalentes de proteína por matraz. No se observaron cambios notorios ni en la coloración ni el aspecto de las suspensiones en ninguno de los tratamientos (Figs. 3.2 y 3.3), sin embargo, las inducciones, con las dosis de 2 y 3 mg equivalentes de proteína para *C. cassiicola* y *L. theobromae* se observó una ligera coloración parduzca, sugiriendo que estos agentes producen la acumulación de metabolitos secundarios (Kaur et al., 2021; Halder et al., 2019).

(Figs. 3.4 y 3. 5). Esto es interesante ya que la acumulación de sanguinarina ocasiona una coloración rojiza-naranja en éstas, sugiriendo una posible inducción limitada. tampoco resultó afectado por los tratamientos (Fig. 3.6).

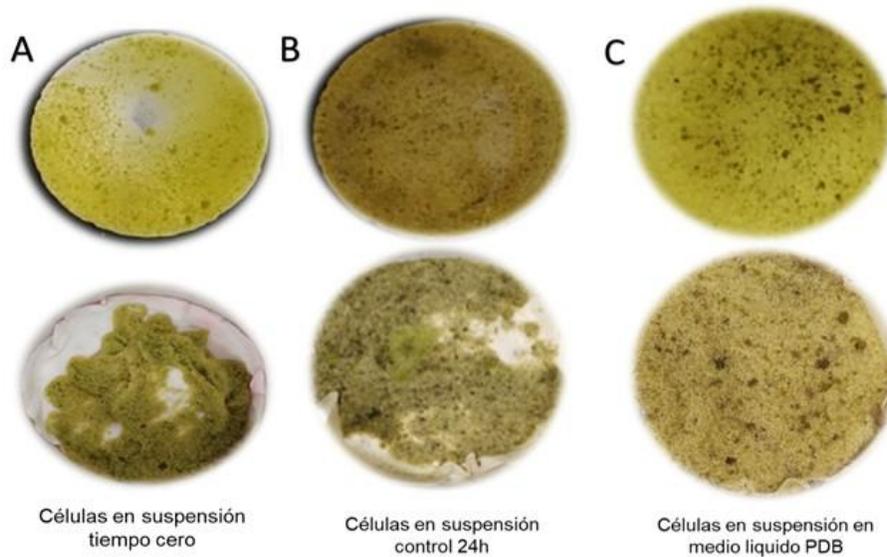


Figura 3.1. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana*, tiempo cero T0, (antes de la exposición los tratamientos, **A**) y después de 24 h, sin tratamiento (**B**), o expuestas medio de cultivo de los hongos). Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

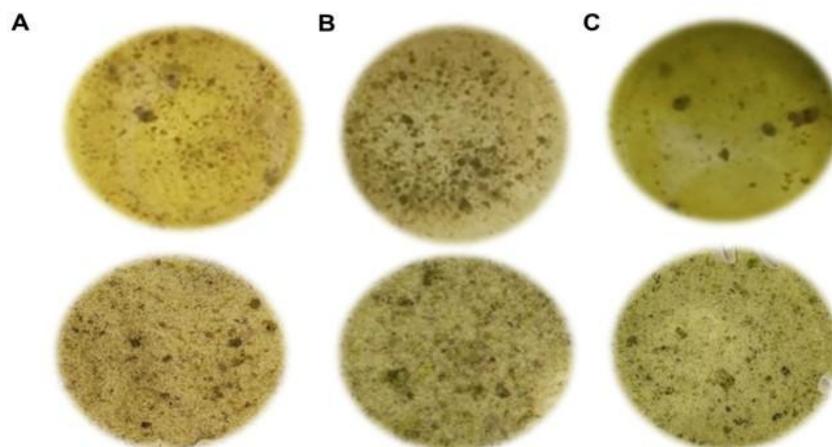


Figura 3.2. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *F. solani* equivalentes a 1 (**A**), 2 (**B**) y 3 (**C**) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

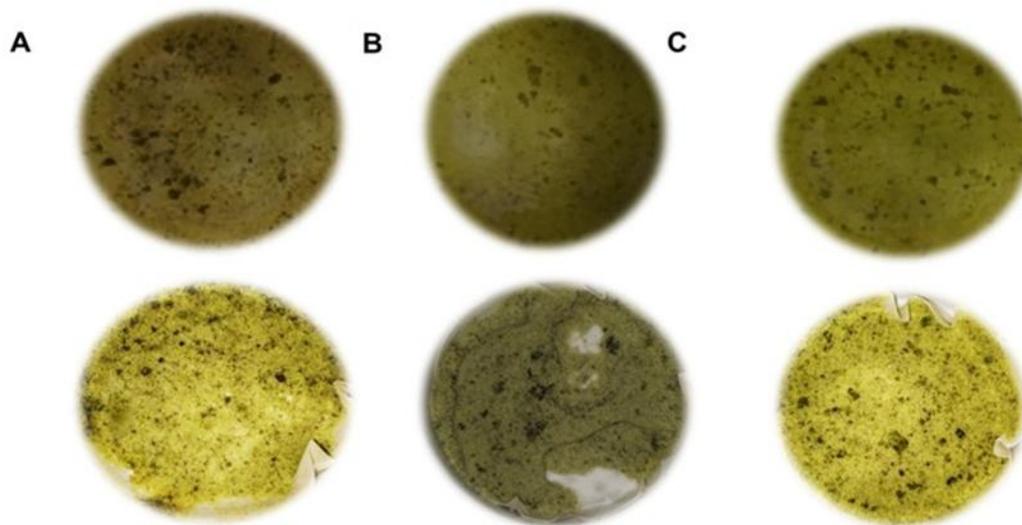


Figura 3.3. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *C. cassicola* equivalentes a 1 (A), 2 (B) y 3 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

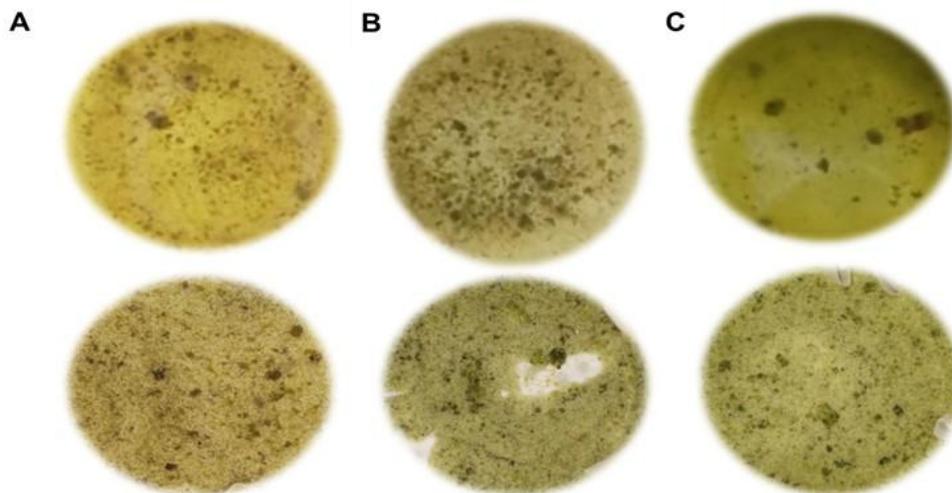


Figura 3.4. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *C. cladosporioides* equivalentes a 1 (A), 2 (B) y 3 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

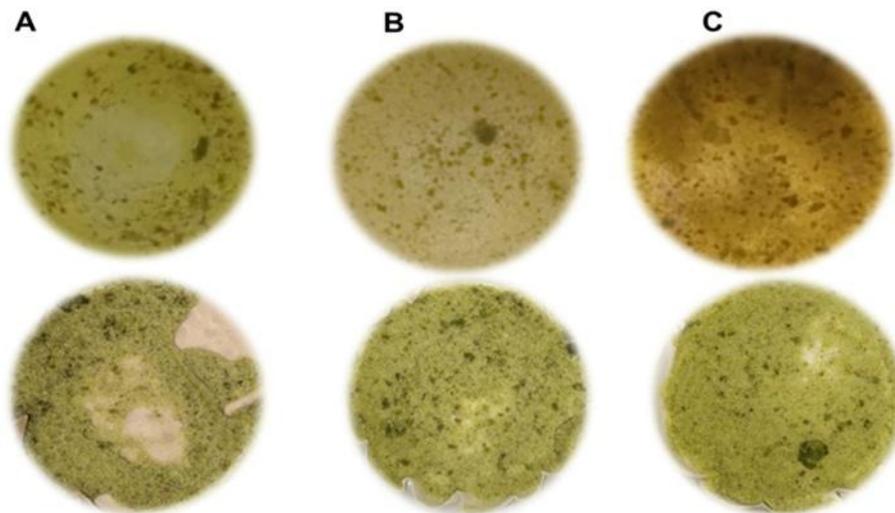


Figura 3.5. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *L. theobromae* equivalentes a 1 (A), 2 (B) y 3 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

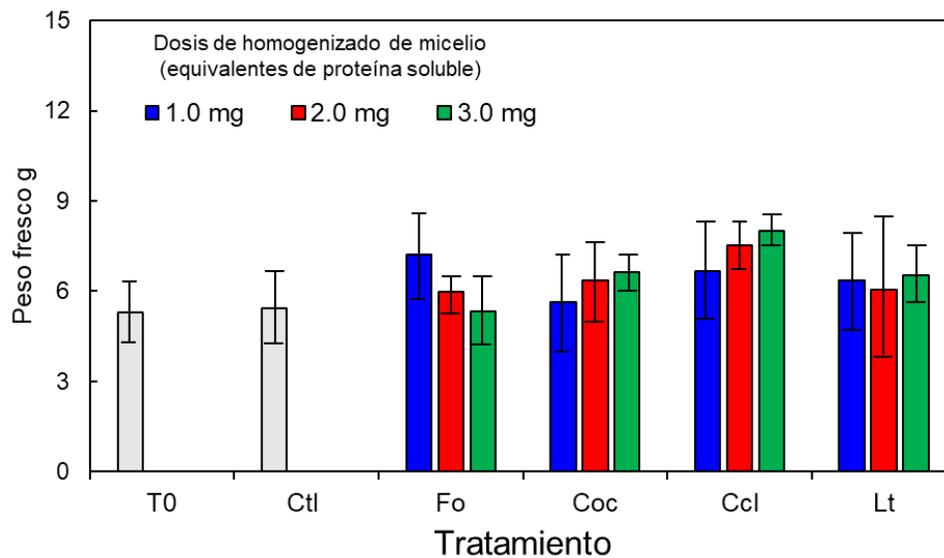


Figura 3.6. Crecimiento de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *F. solani* (Fo); *C. cassiicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). T0 corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con medio de cultivo del hongo por 24 h. Promedio de triplicados con la desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestos a PDB).

