

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Ingeniería en Biotecnología

“Efecto del estrés por elicitación con oligosacáridos de pared celular de *Fusarium spp.* sobre la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática en callos de *Azadirachta indica*”

Tesis

Para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología

Presenta:

Armando Noriega Feria

Asesora de tesis:

Dra. Jacqueline Capataz Tafur

Co-Asesora de tesis

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

San Juan Bautista, Tuxtepec. 2016

A mi madre y mi padre.

AGRADECIMIENTOS

Todo lo que soy, tengo y he logrado se lo debo a mis padres, ellos me han formado, apoyado, aconsejado y contradicho para lograr que sea una persona de provecho y a ellos más que nadie les estoy agradecido por formar una parte importante de mi formación y de mi vida. **Mi madre**, por siempre ser la razón por la que hago todo, por no dejarme tambalear y estar siempre a mi lado. **Mi padre** que me hace sentir amado y soportado a pesar de estar lejos. **Mis hermanos** que nunca me han dejado solo, mis compañeros de aventuras, mis gemelos. Todos ellos son un motivo para esforzarse y querer volver a casa pronto.

También un agradecimiento enorme, sincero y necesario es el que le debo a mis asesoras. La doctora **Jacqueline Capataz Tafur** que aun conociéndome me aceptó, me enseñó y guio con una paciencia casi materna, la doctora **Ariana Arlene Huerta Heredia** que siempre tuvo para mí una sonrisa y un comentario para hacerme mejorar.

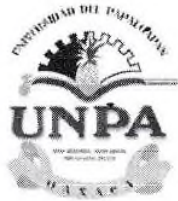
Y a todos los que pusieron de su parte durante el transcurso de estos años. Mi novia **Raquel Anahi Escobar Chaparro** me ha impulsado, y siendo más certeros, ha tirado de mí para alcanzar cosas mejores. Mis amigos **Juan Ramón Gonzales Vergara**, **Laura Isabel Méndez Sánchez**, **Javier Santamaría Alcántara** que con su apoyo, sus palabras, su compañía y su ayuda han hecho de este un grandioso camino recorrido.

No alcanzan las palabras ni el espacio para agradecer a todas las personas que debiera, fueron muchos los que dejaron una parte de sí mismos impresa en mí y forman lo que soy.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, bajo la asesoría de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur y de la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia.

La investigación fue realizada con el financiamiento proyecto de Ciencia Básica del CONACyT CB 2012-01 N° 183958: Estudio de la respuesta bioquímica y molecular de *Azadirachta indica* A. Juss a factores bióticos y abióticos en la producción de limonoides, y se contó con la beca de tesis del mismo proyecto asignada con Número de becario 22132.





UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Oficio No. JCIB/150/16

Tuxtepec, Oaxaca a 22 de Septiembre del 2016.

Lic. Yessenia Barrientos Arenal

Jefa de Servicios Escolares

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la **impresión** del trabajo de tesis del alumno **Armando Noriega Feria** titulado **"Efecto del estrés por elicitación con oligosacáridos de pared celular de *Fusarium spp.* en la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática en callos de *Azadirachta indica*".** Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

Sin mas por el momento le envió un cordial saludo.

Atentamente
terra uberrima, meus apertis
B'ou Lo-tama, ch'ijju



Dra. Ana Karin Navarro Martínez
Jefe de Carrera de
Ingeniería en Biotecnología

c.c.p. M.C. Héctor López Arjona, Vice-Rector Académico, Para su conocimiento.
c.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Asesor de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Armando Noriega Feria, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

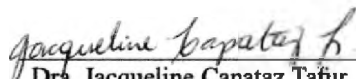
En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 12 de Septiembre del 2016 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Efecto del estrés por elicitación con oligosacáridos de pared celular de *Fusarium spp.* en la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática en callos de *Azadirachta indica*** presentado por el alumno **Armando Noriega Feria**, con número de matrícula **10090018**, aspirante al grado de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron QUE LA TESIS **SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES, OTORGANDO SU APROBACIÓN PARA QUE EL ASPIRANTE PUEDA PROCEDER CON EL PROCESO DE TITULACIÓN.**


Tuxtepec, Oax., a 13 de Septiembre del 2016.

ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA

Asesor de Tesis


Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor- Investigador

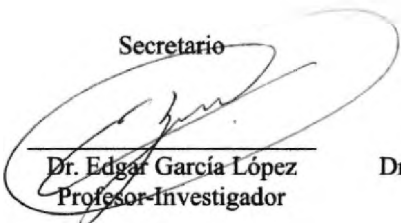
Co-Asesor de Tesis


Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Profesor- Investigador

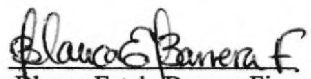
Presidente


Dra. Laura Patricia Ramirez Coutiño
Profesor- Investigador

Secretario


Dr. Edgar García López
Profesor-Investigador

Vocal


Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor- Investigador

ABREVIATURAS

°C: grados Celsius	ERO: especies reactivas de oxígeno	MDAR: monodehidroascorbato reductasa
µg: microgramo	FDP: farnesil difosfato	MEP: metileritritol fosfato
µL: microlitro	g: fuerza gravimetrica	MF: medio filtrado
µM: micromolar	g: gramo	mg: miligramo
2,4-D: ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	GDP: geranil difosfato	min: minutos
AJ: ácido jasmonico	GGDP: geranil geranil difosfato	mL: mililitro
APX: ascorbato peroxidasa	GPX: glutatión peroxidasa	mm: milímetros
AZA: azadiractina	GR: glutatión reductasa	MS: medio Murashige y Skoog
AZRL: limonoides relacionados a azadiractina	GSH: glutatión reducido	msnm: metros sobre el nivel del mar
BAP: bencilaminopurina	GSSG: glutatión oxidado	NAA: ácido naftalenacetico
BSA: albumina sérica bovina	h: horas	NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
CAT: Catalasa	HV: hongos vivos	nm: nanómetro
CoA: Coenzima A	IAA: ácido indol acético	OPC: oligosacáridos de pared celular
DHA. dehidroascorbato	IBA: ácido indol butírico	p. ej.: por ejemplo
DHAR: dehidroascorbato reductasa	IDP: isopentenil difosfato	P.S.: peso seco
DMADP: dimetilalil difosfato	INIFAP: Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria	PAL: fenil amonio liasa
DTT: ditiotreitól	Kn: kinetina	POD: peroxidasa
EAG: equivalentes de ácido gálico	L: litro	PVPP: polivinil polipirrolidona
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético	M.S.: micelio suspendido	rpm: revoluciones por minuto
EM: extracto de micelio	m: metros	SE: suspensión de esporas
	M: molar	U: unidades de actividad
	MDA: monodehidroascorbato	

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE CUADROS	xi
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES.....	4
4.1. Generalidades de <i>Azadirachta indica</i>	4
4.1.1. Compuestos bioactivos y actividad biológica.....	5
4.2. Metabolitos secundarios en cultivos <i>in vitro</i> de <i>A. indica</i>	13
4.3. La elicitación como estrategia para aumentar la producción de metabolitos secundarios.....	16
4.3.1. Elicitación fúngica con oligosacáridos de pared celular.....	18
4.3.2. <i>Fusarium</i> spp.....	22
4.4. Estrés oxidativo.....	23
4.4.1. Estudios de elicitación fúngica en <i>A. indica</i>	27
5. JUSTIFICACIÓN.....	28
6. HIPÓTESIS.....	29
7. OBJETIVO GENERAL.....	29
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
9. METODOLOGÍA.....	30
9.1. Material biológico	30
9.1.1. Vegetal	30
9.1.2. Obtención de oligosacáridos de pared celular.....	30
9.2. Cinética de conocimiento del sistema.....	31
9.3. Experimentos de elicitación fúngica.....	31

9.4.	Cuantificación de la biomasa	32
9.5.	Determinación de limonoides relacionados a azadiractina (AZRL)	32
9.6.	Determinación de compuestos fenólicos totales	32
9.7.	Actividades enzimáticas	33
9.7.1.	Obtención de extractos enzimáticos	33
9.7.2.	Determinación de proteína	33
9.7.3.	Actividad enzimática PAL	34
9.7.4.	Actividad enzimática POD	35
9.7.5.	Actividad enzimática CAT	36
9.7.6.	Actividad enzimática del APX	36
9.8.	Análisis de datos	37
10.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
10.1.	Cinéticas de crecimiento y producción de metabolitos en callos de <i>A. indica</i>	38
10.2.	Cinética de elicitación fúngica en callos de <i>A. indica</i>	40
10.2.1.	Efecto de la elicitación sobre el crecimiento	40
10.2.2.	Efecto de la elicitación en la producción de fenoles totales y AZRL	42
10.2.3.	Efecto de la respuesta enzimática relacionada a PAL	45
10.2.4.	Efecto de la elicitación en la respuesta antioxidante enzimática	47
11.	CONCLUSIONES	54
11.	RECOMENDACIONES	55
12.	REFERENCIAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Neem.....	4
Figura 2. Precursores y compartimentación en la síntesis de AZA y limonoides relacionados	10
Figura 3. Ruta del ácido shikímico.....	12
Figura 4 Fases y respuestas inducidas en plantas bajo condiciones de estrés....	17
Figura 5. Esquema de la red de transducción en la elicitación.....	21
Figura 6. Mecanismo enzimático de detoxificación.	24
Figura 7. Mecanismo de acción de la enzima fenilalanina amonio liasa	34
Figura 8. Mecanismo de acción de la enzima guayacol peroxidasa.....	35
Figura 9. Mecanismo de acción de la ascorbato peroxidasa, perteneciente al ciclo del ascorbato-glutation	37
Figura 10. Cinética de crecimiento, producción de AZRL y compuestos fenólicos en callos de <i>A. indica</i>	39
Figura 11. Cinética de crecimiento de callos bajo condiciones de elicitación fúngica.	41
Figura 12. Callos de <i>A. indica</i> tras 0,6,12 18,24, 36, 48, 72 y 216 h tras ser elicitados	42
Figura 13. Cinética de producción de fenoles totales en callos de <i>A indica</i> bajo elicitación fúngica.....	43
Figura 14. Cinética de acumulación de AZRL en callos de <i>A indica</i> bajo elicitación fúngica.....	44
Figura 15. Cinética de actividad enzimática PAL en cultivos elicitados de callos de <i>A. indica</i>	46
Figura 16. Compuestos derivados de la actividad de PAL en <i>A. indica</i>	47
Figura 17. Cinética de actividad enzimática de las enzimas CAT (A), POD (B) y APX (C) en cultivos elicitados de callos de <i>A. indica</i>	49
Figura 18. Esquema sugerido de la señalización en callos de <i>A. indica</i> durante la elicitación con <i>Fusarium spp.</i>	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Limonoides bioactivos en <i>A. indica</i>	7
Cuadro 2. Compuestos fenólicos de <i>A. indica</i>	11
Cuadro 3. Producción de limonoides en cultivos <i>in vitro</i>	15
Cuadro 4. Uso de elicitores fúngicos en diferentes especies vegetales.	19
Cuadro 5. Trabajos previos de elicitación en <i>A. indica</i>	27
Cuadro 6. Valor de pH para los extractos enzimáticos de acuerdo a la actividad enzimática a ensayar.	33