3.1.2 Inducción de cultivos en suspensión de *A. mexicana* con filtrados libres de células

Para las inducciones aplicadas a los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* con filtrados libres de células se emplearon dosis de 0.1, 0.5 y 1 mg equivalente de proteína por matraz durante 24 h. De nuevo, no se observaron cambios notorios en la coloración del medio para ninguno de los tratamientos al igual que para los extractos colectados (Fig. 3.7 a 3.10).

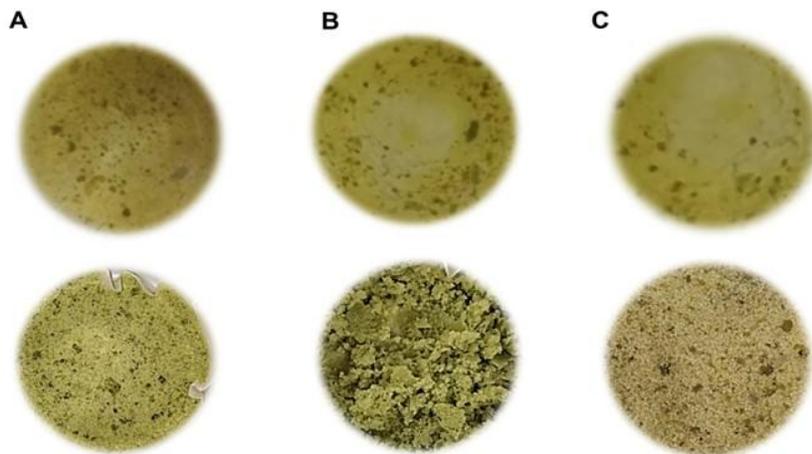


Figura 3.7. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *F. solani* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

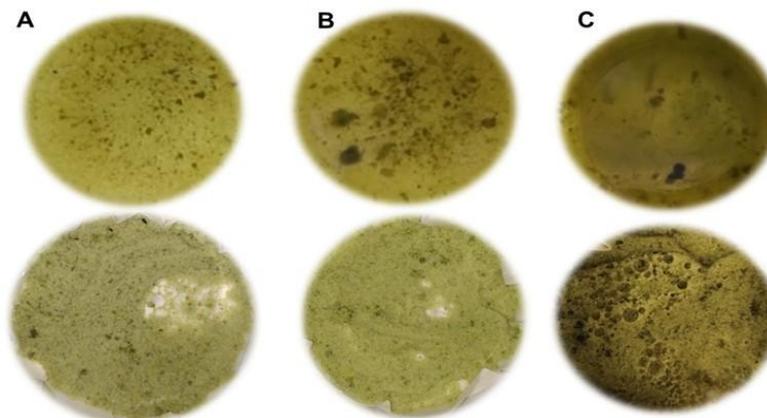


Figura 3.8. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *C. cassiicola* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

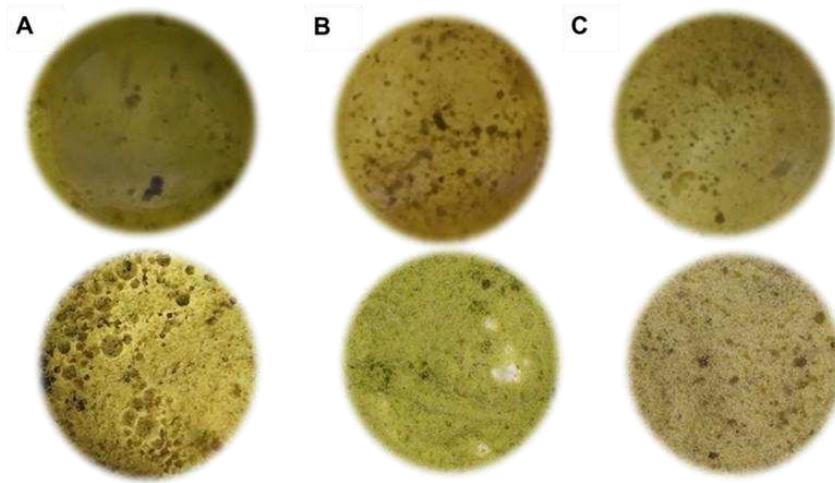


Figura 3.9. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *C. cladosporioides* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

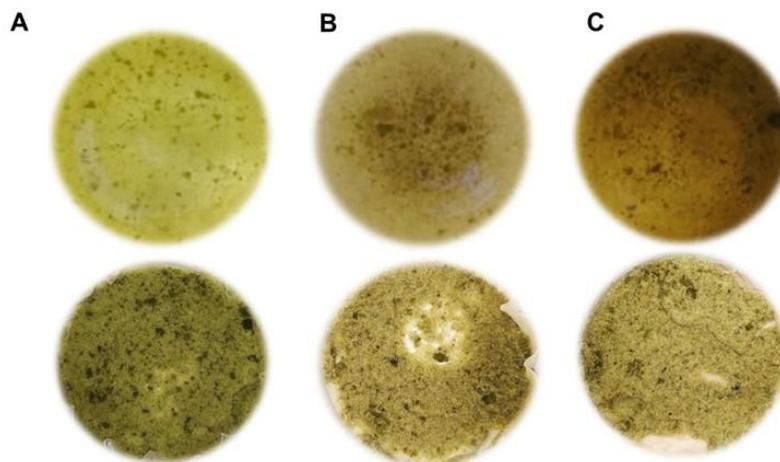


Figura 3.10. Aspecto de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados de cultivos de *L. theobromae* equivalentes a 0.1 (A), 0.5 (B) y 1.0 (C) mg de proteína. Para los tres casos se puede observar la vista inferior del matraz de cultivo con el paquete celular decantado (panel superior) y después de colectado por filtración (panel inferior).

Al igual que en los tratamientos con los homogenizados de micelio, no se observaron diferencias negativas sobre el crecimiento, medido como peso fresco, aplicando los filtrados como inductores, principalmente con la aplicación de la dosis 1mg al ser inducida con el homogenado de la especie *L. theobromae*, en la cual se puede observar un crecimiento positivo al aplicar esta dosis.

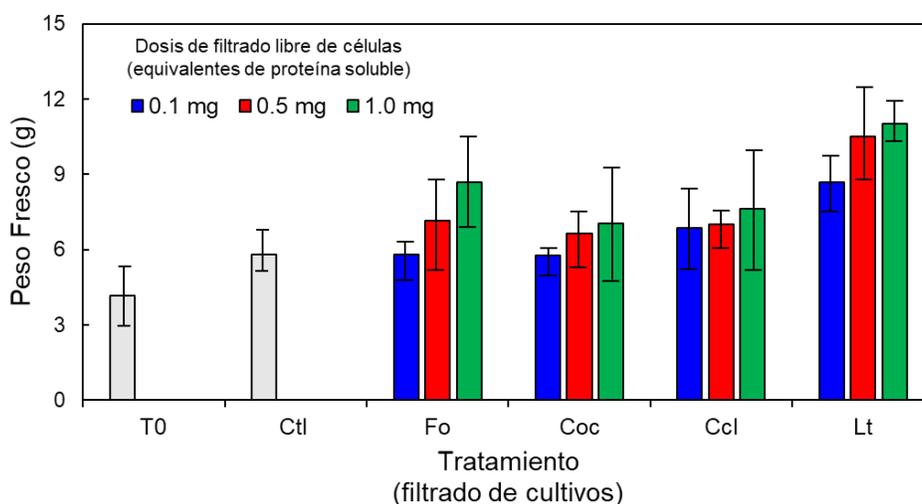


Figura 3.11. Crecimiento de las suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados libres de células de cultivos de *F. solani* (Fo); *C. cassicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). T0 corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con PDB por 24 h. Promedio de triplicados con la desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestos a PDB).

En conjunto, los resultados observados sugieren que los tratamientos aplicados, tanto con los homogenizados de micelio como los filtrados libres de células, no produjeron daños severos sobre las células en suspensión, ya que el aspecto de éstas no mostró cambios notables, respecto a los controles, ni la acumulación de biomasa resultó afectada.

3.2 Contenido de alcaloides en suspensiones celulares de *A. mexicana* expuestas homogenizados de micelio y filtrados libres de células

En los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* empleados en estos experimentos no se detectó la presencia de berberina (Monforte González et al., 2012). Esto se confirmó al analizar los extractos de suspensiones expuestas a los diferentes tratamientos (Fig. 3.12). Por su parte, los contenidos de sanguinarina alcanzaron valores entre 0.1 y 0.8 mg g⁻¹ PS. Sin embargo, debido a fallas en el suministro eléctrico en los cuartos de cultivo, las suspensiones

alteraron sus patrones de crecimiento, así como sus perfiles de acumulación de alcaloides, disminuyendo notablemente a valores entre 0 y 0.15 mg g⁻¹ PS.