1. RESUMEN

Azadirachta indica A. Juss (neem) es ampliamente estudiada por sus actividades biológicas, siendo los limonoides (AZRL) los principales metabolitos secundarios. Sin embargo, diversos factores ambientales afectan la producción de AZRL y los reportes acerca de su biosíntesis son escasos. Algunas estrategias biotecnológica para incrementar la producción de metabolitos secundarios son el cultivo *in vitro* y la elicitación con diferentes tipos de estrés abiótico y biótico. El objetivo de este estudio fue evaluar la elicitación con oligosacáridos de pared celular (OPC) de *Fusarium spp.*, sobre los mecanismos antioxidantes enzimático/no enzimático, la producción de AZRL y de compuestos fenólicos en cultivos de callos. Los callos de *A. indica* con seis días de edad fueron elicitados con 1.16 y 2.32 μg de OPC mL^{-1} de *Fusarium spp.* (equivalentes a 25 y 50 μg de micelio mL^{-1} , respectivamente). Se cuantificó la actividad de la enzima fenil amonio liasa (PAL), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y ascorbato peroxidasa (APX), la concentración de compuestos fenólicos totales y AZRL en un intervalo de 0 a 72 h después de la elicitación. La adición de 1.16 μg de OPC mL^{-1} provocó un aumento del 273 %, 284 % y 157 % y en las actividades de CAT, POD y APX en comparación al cultivo control (5.62, 20604 y 5.63 U/mg proteína, respectivamente) respecto al promedio del control. Todas las actividades enzimáticas mostraron un comportamiento monofásico a las 36h después de la elicitación y el máximo contenido de limonoides se alcanzó después de 72 h de exposición (≈ 2000 μg AZRL/g de P.S). El tratamiento con 2.32 μg de OPC mL^{-1} produjo un nivel mayor de estrés oxidativo mostrando un perfil bifásico en la actividad de CAT y POD a las 18 y 36 h después de la elicitación (231 y 408 %; 827 y 1671% comparados al control, respectivamente). Mientras que APX mostró un comportamiento monofásico con un máximo a las 36 h (1781 %, respecto al control). Por lo que se concluye que la adición de OPC de *Fusarium spp.*, incrementó la respuesta antioxidante enzimática para contrarrestar la concentración de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden estar involucradas con mecanismos para la biosíntesis de AZRL.

2. ABSTRACT

Azadirachta indica A. Juss (neem) has been widely studied for its biological activities; limonoids (AZRL) are the major secondary metabolites. However, Neem is exposed to environmental factors and AZRL production is affected; furthermore their biochemical pathway is not well studied. Some biotechnological strategies to improve the production of secondary metabolites are plant *in vitro* culture and elicitation with biotic and abiotic stresses. The aim of this study was to evaluate the effects of elicitation with cell wall oligosaccharides (OPC) from *Fusarium spp* on the enzymatic/non-enzymatic antioxidant capacities, AZRL and phenolic compounds production in *A. indica* callus cultures. Six-day old callus of *A. indica* were elicited with 1.16 and 2.32 $\mu\text{g OPC mL}^{-1}$ OPC from *Fusarium spp*. (25 y 50 μg of mycelia mL^{-1} , respectively). The activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL), catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX), phenolic compounds and AZRL contents were quantified from 0 to 72h after elicitation. Addition of 1.16 $\mu\text{g OPC mL}^{-1}$ increased 273, 284, 157% of CAT, POD and APX activities in comparison to the control cultures (5.62, 20604, 5.63 U/mg protein, respectively). All activity showed a monophasic profile at 36h after elicitation and the highest limonoids content was achieved at 72h ($\approx 2000 \mu\text{g AZRL/g}$ fresh weight). Treatment with 2.32 $\mu\text{g OPC mL}^{-1}$ produced a high oxidative burst level, following biphasic profile of CAT and POD activities at 18 and 36h after elicitation (231 and 408 %; 827 and 1671% in relation to the control, respectively). While, APX activity exhibited a monophasic profile with maxima at 36h (1781%, respect to the control). Addition of OPC from *Fusarium. spp* increased enzymatic antioxidant activity in order to decrease reactive oxygen species, which could be involved with AZRL biosynthesis.