Para los análisis de cromatografía en capa fina no se detectó la presencia de berberina en ninguna de las condiciones ensayadas. La Figura 3.12 muestra los resultados del análisis de extractos de suspensiones expuestas a filtrados de *L. theobromae*. Es conveniente mencionar que los límites de detección y cuantificación de berberina de este método son de 1.19 y 3.9 ng, respectivamente

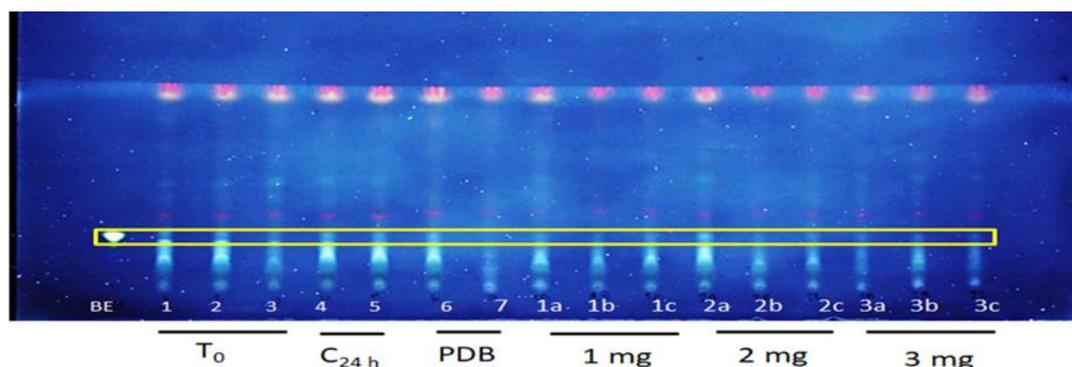


Figura 3.12. Análisis de berberina en suspensiones celulares de *A. mexicana* expuestas a filtrados libres de células de *L. theobromae*. **Carriles 1-3, T₀** (suspensiones antes de la aplicación del inductor); **carriles 4 y 5, controles** (suspensiones después de 24 h); **carriles 6 y 7, PDB**, suspensiones expuestas 24 h a medio PDB (3 mg/mL); **carriles 1a-c; 2a-c y 3a-3c**, cultivos expuestos a filtrados en equivalentes a 0.1, 0.5 y 1.0 mg equivalentes de proteína del filtrado. La separación se realizó con una mezcla de 8:1:1 de n-butanol: agua: hidróxido de amonio.

3.2.1 Suspensiones celulares de *A. mexicana* inducidas con homogenizados de micelio.

Los cultivos inducidos tenían ocho días de haber sido sembrados y fueron expuestos por 24 h a dosis de 1.0 2.0 y 3.0 mg equivalentes de proteína de los homogenizados de micelio de las cuatro especies de hongos seleccionadas. Aunque con las cuatro especies se observaron bandas ligeras, solamente se pudieron cuantificar de manera consistente en algunos de los tratamientos expuestos a *F. solani*, *C. cassiicola* y *L. theobromae* (Figs. 3.13 y 3.14).

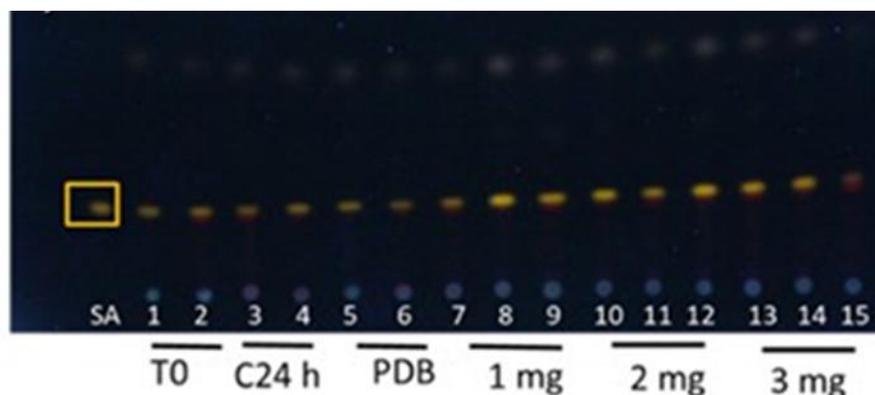


Figura 3.13. Detección de sanguinarina (SA) en suspensiones de *A. mexicana* inducidas con homogenizados de micelio de *C. cladosporioides*, T₀ (antes de la aplicación del inductor); **carriles 3 y 4**, controles (suspensiones después las 24 h, sin tratamiento; **carriles 5 y 6**, suspensiones expuestas por 24 h a medio PDB (3 mg/mL) cultivo; **carriles 7- 9; 10 -12 y 13- 15**, suspensiones 4expuestas a 1, 2 y 3 mg de proteína de los diferentes hongos. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema ciclohexano: etanol (94:6) para la visualización de sanguinarina. El recuadro en la figura muestra al estándar de Sanguinarina.

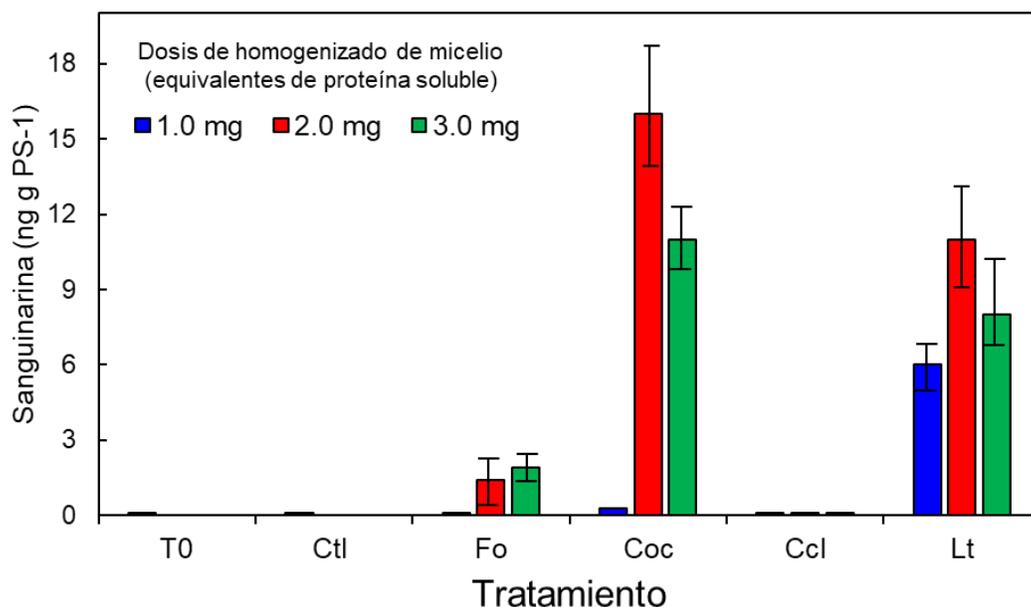


Figura 3.14. Contenido de sanguinarina en suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a homogenizados de *F. solani* (**Fo**); *C. cassicola* (**Coc**); *C. cladosporioides* (**Ccl**) y *L. theobromae* (**Lt**). T₀ corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con PDB por 24 h. Promedio de triplicados con la desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestos a PDB).

Si bien se observa que las suspensiones no acumulaban sanguinarina y que los tratamientos con homogenizados de *F. solani*, *C. cassiicola* y *L. theobromae* indujeron la acumulación de este alcaloide (Figs. 3.13 y 3.14), las cantidades registradas fueron muy bajas ya que estuvieron cerca de los límites inferiores de cuantificación del método y en orden de magnitud menor que las registradas en la misma línea celular en años previos, si bien la respuesta fue limitada, se debe destacar que activó la síntesis de sanguinarina de manera consistente, principalmente en los tratamientos con homogenizados de *C. cassiicola* (Fig 3.14). Es posible que las condiciones de los tratamientos (dosis y/o tiempos ensayados) no sean suficientes para desencadenar una respuesta de mayor amplitud, o bien, que las preparaciones no presenten todos los elementos que inducen una activación de la síntesis de alcaloides. Por otro lado, se puede observar la presencia de otros alcaloides, uno representado por una banda color amarillo claro, fue identificado como dihidrosanguinarina. Aunque esta banda se observó al realizar las inducciones con las cuatro especies, fue más evidente en las inducciones con *F. solani* y menor con *C. cassiicola* (Fig. 3.13).

3.2.2 Suspensiones celulares de *A. mexicana* Inducidas con filtrados libres de células.

Las suspensiones celulares expuestas a los filtrados de cultivos de *F. solani*, *C. cassiicola*, *C. cladosporioides* y *L. theobromae* (dosis de 0.1, 0.5 y 1.0 mg equivalentes de proteína) también fueron analizadas por CCF. Solamente se observaron de manera muy tenue las bandas de autofluorescencia correspondientes a la sanguinarina en los tratamientos con *C. cassiicola* (Fig. 3.15).

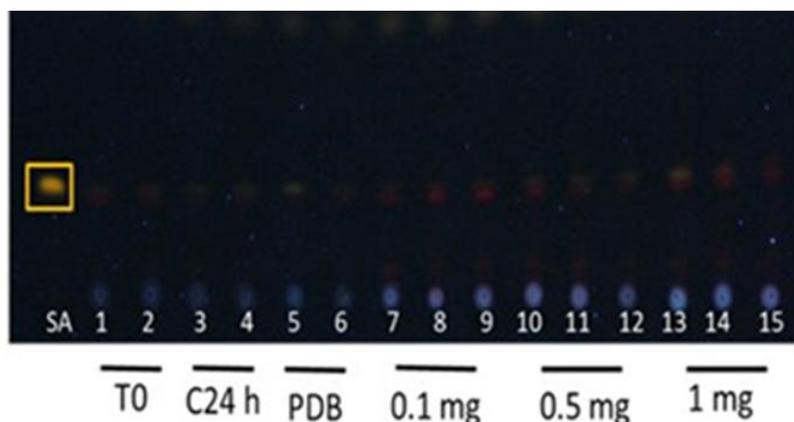


Figura 3.15. Detección de sanguinarina (SA) en suspensiones de *A. mexicana* inducidas con filtrados libres de células de cultivos de *C. cladosporioides*, T₀ (antes de la aplicación del inductor); **carriles 3 y 4**, controles (suspensiones después las 24 h, sin tratamiento; **carriles 5 y 6**, suspensiones expuestas por 24 h a medio PDB (3 mg/mL) cultivo; **carriles 7- 9; 10 -12 y 13- 15**, suspensiones expuestas a 0.1, 0.5 y 1.0 mg de proteína. Perfil cromatográfico obtenido con el sistema ciclohexano: etanol (94:6) para la visualización de sanguinarina.