3. INTRODUCCIÓN

Azadirachta indica A. Juss (neem), es un árbol proveniente de India, que ha sido utilizado desde la antigüedad para el tratamiento y prevención de varias enfermedades (Biswas *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2005). Acumula principalmente limonoides (AZRL) y compuestos fenólicos, que se encuentran mayoritariamente en las semillas, siendo este uno de los mayores problemas en cuanto a la obtención de sus principios bioactivos, ya que es una planta que produce semillas una vez al año (Chavarría *et al.*, 1978). En cultivos *in vitro* de *A. indica* se han reportado estudios de elicitación abiótica y biótica para la producción de AZRL (Balaji *et al.*, 2003; Satdive *et al.*, 2006; Devi *et al.*, 2008; Srivastava y Srivastava, 2014), sin embargo, no existe reportes en cuanto a la acumulación de compuestos fenólicos. Por otro lado, los estudios acerca de las vías de biosíntesis de AZRL y compuestos fenólicos en *A. indica* son escasos y se desconocen los mecanismos de traducción de señales pueden conllevar a su biosíntesis.

En relación a los compuestos fenólicos, se conoce que la enzima fenilalanina amonio liasa participa en su biosíntesis. La actividad de PAL puede ser afectada tanto por estrés abiótico como biótico. Por ejemplo, la enzima PAL también puede ser inducida por factores bióticos como el ataque de patógenos (hongos) (El Modafar *et al.*, 2001). La elicitación en suspensiones celulares y en plántulas *in vitro* con oligosacáridos fúngicos han mostrado efecto positivo en la actividad de PAL, así como en la concentración de compuestos fenólicos, producción de ERO y de otros metabolitos secundarios (Yuan *et al.*, 2002; Xu y Dong, 2005; Xu *et al.*, 2005; El Modafar *et al.*, 2006).

Por lo que en este trabajo, se propuso evaluar el efecto de la elicitación con oligosacáridos del hongo *Fusarium* spp sobre los mecanismos antioxidantes enzimático/no enzimático, la producción de AZRL y de compuestos fenólicos en cultivos de callos de *A. indica*.

4. ANTECEDENTES

4.1. Generalidades de *Azadirachta indica*

Azadirachta indica es conocida popularmente como nim, neem, margosa paraíso, caoba criolla y caoba haitiana. Es un árbol tropical perennifolio, con la siguiente clasificación taxonómica hecha por De Jussieu en 1830 (Biswas *et al.*, 2002).

Orden: *Rutales*
Familia: *Meliaceae*
Género: *Azadirachta*
Especie: *indica*

Tiene una altura entre los 15 y 20 m. Florece de abril a mayo y produce frutos en mayo prolongándose hasta agosto, es decir que es anual en la producción de semillas.

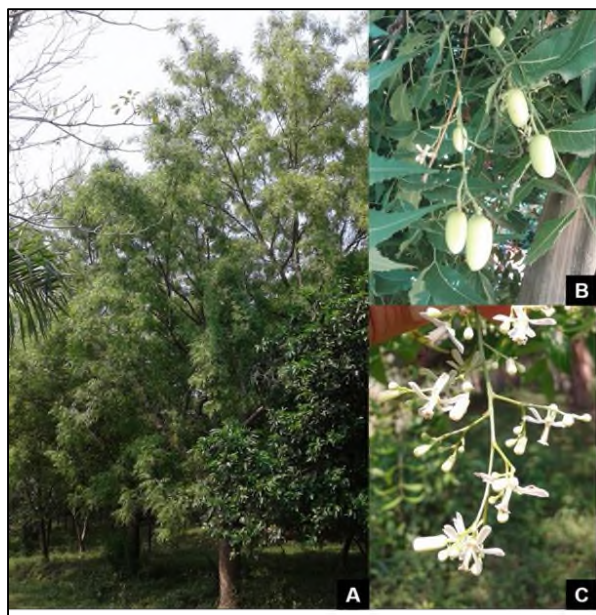


Figura 1. Neem (*A. indica*). A) Árbol de neem, B) Frutos, C) Flores. Fotografías: Armando Noriega Feria.

Crece en diferentes condiciones climáticas, siendo actualmente cultivado en zonas semiáridas con precipitaciones pluviales de 200 a 1200 mm H₂O, tolera temperaturas desde 0 a 49°C y crece en alturas que van desde 50-1500 msnm. Esta especie no es muy exigente en cuanto al tipo de suelo, con excepción a los suelos anegados y con arenas secas profundas. El sistema radicular es capaz de extraer nutrientes y humedad en suelos muy elevados y es tolerante a salinidad. (Rodríguez *et al.*, 1994; Chavarría *et al.*, 1978).

Es nativo de la zona Este de la India y Birmania; su introducción en el Caribe, países de Centroamérica y México es bastante reciente. El árbol de neem se introdujo a México por Baja California Sur en 1989 por un grupo de productores privados dedicados a la horticultura orgánica en San José del Cabo (Leos y Salazar, 2002). En 1992 se introdujo al Valle del Yaqui, Sonora (Moreno, 1996). A partir de 1994, los árboles se plantaron en otros estados como: Baja California Sur, Sinaloa, Sonora, Nayarit, Colima, Campeche, San Luis Potosí, Guerrero, Quintana Roo, Yucatán, Nuevo León, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Tabasco, Tamaulipas y Durango, dentro de los más importantes (INIFAP, 1999).

A. indica es conocido desde hace más de 2000 años en India y sus países vecinos formando parte importante de la cultura, siendo muy apreciada como una planta medicinal con muchos usos, esto debido a su amplio espectro de actividad biológica. Los usos medicinales abarcan todas las partes de la planta y la investigación de los compuestos químicos contenidos en el neem ha sido desarrollada principalmente en la segunda mitad del siglo XX (Biswas *et al.*, 2002).

4.1.1. Compuestos bioactivos y actividad biológica

A. indica produce más de 300 metabolitos secundarios (David *et al.*, 2000; Dai *et al.*, 1999). Estos compuestos pueden dividirse en dos tipos principales: los isoprenoides y los norisoprenoides. Los isoprenoides, también conocidos como terpenos, representan un tercio de los metabolitos secundarios. Incluyen

diterpenoides y triterpenoides entre los que se encuentran protomeliacinas, limonoides, azadirona y sus derivados, gedunina y sus derivados, compuestos del tipo vilasinina y C-secomeliacinas tales como nimbina, salanina y azadiractina (AZA). Los norisoprenoides incluyen compuestos tan diversos como proteínas, aminoácidos, compuestos sulfurosos y compuestos polifenólicos, que son ricos en la planta, como flavonoides y sus glicosidos, etc. (Biswas *et al.*, 2002; Orozco-Sánchez y Rodríguez-Monroy, 2007).

4.1.1.1. Limonoides

Los limonoides son derivados de los terpenoides pertenecientes al grupo de los tetranortriterpenoides, son moléculas altamente oxidadas y son las encargadas de darle el sabor amargo característico a los cítricos. En plantas los limonoides están casi reservados para plantas de la familia *Rutales* y más abundantes en las familias *Rutaceae* y *Meliaceae*, donde también se conocen como meliacinas.

Son moléculas moderadamente polares, solubles en acetona y alcohol (Aliero, 2003). Estereo-químicamente son homogéneos y su estructura típica contiene un esqueleto de 4, 4,8-trimetil-17-furanilesteroides (Roy y Saraf, 2006).

Se conocen diversas aplicaciones medicinales de varias partes del neem. La actividad biológica está reportada en los extractos crudos y sus diferentes fracciones obtenidas de hoja, corteza, raíz, semilla y aceite. Los extractos han sido utilizados para el tratamiento de varios males (Biswas *et al.*, 2002).

Algunos limonoides de *A. indica* y su actividad biológica se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Limonoides bioactivos en *A. indica*.

Compuesto	Fuente	Actividad biológica	Referencia
Nimbidina	n. e.	Antiinflamatorio	Bhargava <i>et al.</i> (1970) Pillai <i>et al.</i> (1981) Murthy y Sirsi (1958) Bhide <i>et al.</i> (1958)
		Antiartrítico	
		Antipirético	
		Hipoglucémico	
		Espermicida	
		Antifúngico	
		Antibacteriano	
Nimbina	Aceite de semilla	Antidiurético	Bhide <i>et al.</i> (1958)
		Antiviral	
Deactilazadiractinol	Hoja	Espermicida	Sharma <i>et al.</i> (1959)
		Antihormona	
Nimbidato de sodio	n. e.	Antinflatatorio	Bhargava <i>et al.</i> (1970) Pillai <i>et al.</i> (1981)
Margolona, margolonona, isomargolonona	Corteza	Antibacteriano	Ara <i>et al.</i> (1989)
Azadiractina	Semilla	Antimalárico	Varios
		Antialimentario	
		Antihormona	
		Anticancerígeno	
Mahmoodina	Aceite de semilla	Antifúngico	Devakumar <i>et al.</i> (1996)
		Antibacteriano	
Nimbólido	Aceite de semilla	Antibacteriano	Rochanakij <i>et al.</i> (1985)
		Antimalárico	Khalid <i>et al.</i> (1989)
		Anticancerígeno	Rojanapo <i>et al.</i> (1985) Kumar <i>et al.</i> (2010)
Gedunina	Aceite de semilla	Antifúngico	Rao <i>et al.</i> (1977)
		Antimalárico	Khalid <i>et al.</i> (1989)
		Anticancerígeno	Kumar <i>et al.</i> (2010)