Si bien visualmente las señales de sanguinarina fueron muy débiles para ser observadas de manera clara (Fig. 3.15), las lecturas densitométricas fueron consistentes para los extractos obtenidos de las suspensiones expuestas a *C. cassiicola* y se mantuvieron por sobre el valor del límite de cuantificación del método lo que permitió su lectura para estimar los contenidos (Fig, 3.16). Aunque se observó un efecto dependiendo de la dosis, los valores fueron en el orden de ng por mg PS lo cual representa una respuesta muy marginal.

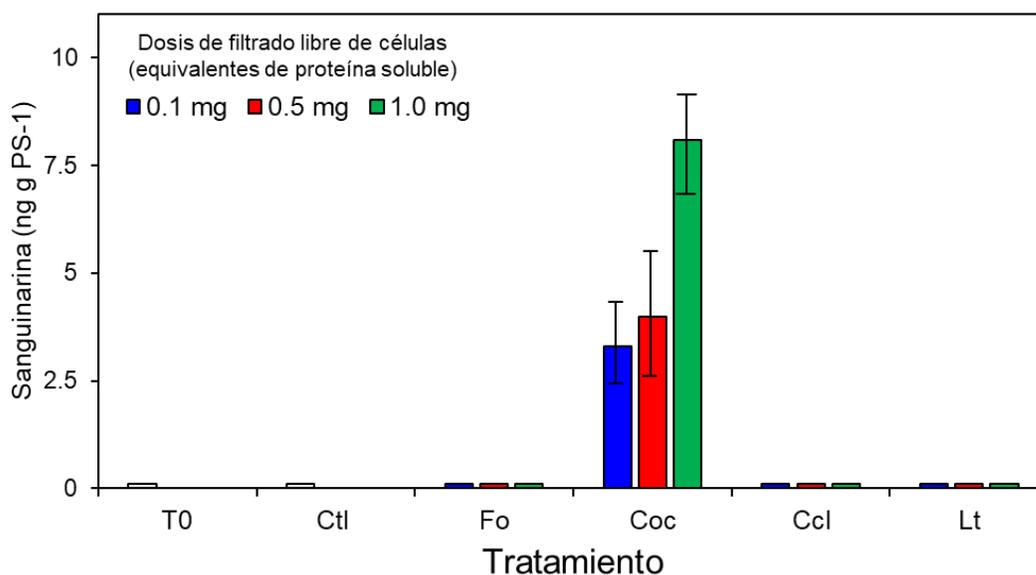


Figura 3.16. Contenido de sanguinarina en suspensiones de *A. mexicana* expuestas por 24 h a filtrados libres de células de *F. solani* (Fo); *C. cassiicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). T0 corresponde a los valores iniciales, antes de los tratamientos y Ctl a los valores de los cultivos no expuestos y de los tratados con PDB por 24 h. Promedio de triplicados con la desviación estándar excepto Ctl que corresponde a seis muestras (tres sin tratamiento y tres expuestos a PDB).

3.3 Análisis de respuesta de la síntesis de alcaloides en suspensiones de *A. mexicana* L a las preparaciones de hongos (filtrados y homogenizados).

De los tratamientos implementados, la aplicación de las preparaciones (filtrados) de *C. cladosporioides*, mostró de manera consistente la inducción de la síntesis de sanguinarina (Fig. 3.14 y 3.16). Si bien en ambos casos, particularmente con los filtrados, las cantidades de sanguinarina que se acumularon como respuesta a la inducción fueron muy limitadas, la respuesta es de llamar la atención ya que se observó de manera consistente y representó la activación de un proceso que se mantenía silenciado antes de la aplicación del estímulo. Más aún, de las especies de hongos ensayadas, solamente *C. cassiicola* es capaz de infectar hojas sanas de esta especie e inducir la síntesis de sanguinarina en hojas que, normalmente, no acumulan este alcaloide (Hernández-Eleria et al., 2025) sugiriendo que al menos algunos los componentes capaces de incitar la síntesis de este alcaloide se encuentran presentes en las preparaciones, pero que las condiciones de aplicación no fueron las adecuadas o bien, que las suspensiones celulares carecen de algunos elementos necesarios para reproducir la respuesta observada en hojas (Monforte-González et al., 2019). No obstante, los experimentos no pudieron repetirse debido a que las células en

suspensión mostraron cambios en su aspecto y patrones de crecimiento que se hicieron muy lentos.

Por ello, y considerando que una de las metas de este proyecto fue el contar con un sistema para identificar los posibles efectores fúngicos que inducen la síntesis de alcaloides en *A. mexicana* se propuso como alternativa usar hojas escindidas y exponerlas a homogenizados de los cultivos de hongos.

3.4 Análisis de la síntesis de alcaloides en hojas escindidas de *A. mexicana* inducidas con homogenizados de micelio.

De los tratamientos aplicados con los homogenizado, se identificaron los alcaloides con muestras estándares de berberina y sanguinarina, los análisis demostraron la presencia de berberina en todos los tratamientos aplicados con cada una de las especies y tiempos con algunas variaciones en la intensidad del color verde. Para Berberina se utilizó el sistema n-butanol: agua: hidróxido de amonio 8:1:1 (v:v:v) y para los perfiles cromatográficos se visualizo bajo luz UV a 365 nm utilizando una lámpara manual (UVP Chromato-Vue C-75 UV Viewing Cabinet), a una longitud de onda de 330 nm. Tomando en cuenta el factor de retención que es de 0.29 y Para sanguinarina el sistema que se utilizo fue una mezcla de ciclohexano: etanol 94:6 (v:v), e igual para los perfiles cromatográficos se visualizo bajo luz UV a 365 nm utilizando una lámpara manual (UVP Chromato-Vue C-75 UV Viewing Cabinet), a una longitud de onda de 330 nm. Tomando en cuenta el factor de retención que es de 0.36

Los tratamientos cuantificados después 48h presentó la mayor acumulación de berberina con la inducción del homogenizado de *F. solani* (0.194 mg/g PS). La inducción con el homogenizado de *C. cassicola* fue el que presento la menor acumulación (0.009mg/g Ps).

Para la cuantificación de la sanguinarina fue poca la detección de ésta, posiblemente la sanguinarina esté relacionada al método de defensa de la planta ante un ataque el cual sea mayor para poder ser expresada, posiblemente existe un transporte desde la raíz a las hojas como un primer método de defensa (Vázquez-Flota *et al.*, 2018). pues solo se pudo detectar con la aplicación del homogenizado con la especie *L. theobromae* con un tiempo de incubación de 72 h.

Retomando que al utilizar los homogenizados como inductores la presencia de la sanguinarina fue casi nula pero la berberina estuvo presente.

3.4.1 Evaluación del crecimiento de las hojas expuestas a los homogenizados de micelio

Para estimar los efectos de la senescencia derivada de la separación de las hojas y su mantenimiento en las cámaras húmedas, se evaluó el peso fresco de las hojas (Fig. 3.17), así como el contenido de clorofila total (Fig. 3.18).

En las condiciones del experimento, no se observaron cambios en la biomasa de las hojas (Fig. 3.17).

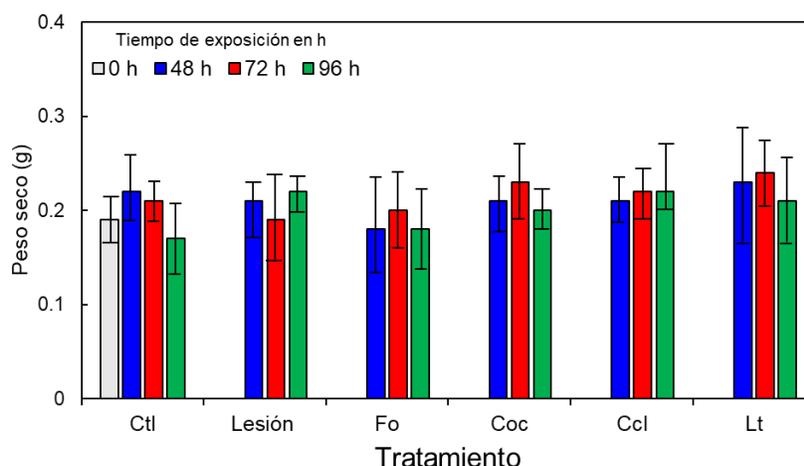


Figura 3.17. Acumulación de peso fresco de las hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (Fo); *C. cassiicola* (Coc); *C. cladosporioides* (Ccl) y *L. theobromae* (Lt). Ctl corresponde a las hojas intactas, mientras que Lesión a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.

3.5 Evaluación del contenido de clorofilas de las hojas expuestas a los homogenizados de micelio

El contenido de clorofilas (Fig. 3.18) disminuyó en función del tiempo, pero esta tendencia no parece relacionada con los tratamientos, ya que fue similar tanto en las hojas expuestas a las preparaciones de micelio y en ambos controles, tanto intactos como a la incisión.

De este modo, la disminución observada en el contenido de clorofila podría asociarse al fenómeno de senescencia ocasionado por la separación de las hojas y no propiamente al daño causado por los tratamientos.

En conjunto, los datos de acumulación de biomasa y contenido de clorofilas, es posible sugerir que los tratamientos aplicados no ocasionan un daños severo a las hojas escindidas, reduciendo la posibilidad de que las respuestas a los tratamientos sean reflejo de una reacción generalizada al estrés.