7-deacetil-7-benzoilepoxiazadiradiona	n. e.	Actividad citotóxica contra células leucémicas	Kikuchi <i>et al.</i> (2011)
7-deacetil-7-benzilgedunina	n. e.		
28-deoxinimbolido	n. e.	Actividad citotóxica contra células leucémicas	Kikuchi <i>et al.</i> (2011)
		Antiinflamatorio	Akihisa <i>et al.</i> (2011)
1-3-diacetilvilasinina	n. e.	Antiinflamatorio	
Salanina	n. e.	Antiinflamatorio	
		Anticancerígeno	Akihisa <i>et al.</i> (2011)
2-3-dihidrosalanina	n. e.	Antiinflamatorio	
3-deacetilsalanina	n. e.	Antiinflamatorio	
7-O-acetil-7-O-debenzoil-22-hidroxi-21-metoxilimocinina	Flores	Inhibidor de melanogénesis	Kitdamrongtham <i>et al.</i> (2014)
7-benzoil-17-epinimbocinol	n. e.	Anticancerígeno	Manosroi <i>et al.</i> (2014)
		Anticancerígeno	
2,3-dihidro-3 α -metoxinimbolido	n. e.	Inhibidor de cáncer de estomago	Manosroi <i>et al.</i> (2014)

n. e. (no especificado)

4.1.1.2. Biosíntesis de limonoides

Los limonoides se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, que se encuentra activa en el citosol, en donde tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IDP); y la ruta del metileritritol fosfato, que sucede en los cloroplastos, en la que una molécula de gliceraldehído trifosfato y una de piruvato se condensan para formar metileritritol fosfato (MEP) y posteriormente dimetilalil difosfato (DMADP) (Figura 2).

El isopentenil difosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMADP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a prenil bifosfatos como geranil difosfato (GDP), precursor de monoterpenos; farnesil difosfato (FDP), precursor de

sesquiterpenos y geranil geranil difosfato (GGDP) precursor de diterpenos. Dos moléculas de farnesil difosfato, con ayuda de la sintetasa de escualeno se unen por los extremos donde pierden los grupos pirofosfato para formar escualeno (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Estas tres unidades sirven como precursores de las diferentes clases de terpenos. Las sintasas de terpenoides o ciclasas catalizan las reacciones en las que forman los terpenos primarios. Estos a su vez, son posteriormente modificados por la actividad de una serie de diferentes enzimas en 21 pasos (p. ej. hidroxilasas, dehidrogenasas, reductasas y glicosil, metil y acil transferasas) los cuales en conjunto generan la gran cantidad de estructuras derivadas de los terpenoides, protolimonoides o protomeliacinas (derivados de eufano y tirucalano) que son los precursores biosintéticos de las meliacinas o limonoides. En *A. indica* se han identificado 12 protolimonoides, en entre ellos el melianrol que es una molécula con una potente actividad antialimentaria (Kumar *et al.*, 2014).

Con base en las rutas conocidas para la producción de isoprenos necesarias para la producción de protolimonoides y limonoides, se han propuesto modelos en los que se presume una serie de reacciones sucedidas en el citosol y en los plastidios (Aharoni *et al.*, 2005).

La información acerca de la biosíntesis de terpenos no se encuentra totalmente definida (Figura 2), sin embargo, estudios de radio marcaje han identificado partes importantes de esta ruta. Proponen que la biosíntesis de azadiractina y sus precursores provienen de la vía del mevalonato y la ciclación del escualeno dando como resultado iones tetracíclicos químicamente similares, el eufano/eufol y tirucalano/tirucalol (A). La isomerización alílica del eufano/tirucalano lleva a la formación de butirospermol (B) que luego es oxidado y sufre un re-arreglo por una reacción tipo Wagner-Meerwein en la que hay un cambio de 1,2-metil para formar apo eufano/tirucalano (C). Reacciones de escisión de los cuatro carbonos terminales de la cadena lateral llevan a la formación de intermediarios de

tetranortiterpenoides y una ciclización de los carbonos restantes da lugar a un anillo furano (D) que finalmente es oxidado para formar azadirona y azadiradiona. Limonoides como la nimbina, nimbidina y la salanina se forman con ambas moléculas, azadirona o azadiradiona, por medio de la oxidación y esterificación con una molécula de ácido tíglico. Se ha postulado que la azadiractina y limonoides relacionados a azadiractina (AZRL) se sintetizan en la posterior oxidación y ciclación de azadirona y salanina (E).

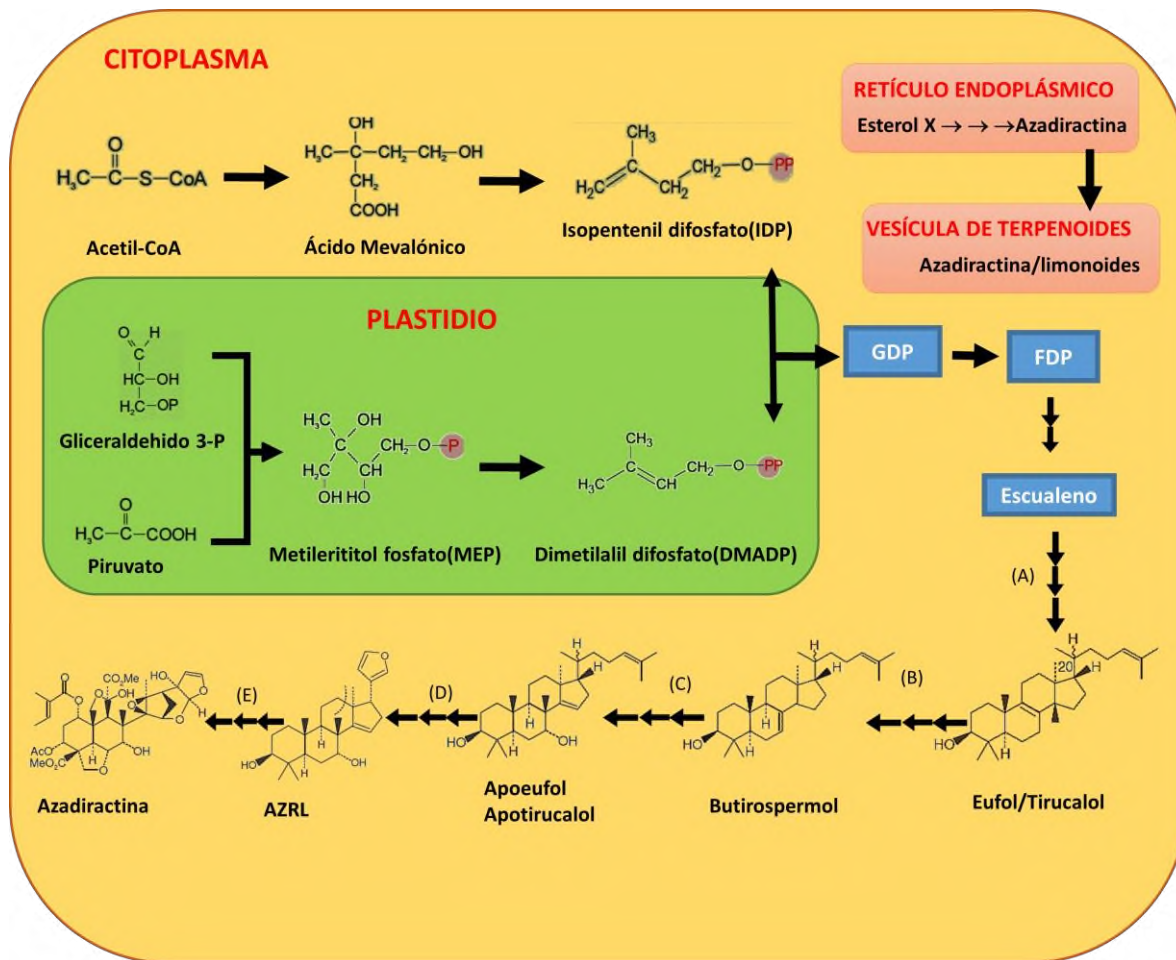


Figura 2. Precursores y compartimentación en la síntesis de AZA y limonoides relacionados. GDP (geranil difosfato), FDP (farnesil difosfato). Adaptado de Aharoni *et al.* (2005).

4.1.1.3. Compuestos fenólicos

En el metabolismo de las plantas los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir al metabolismo primario como al secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que tienen un grupo fenol, estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Boudet, 2007).

Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como taninos y lignina. Los principales compuestos fenólicos de *A. indica* y su actividad biológica se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Compuestos fenólicos de *A. indica*

Compuesto	Presencia	Actividad biológica
Ácido tánico	Corteza fresca, corteza seca, hojas maduras, hojas tiernas epicarpio tierno, epicarpio maduro, pulpa madura epicarpio tierno, semilla tierna, semilla madura.	Insecticida
Ácido gálico	Corteza fresca, hojas tiernas, hojas maduras, epicarpio tierno, epicarpio maduro, epicarpio tierno, pulpa tierna, pulpa madura, semilla tierna, semilla madura, flores.	Antibacterial Actividad anticonvulsiva Importancia en la interacción planta-insecto
Ácido ferúlico	Corteza fresca, hojas tiernas, hojas maduras, epicarpio tierno, epicarpio maduro, epicarpio tierno, pulpa tierna, pulpa madura, semilla tierna, semilla madura.	Anti fúngico Efecto alelopático Propiedades inmunoestimuladoras

Ácido clorogénico	Semilla tierna, semilla madura, flores	Propiedades inmunoestimuladoras Potente antioxidante Antioxidante primario y secundario Antioxidante de proteínas de baja densidad antiinflamatorio
Epicatequina, catequina	Corteza	Antiinflamatorio Inmunomodulador

Tomado de: Singh *et al.*, 2005.

4.1.1.4. Biosíntesis de compuestos fenólicos

Existen dos rutas básicas en la biosíntesis de compuestos fenólicos. La ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido malónico es propia en la producción de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores, siendo así la ruta del ácido shikímico la responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos de este tipo en las plantas (Figura 3) (Pérez-Urria y Ávalos, 2009).