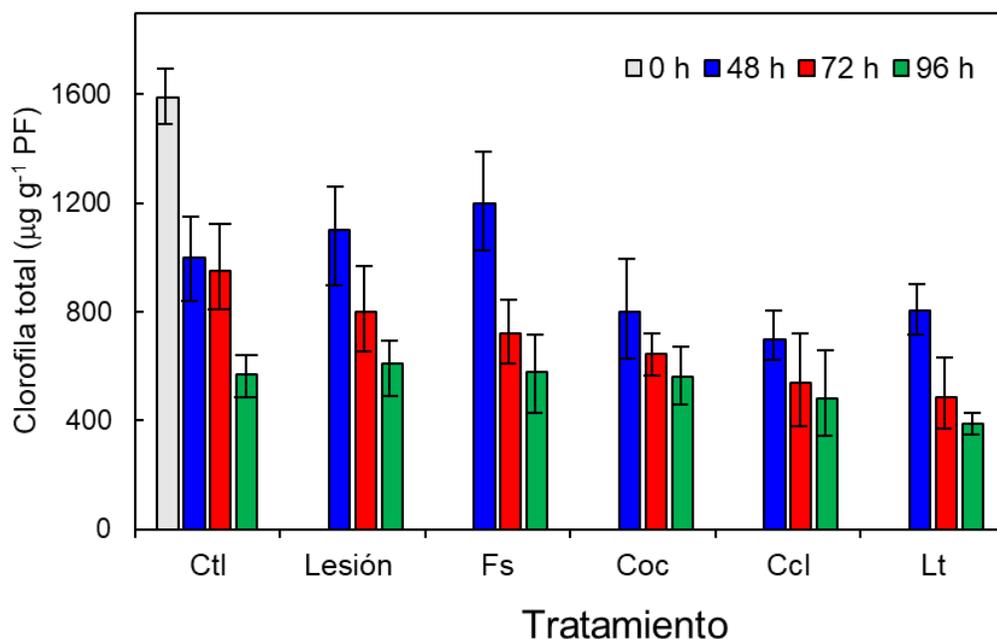


Figura 3.18. Contenido de clorofila en hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (**Fs**); *C. cassiicola* (**Coc**); *C. cladosporioides* (**Ccl**) y *L. theobromae* (**Lt**). **Ctl** corresponde a las hojas intactas, mientras que **Lesión** a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.

3.6 Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) del perfil de alcaloides en hojas de *A. mexicana* L expuestas a homogenizados de micelio

El contenido de alcaloides en las hojas tratadas se evaluó por CCF. En condiciones normales, las hojas de *A. mexicana* acumularon cantidades de berberina entre 0.2 y 0.8 mg g⁻¹ PS (Monforte-González et al., 2019). De este modo, se observó la presencia de berberina en todos los casos. Este alcaloide se detecta como una mancha de coloración verde azulada con R_f de 0.29 (Fig. 3.19). Aunque también se detectó la presencia de otras bandas de alcaloides, la identidad de éstos no se ha podido establecer.

También se analizaron los extractos para la presencia de sanguinarina, utilizando una mezcla de disolventes diferentes para su separación y detección (Fig. 3.19). Aunque este

alcaloide no se acumula en hojas y solamente se detecta en raíces y semillas maduras, ante la infección con hongos es posible detectarlo en cantidades importantes (Hernández-Eleria et al., 2025). Se logró observar de manera muy tenue la presencia de las bandas de auto fluorescencia con Rf 0.29 (berberina) en algunos casos, principalmente en los extractos de las hojas expuestas a *C. cassiicola* (Fig. 3.19).

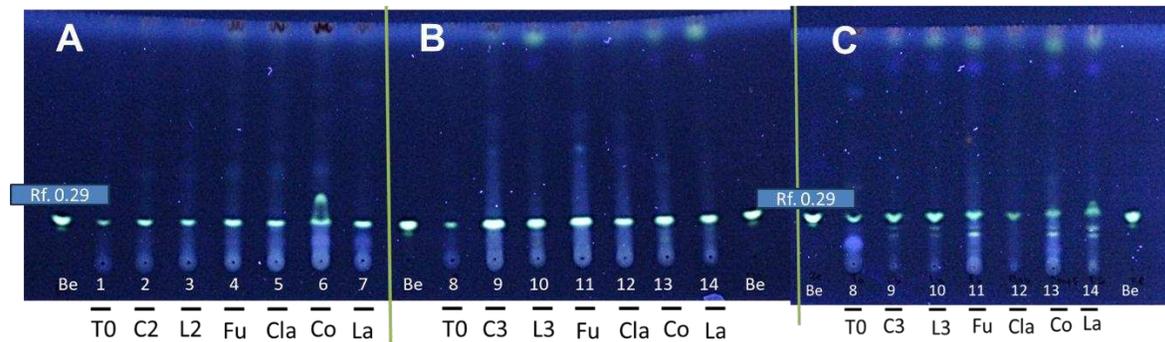


Figura 3.19. Perfil cromatográfico de los extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio; **Be** (estándar); **T0**, hojas recién colectadas; **C**, hojas intactas; **L**, hojas lesionadas; **Fu**; **Cla**, **Co** y **La** corresponden a hojas expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani*, *C. cladosporioides*, *C. cassiicola* y *L. theobromae*, respectivamente; **A**; **B** y **C** muestran placas de hojas tratadas por 48, 72 y 96 h, respectivamente. Los cromatogramas fueron separados con una mezcla de n-butanol: agua: NH_4OH 98:1:1.

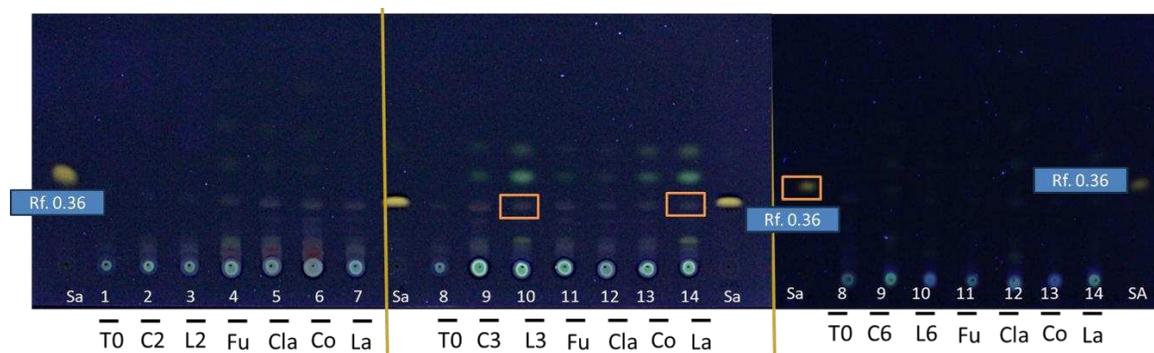


Figura 3.20. Perfil cromatográfico de los extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio; **Sa** (estándar); **T0**, hojas recién colectadas; **C**, hojas intactas; **L**, hojas lesionadas; **Fu**; **Cla**, **Co** y **La** corresponden a hojas expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani*, *C. cladosporioides*, *C. cassiicola* y *L. theobromae*, respectivamente; **A**; **B** y **C** muestran placas de hojas tratadas por 48, 72 y 96 h, respectivamente. Los cromatogramas fueron separados con una mezcla de ciclohexano: etanol (94:6).

3.6.1. Contenido de alcaloides en hojas de *A. mexicana* L expuestas a los homogenizados de micelio.

Aunque en algunos casos se observó un ligero aumento en el contenido de berberina como resultado de la aplicación de los homogenizados de micelio, el rango de los valores detectados se mantuvo entre 70 y 228 mg g⁻¹ PS (Fig. 3.21). Dado que estos valores se encuentran dentro de los límites encontrados en hojas sanas, podrían reflejar la variación esperada en el contenido de alcaloides (Monforte-Gonzalez et al. 2019). Es común que el contenido de metabolitos secundarios, como los alcaloides, presenten rangos relativamente amplios, pero dentro de un mismo orden de magnitud. Esto se ha observado para el contenido de berberina anteriormente (Monforte-González et al. 2019).

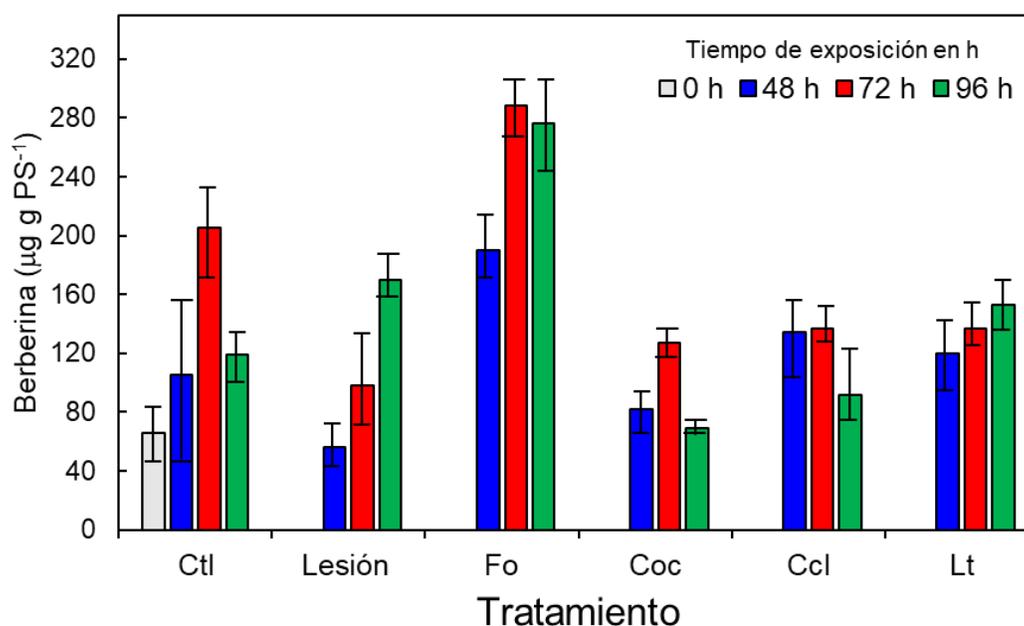


Figura 3.21. Contenido de berberina en las hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (**Fo**); *C. cassiicola* (**Coc**); *C. cladosporioides* (**Ccl**) y *L. theobromae* (**Lt**). **Ctl** corresponde a las hojas intactas, mientras que **Lesión** a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.

En contraste, la sanguinarina no se acumula en las hojas de manera normal. Por ello, es interesante que, en todos los tratamientos, incluido las hojas lesionadas no expuestas a los homogenizados, se haya logrado detectar cantidades cuantificables (Fig. 3.22). Las cantidades de sanguinarina observadas fueron entre 1 y 13 mg g⁻¹ PS que, si bien son dos

órdenes de magnitud menores que las observadas en raíces, que en condiciones normales acumulan alrededor de 1.2 mg g^{-1} PS.

Más aún, la exposición a los homogenizados de *C. cassiicola* fue en donde se observó una diferencia notable respecto a los controles de hojas lesionadas (Fig. 3.22). Esta respuesta parece tener un comportamiento dependiente del tiempo, ya que la mayor acumulación ocurrió a las 48 h del tratamiento y después se redujo aunque siempre se mantuvo por sobre los valores de observados en las hojas lesionadas.

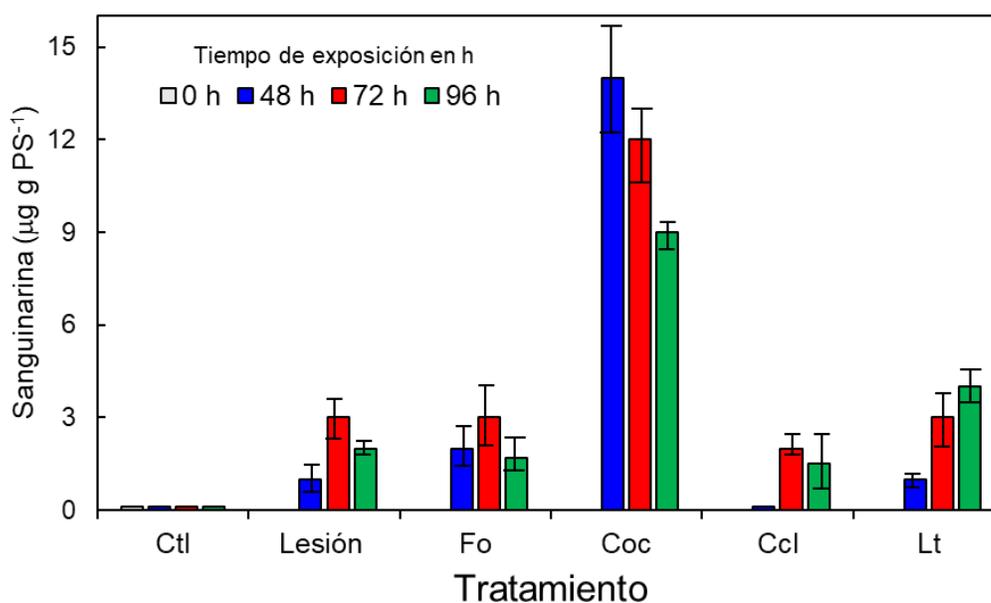


Figura 3.22. Contenido de sanguinarina en las hojas de *A. mexicana* expuestas a homogenizados de micelio de *F. solani* (**Fo**); *C. cassiicola* (**Coc**); *C. cladosporioides* (**Ccl**) y *L. theobromae* (**Lt**). **Ctl** corresponde a las hojas intactas, mientras que **Lesión** a las hojas lesionadas no expuestas a las preparaciones de micelio. Promedio de triplicados con la desviación estándar.

Para confirmar la presencia de sanguinarina en los extractos de hoja, se realizó una nueva CCF, concentrando los extractos, con el fin de enriquecer los contenidos de alcaloides. En estas condiciones las bandas correspondientes a este alcaloide se observaron ligeramente por arriba de las bandas rojas debidas a la presencia de clorofila (Fig. 3.23).

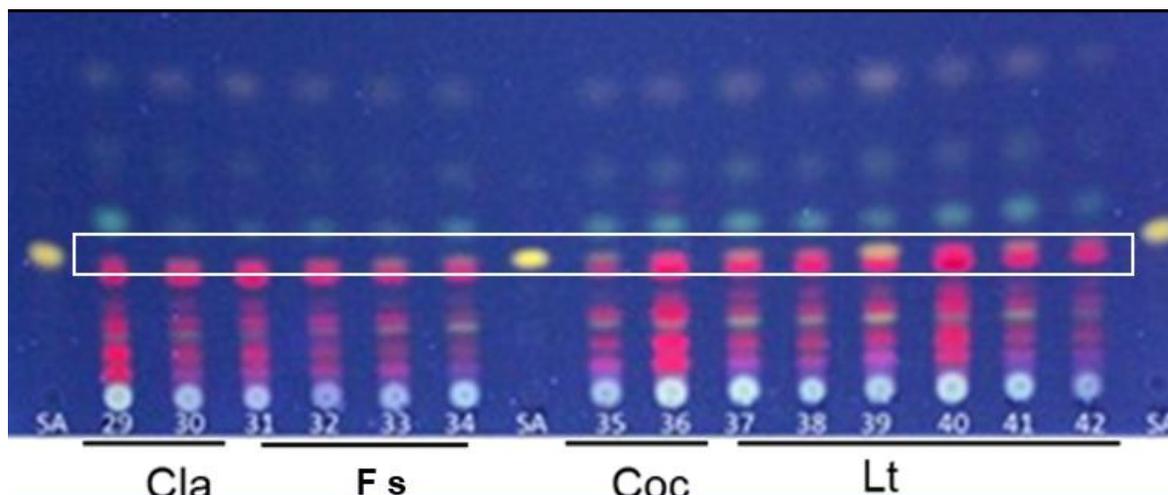


Figura 3. 23. Perfil cromatográfico de los extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio; **SA** (estándar); **cla**, **Fs**, **Co**, y **La** corresponden a extractos de hojas expuestas a homogenizados de micelio de *C. cladosporioides* a *F. solani*, *C. cassicola* y *L. theobromae*, respectivamente; por 72 h. Los cromatogramas fueron separados con una mezcla de ciclohexano: etanol (94:6).

3.6.2 Análisis de la respuesta de las hojas escindidas de *A. mexicana* L a las preparaciones de hongos

Si bien los contenidos de berberina se modificaron en las hojas expuestas a los homogenizados de micelio de los diferentes hongos, particularmente a *F. solani* (Figs. 3.18 y 3.19), los cambios observados parecen más asociados a variaciones en función del tiempo o con la propia variación previamente observadas entre diferentes individuos (Monforte-González et al., 2019).

No obstante, la acumulación de la sanguinarina se observa como una respuesta interesante (Fig. 3.20, 3.22 y 3.23). Aunque la lesión mecánica de las hojas ocasionó que se presentara este alcaloide, normalmente ausente en tejidos aéreos de esta planta, la adición del homogenizado ocasionó que los niveles acumulados se triplicaran y esta respuesta se mantuvo a lo largo del experimento (Fig. 3.22).

Esta respuesta coincide con la registrada en las suspensiones celulares ya que, de las especies de hongos ensayadas, solamente las preparaciones de *C. cladosporioides*, mostraron la inducción consistente de la síntesis de sanguinarina (Fig. 3.14 y 3.16). No obstante, las cantidades totales que se detectaron fueron notoriamente menores que las

observadas en hojas infectadas con el hongo, tanto unidas a la planta o escindidas, ya que en ambos casos alcanzaron rangos entre 0.2 y 0.3 mg g⁻¹ PS (Hernández-Eleria et al., 2025), mientras que las aplicaciones de los homogenizados solamente alcanzaron valores del orden de 20 mg g⁻¹ PS. Es importante señalar que la mayor acumulación de sanguinarina en *A. mexicana* ocurre en las raíces maduras en las que puede alcanzar valores de entre 1.0 y 1.5 mg g⁻¹ PS (Monforte-González et al., 2019; Vázquez-Flota et al., 2018).

Es de resaltar que el daño mecánico por sí solo indujo la síntesis de sanguinarina en las hojas. Más, las cantidades de sanguinarina que se acumularon fueron en términos generales limitadas, es importante señalar que solamente se pudo observar un aumento consistente por sobre los valores del daño mecánico en las hojas expuestas a las preparaciones de micelio de *C. cassicola*. Esto se debe resaltar ya que coincide con lo observado en hojas infectadas de manera controlada con diferentes hongos en donde solamente *C. cassicola* condujo a la acumulación de este alcaloide (Hernández-Eleria et al. 2025) y en las suspensiones celulares expuestas tanto a los homogenizados de micelio y filtrados libres células (Fig. 3.14 y 3.16).

De este modo, aunque las cantidades de sanguinarina acumuladas en hojas escindidas expuestas a homogenizados de micelio son menores que las hojas inducidas, los resultados sugieren que éstos pueden contener los efectores involucrados en la respuesta y que, por lo tanto, se debe considerar la posibilidad de modificar las condiciones de preparación del homogenizado y de su aplicación.

CAPÍTULO IV

4. DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

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 AMME que se caracterizaba por presentar únicamente sanguinarina en concentraciones altas y la ausencia de berberina (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

A. mexicana se caracteriza por sintetizar tanto sanguinarina como berberina simultáneamente, durante la aplicación de inductores (filtrados y homogenizados) se pudo observar que, para las células en suspensión estos dos alcaloides mostraron tendencias opuestas, los niveles de berberina nunca estuvieron presentes pero la sanguinarina la pudimos encontrar en cantidades muy pequeñas. 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 sanguinarina (Guizar-González *et al.*, 2016; Trujillo-Villanueva *et al.*, 2010).

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 realizar otro experimento utilizando el empleo de hojas.

Como el enfoque de este trabajo fue evaluar cambios inducidos en la acumulación de alcaloides como parte de una respuesta de defensa, ya que esta fue corroborada con la cuantificación del contenido de sanguinarina en las muestras analizadas. Figura 4.1 para los filtrados y 4.2 para homogenizados.



Figura 4.1 acumulación de sanguinarina en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* aplicando filtrados con una dosis de 3 mg de contenido de proteína.

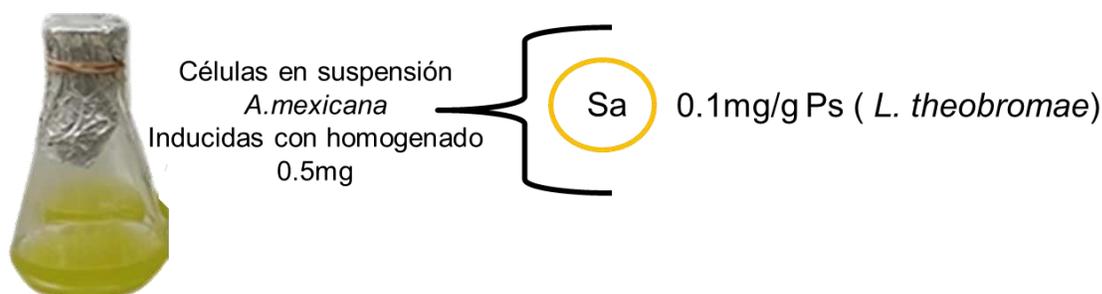


Figura 4.2 acumulación de sanguinarina en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* inducidos con homogenizados con una dosis de 0.5 mg de contenido de proteína.

Desafortunadamente, los experimentos no pudieron repetirse ni se pudieron ensayar otras condiciones ya que no se logró la generación de suficiente biomasa de las suspensiones celulares debido a las alteraciones de los patrones de crecimiento ya mencionadas para la línea celular.

La alternativa propuesta fue usar hojas escindidas y exponerlas a diferentes tratamientos con homogenizados de micelio (Capítulo III, sección 3.2). Es importante mencionar que el contenido de metabolitos secundarios puede aumentar después de la herbivoría, el daño mecánico y la interacción con microorganismos 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 otros metabolitos como uliginosina B (De Matos *et al.*, 2014) entre otros (Kessler y Baldwin,

Con los datos reportados previamente sobre el análisis de la distribución de los alcaloides Be y Sa en cultivos *in vitro* de *A. mexicana* de los experimentos previos; inducción de células en suspensión con homogenados y filtrados y hojas escindidas e inducidas únicamente con homogenados de hongos. recalando que para cada inducción los homogenados y filtrados fueron estandarizadas las dosis con respecto al contenido de proteína.

En el análisis realizado en este estudio de las células en suspensión inducidas con los filtrados no se logro una gran acumulación de la sanguinarina, el único filtrado que dio una acumulación de este alcaloide fue el filtrado de la especie *C. cassicola*, la cual es una especie de hongo con una variedad de diferentes estilos de vida, incluyendo endófitos, saprofitos y patógenos necro tróficos. Lo cual le da una característica de ser un inductor primario al ser utilizado como inductor (filtrado) recordando que el filtrado es el medio en el cual el hogo creció y esto fue lo que utilizamos como inductor en las células en suspensión. sabiendo que la acumulación de Sa, probablemente al ser el inductor en el caso de este filtrado, que atacan directamente a las células, es por ello, que requiere la acumulación de Sa como un efecto protector de *A. mexicana*. Las otras tres especies de filtrado no causaron ningún síntoma de ataque el cual induzca a una reacción de defensa para sintetizar la sanguinarina, cabe recalcar que también depende de las dosis aplicadas y del tiempo en el cual fueron expuestos. Por lo que seria bueno evaluar otras dosis y otros tiempos y evaluar la acumulación de la sanguinarina.

Para los análisis de la aplicación de inductores homogenados en las células en suspensión con las 4 especies de homogenados, pudimos observar que la acumulación de sanguinarina fue mayor con respecto a la aplicación de los filtrados esto se debería a que los (homogenados) tienen la presencia de una mezcla de las células del hongo junto con su medio de cultivo. En este caso las células en suspensión presentaron una mayor ataque celular por lo que esto indujo a una mejor acumulación de Sa, pues este alcaloide se sintetiza al tener un síntoma de ataque. En este caso la especie de (homogeneizado) que indujo una mayor acumulación de Sa fue *L. theobromae*, de igual manera la acumulación de sanguinarina en este caso dependería de un tiempo mayor de exposición, puesto que todas las dosis que se aplicaron indujeron a la acumulación de Sa, y que la exposición con un tiempo mayor a 24 h podría inducir a una mayor acumulación.

Tomando en cuenta que ya se conoce cuales especies de homogenados y filtrados inducen a una mayor acumulación de Sa, estas especies, podrían ser evaluadas aplicando ciertas dosis específicas y ser evaluados en ciertos tiempos específicamente para las especies (*L. theobromae* y *C. cassicola*).

Para las hojas inducidas únicamente con homogenados de las 4 especies de hongos en hojas escindidas de *A. mexicana*, si bien se ha encontrado que las hojas son capaces de acumular en grandes cantidades Sa donde ocurre un transporte de Sa desde la raíz a las hojas (Vázquez-Flota et al., 2018) .y 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 las hojas escindidas e intactas los niveles de acumulación fueron más bajos de Be mientras que la las hojas inducidas presentaba niveles más altos. Por lo tanto, cuando la Be se encuentra en niveles más altos, la Sa se encuentra en niveles bajos, y esto probablemente está relacionado con el nivel de toxicidad, como un método de defensa ante el ataque patogénico, pues la berberina es un alcaloide con menor toxicidad. Y por lo tanto no está ocurriendo algún daño que induzca a una mayor acumulación de Sa.

4.1.2. Discusión del análisis de alcaloides en hojas escindidas de *A. mexicana*.

Se desarrolló un sistema experimental incubando hojas escindidas en contenedores de PET (Fig. 3.19 y 3.20) y se analizaron los contenidos de berberina y sanguinarina (Fig. 3.22 - 3.23). Aunque se observaron cambios en los contenidos de berberina, estos ocurrieron dentro de la variación esperada para las hojas ya que los valores normalmente detectados oscilan entre 70 y 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS (Fig. 3.24; Monforte-González et al. 2019). No obstante, en concordancia con los observado en hojas de plantas infectadas de manera controlada, se detectó la acumulación de sanguinarina en las hojas expuestas a los homogenizados de micelio de *C. cassicola* (Fig. 3.25). Es interesante notar que el daño mecánico infligido a las hojas antes de la aplicación de la preparación de micelio resultó en una ligera acumulación de sanguinarina y que con los demás hongos ensayados se pudo detectar una respuesta de una magnitud similar (Fig. 3.25). Esta respuesta coincide con la de las suspensiones celulares (Fig. 3.14 y 3.16).

Para el análisis del tratamiento aplicado a hojas escindidas de *A. mexicana*, inducidas con el tratamiento de homogenizados se observó la presencia de berberina presente en el en todos los tratamientos aplicados, de igual manera la acumulación dependía del tiempo de exposición a los homogenizados y a la especie de homogenizado. Puesto que en plantas adultas Be se distribuye tanto en las raíces y tejidos aéreos. Por otra parte, la acumulación de sanguinarina también depende del tiempo de incubación y de la especie de homogenizado ya que sanguinarinasolamente puede ser detectada en las partes aéreas de plantas en desarrollo y en las plantas maduras se restringe a las raíces y las semillas (Hernández., 2022).

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 sanguinarina 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).

Dado que la berberina se acumula en las hojas, y la sanguinarina comparten las primeras reacciones biosintéticas, su similitud estructural y que algunas enzimas pueden utilizar sustratos relacionados estructuralmente, sobre un mecanismo en el que enzimas de la ruta de la berberina puedan presentar un tipo de flexibilidad catalítica para aceptar dar lugar a los intermediarios de la síntesis de sanguinarina (Xool- Tamayo *et al.*, 2017; Hagel y Facchini 2013). De esta manera, la exposición de hojas escindidas a los homogenizados de micelio de *C. cassicola* representa un sistema potencial para el estudio del posible papel de los alcaloides en la interacción Argemone-hongos.

4.2 Conclusiones

Si bien las magnitudes de las respuestas, tanto en suspensiones como hojas fueron marcadamente menores que las de hojas infectadas con el hongo, tanto unidas a la planta o escindidas (de 200 a 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ PS; Hernández-Eleria *et al.* 2025), se debe resaltar la concordancia de la reacción de *A. mexicana* a esta especie de hongo en cuanto a la acumulación de sanguinaria en las hojas, ya que este alcaloide no se acumula normalmente en este tejido (Monforte-González *et al.* 2019; Rubio- Piña y Vázquez-Flota,

2013; Vázquez-Flota *et al.* 2018). Esto parece sugerir que este alcaloide tiene un papel en respuesta a los daños ocasionados por los organismos patógenos. La sanguinarina 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 con fines de defensa (Virsen *et al.*, 2019; Rubio-Piña y Vázquez-Flota *et al.*, 2013; Brahmachari *et al.*, 2013). La respuesta observada en las hojas fue localizada, ya que se ocurrió en hojas separadas de las plantas. Por ello, se propone que la acumulación de sanguinarina fue resultado de la activación de su síntesis en el mismo tejido.

La meta principal de este trabajo fue utilizar preparaciones elaboradas de cultivos de estos hongos como inductores en tejidos *A. mexicana* con el fin de contar con un sistema experimental adecuado para estudiar el posible papel de los alcaloides en la interacción planta-hongos. Esta propuesta se basa en la hipótesis de trabajo que las células y tejidos íntegros de *A. mexicana* expuestos a preparaciones de hongos aislados de la propia planta inducen la síntesis de alcaloides y que esta respuesta es más apegada a lo que sucede en el entorno natural de la planta que el uso de inductores genéricos del metabolismo secundario. El objetivo del trabajo se centró en el análisis del cambio de los patrones de acumulación de alcaloides en tejidos de *Argemone mexicana* en condiciones de inducción con preparaciones acelulares de hongos aislados de la misma planta.

El objetivo se cumplió satisfactoriamente ya que se ensayaron dos modelos experimentales; células en suspensión y hojas escindidas y en ambos se observó la acumulación de sanguinarina en los tratamientos con inductores preparados a partir de cultivos de *C. cassiicola*. Esto coincidió lo que sucede en hojas infectadas de manera espontánea, así como en infecciones controladas con *C. cassiicola* (Hernández-Eleria *et al.* 2025). De este modo, es posible concluir que las preparaciones elaboradas *C. cassiicola* son las únicas entre las ensayadas que podrían emplearse como inductor de la síntesis de sanguinarina en tejidos de *A. mexicana*.

Como consecuencia de lo anterior, es posible proponer que los inductores preparados a partir de los cultivos de este hongo contienen los elementos que activan la síntesis del alcaloide, lográndose de esta manera demostrar la hipótesis de trabajo. No obstante, las magnitudes de las respuestas observadas fueron sustancialmente menores que las registradas en hojas expuestas al proceso de infección, por lo que aún no es conveniente

utilizar este sistema para el estudio del papel de los alcaloides en la interacción *Argemone-C. cassicola* y se deben optimizar las condiciones del sistema.

4.3 Perspectivas

Las perspectivas que este trabajo ofrece se relacionan con el contar con un sistema experimental controlado, en este caso los cultivos *in vitro* ya que este sistema ofrece la posibilidad de establecer un sistema controlado que permita la inducción con inductores fúngicos específicos para analizar la respuesta de los alcaloides berberina y sanguinarina en *A. mexicana* pero que aún se debe trabajar en la optimización del sistema, ya sea *in vitro* o en hojas separadas de la planta y conveniente para descubrir los componentes de la interacción de *A. mexicana* con un microorganismo patógeno como *C. cassicola* y sus posibles estrategias de defensa. El uso de homogenizados en lugar de microorganismos vivos para inducir la respuesta deseada representa muchas ventajas ya que no solo evita la manipulación requerida y medidas de bioseguridad necesarias para los agentes patogénicos, sino que permitiría obtener respuestas más rápidas y específicas. No obstante, dado la leve respuesta obtenida, es necesario optimizar las condiciones del modelo.

Por ello, se propone recuperar las líneas celulares en suspensión de *A. mexicana*. Los cultivos *in vitro* presentan muchas ventajas para este tipo de estudios ya que son de rápido crecimiento, ocupan poco espacio y se mantienen libres de microorganismos. De recuperar los niveles originales de acumulación de sanguinarina (entre 0.1 y 0.8 mg g⁻¹ PS; Guizar-González et al., 2016), la reacción a los inductores sería fácilmente detectable permitiría su utilización en estudios sobre los eventos bioquímicos de señalización, de percepción del estímulo, así como la identificación de los genes involucrados en la activación de la síntesis de alcaloides.

Por otro lado, es necesario continuar los estudios de inducción en hojas aumentando las dosis y tiempos de exposición a las preparaciones. Este modelo mostró elementos de respuesta similares a la exposición a los hongos infectivos y mantiene la integridad tisular permitiendo complementar las respuestas celulares con las que requieren la participación multicelular.

Finalmente, es necesario aumentar el potencial inductor de las preparaciones. Esto podría estudiarse elaborando los homogenizados con técnicas diferentes al autoclaveo,

como la sonicación o la exposición de los cultivos de hongos a radiación UV, hipoclorito o peróxido de hidrógeno. Estos agentes eliminarían la viabilidad de los hongos, pero mantendrían los componentes efectores termolábiles.

También se proponen futuros estudios para identificar los elementos de las células fúngicas involucrados en la reacción de la planta. El fraccionamiento químico de tanto los homogenizados como los filtrados de cultivos de *C. cassicola* podría enriquecer la concentración de los componentes responsables de la respuesta llevando así no solo al incremento de su potencial inductor, sino a la identificación de estos.

De este modo, si bien el uso de las preparaciones de *C. cassicola* resultó en una respuesta limitada respecto a la acumulación de sanguinarina en los tejidos de *A. mexicana*, que tanto los filtrados como los homogenizados la hubieran disparado en cultivos en suspensión sugiere que las células vegetales presentan los elementos de respuesta y que los efectores están presentes en ambas preparaciones permitiendo proponer continuar los estudios en este sistema. Más aún, en las hojas aisladas también se reprodujeron cualitativamente las respuestas observadas en infecciones reales lo que permite su uso como un sistema alternativo más seguro al manejo de las cepas infectivas, si bien necesita mayor investigación para su optimización.

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.

En el presente trabajo se lograron observar otros presuntos alcaloides los cuales se observaron en una mayor presencia al aplicar el sistema de sanguinarina; ciclohexano; etanol (94:6). específicamente con los resultados obtenidos de los tratamientos inducidos con los homogenizados a hojas de *A. mexicana*, siendo así un primer acercamiento de la regulación de la biosíntesis de los alcaloides presentes en *A. mexicana*, utilizando como inductores homogenizados de hongos, aislados de la propia planta. por lo que se propone el indagar más sobre el mecanismo de transporte en los tejidos de *A. mexicana* en

condiciones de inducción con los homogenizados. Puede resultar muy interesante el analizar los cambios que ocurren a nivel molecular frente a la simulación de un ataque patogénico.

BIBLIOGRAFÍA

- Brahmachari, G., Gorai, D., & Roy, R. (2013). Argemone mexicana: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 559-567.
- Booth, C. (1972). The Genus Fusarium. *Taxon*, 21(1), 180. <https://doi.org/10.2307/1219251>
- Browning, J. A. (1980). Genetic protective mechanisms of plant-pathogen populations: their coevolution and use in breeding for resistance [to fungal pathogens]. *MP Texas Agricultural Experiment Station*.
- Cai, W., Lengaigne, M., Borlace, S., Collins, M., Cowan, T., McPhaden, M. J., ... & Widlansky, M. J. (2012). More extreme swings of the South Pacific convergence zone due to greenhouse warming. *Nature*, 488(7411), 365-369.
- Calva, M. Á. G., Pacheco, E. D. G., & Espinoza, A. E. E. (2019). Flora apícola de la zona estepa espinosa Montano Bajo, en la Estación Experimental Tunshi, Riobamba, Ecuador. *Dominio de las Ciencias*, 5(2), 71-93.
- Darvill, A. G., Albersheim, P., McNeil, M., Lau, J. M., York, W. S., Stevenson, T. T., ... & Davis, K. (1985). Structure and function of plant cell wall polysaccharides. *Journal of Cell Science (Supplement_2)*, 203-217. De Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures,
- Dey, N. R., Das, K. C. & Rai, Y. 2008. *Argemone mexicana*. A multicentric double blind Homoeopathic Pathogenetic Trial (Drug Proving) carried out by CCRH. *Indian Journal of Research in Homoeopathy*. 2(1): 13-18.
- De Wit, C. C., & Lischinsky, P. (1997). Adaptive friction compensation with partially known dynamic friction model. *International Journal of adaptive control and signal processing*, 11(1), 65-80.
- Durán, A. M., & Piñón, J. G. F. (2009). Mortalidad en ingresos a diálisis peritoneal. Estudio comparativo de la modalidad continua ambulatoria y automatizada. *Revista de la Facultad Medicina UNAM*, 52(5), 0-0.
- 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.
- Fan, X., Strauss, M. A., Schneider, D. P., Becker, R. H., White, R. L., Haiman, Z & York, D. G. (2003). A Survey of $z > 5.7$ Quasars in the Sloan Digital Sky Survey. II.

- Discovery of Three Additional Quasars at $z > 6$. *The Astronomical Journal*, 125(4), 1649.
- Fu, W., Tian, G., Pei, Q., Ge, X., & Tian, P. (2017). Evaluation of berberine as a natural compound to inhibit peach brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *Crop Protection*, 91, 20-26.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 275-296.
- Granados Montero, M. D. M. (2018). Identificación morfológica de hongos fitopatógenos: taller básico.
- Gallo, A. G., de la Torre, W. W., & Rodríguez, V. M. (2008). Especies vegetales consideradas invasoras de hábitats, en la Historia Natural de Canarias. *Mediterranean Botany*, 29, 49.
- García-Sánchez, C. A., Sánchez-González, A., & Villaseñor, J. L. (2014). La familia asteraceae en el parque nacional los mármoles, hidalgo, México. *Acta botánica mexicana*, (106), 97-116.
- González Esquinca, A. R., & Castro Moreno, M. (2008). Papel ecológico de los metabolitos secundarios.
- Herrera and Ulloa, 1990 T. Herrera, M. Ulloa El Reino de los Hongos, micología básica y aplicada, UNAM-Fondo de Cultura Económica, México, D. F. (1990), p. 552
Google Scholar
- Heath, MC. 2000a. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:315-319.
- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Keen, N. 1992. The molecular biology of disease resistance. *Plant Molecular Biology*. 19:109-122.
- Lovkova, M. Y., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M., & Kliment'eva, N. I. (2001). Chemical features of medicinal plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37(3), 229-237.
- Madriz Ordeñana, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno.
- Masliyah, J. H., & Bhattacharjee, S. (2006). *Electrokinetic and colloid transport*

- phenomena*. John Wiley & Sons. Naturalista
- Osho, A., Adetunji, T., Fayemi, S. O., & Moronkola, D. P. (2010). Antimicrobial activity of essential oils of *Physalis angulata* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 7(4).
- Preisser, E. L., Orrock, J. L., & Schmitz, O. J. (2007). Predator hunting mode and habitat domain alter nonconsumptive effects in predator-prey interactions. *Ecology*, 88(11), 2744-2751.
- Ramachandra Rao, S., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. (2002). Biotransformation of Digitoxin in Cell Cultures of *Capsicum frutescens* in the Presence of β -cyclodextrin. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(2), 137-143.
- Sabater-Jara, A. B., Souliman-Youssef, S., Novo-Uzal, E., Almagro, L., Belchí-Navarro, S., & Pedreño, M. A. (2013). Biotechnological approaches to enhance the biosynthesis of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 191-205.
- Singh, P., & Dwivedi, P. (2018). Integration of new evolutionary approach with artificial neural network for solving short term load forecast problem. *Applied energy*, 217, 537-549.
- Hiscox, J. D., & Israelstam, G. F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian journal of botany*, 57(12), 1332-1334.