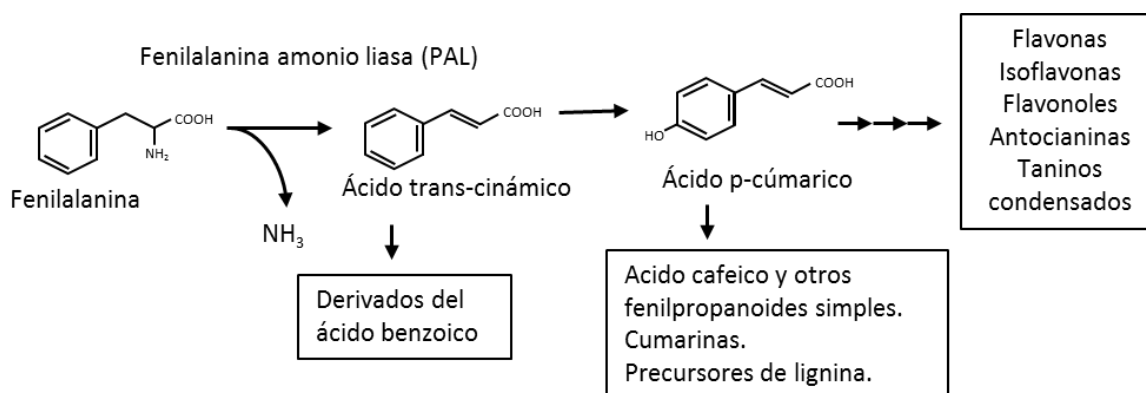


Figura 3. Ruta del ácido shikímico. Tomado de Pérez-Urria y Ávalos (2009)

La mayoría de compuestos fenólicos provienen de la fenilalanina. La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio en la fenilalanina.

Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos (Figura 3). Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido cafeico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides. Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides por contener un anillo de benceno (C₆) y una cadena lateral de tres carbonos (C₃) (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

4.2. Metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *A. indica*

El uso de herramientas biotecnológicas para la propagación, mejoramiento y producción de metabolitos secundarios de *A. indica* mediante cultivo de células, órganos o tejidos constituyen una alternativa, ya que existe un mayor control de las condiciones permitiendo mantener niveles de producción más constantes de metabolitos de interés que en sistemas donde se usa la planta completa (James y Lee, 2001). Los cultivos *in vitro* de callos son sistemas fácilmente manipulables en los que se puede estudiar el control básico del ciclo, proliferación y crecimiento celular sin procesos de desarrollo. Facilitan además el estudio de las respuestas fisiológicas y metabólicas ante estímulos bióticos y abióticos, permitiendo así separar las respuestas celulares de las respuestas generadas por una planta completa.

Estudios previos nos brindan información sobre la micropropagación, morfogénesis y organogénesis de *A. indica* (Prakash *et al.*, 2002). Naina *et al.* (1989) usaron *Agrobacterium tumefaciens* para lograr la transformación genética y regeneración de plantas de *A. indica*. Gautam *et al.* (1993) propagaron embriones y raíces en callos de *A. indica* obtenidos de anteras. Kearney *et al.*, (1994) demostraron el efecto antialimentario de los metabolitos secundarios producidos por callos y suspensiones de *A. indica* sobre insectos. También se reportó la producción *in vitro* de AZA y otros limonoides en callos y suspensiones celulares (Allan *et al.*, 1994; Wewetzer, 1998; Prakash *et al.*, 2002). A partir de estos resultados en los años siguientes se desarrollaron estudios en los que se abordaron estrategias para mejorar la concentración de AZA en cultivos celulares, tanto en callos como en suspensiones celulares, raíces, brotes y plantas completas, probando diferentes tipos de medios, reguladores y explantes (Cuadro 3). Se registraron diversas patentes dedicadas a incrementar la producción de AZA y otros metabolitos secundarios del tipo terpénico a partir de cultivos *in vitro* de *A. indica* (Hollowach-Keller *et al.*, 1997; Abraham *et al.*, 2005). Otros estudios han explorado el establecimiento de cultivos de suspensiones celulares de *A. indica* en biorreactores (Muñoz *et al.*, 2006; Prakash y Srivastava, 2005, 2006; Vásquez-Rivera *et al.*, 2015), tipo tanque agitado, habiendo un especial interés en cultivos de raíces transformadas para incrementar la producción de AZA. (Srivastava y Srivastava *et al.*, 2012, 2013). Pandreka *et al.*, 2015, realizaron estudios de los perfiles de los triterpenoides y caracterización funcional de los genes iniciales involucrados (AiGDS, AiFDS y AiSQS) en la biosíntesis de los limonoides de *A. indica*.

Cuadro 3. Producción de limonoides en cultivos *in vitro*.

Tipo de cultivo	Explante	Medio de cultivo	Limonoides	Referencia
Callo	Hojas	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	7 µg AZA/g P.S.	Allan <i>et al</i> (1994)
Callo/ Suspensión/ Brotos	Hojas	MS+IBA (4 mg/L)+ BAP (2 mg/L)	No detectado	Kearney <i>et al</i> (1994)
Raíces <i>in vitro</i> Brotos	Embrión	MS +ANA (0.1 mg/L) +BAP (0.5 mg/L)	4 µg AZA/g P.S.	Srividya <i>et al</i> (1998)
	Embrión	1/2MS+IBA (0.5 mg/L)	8 µg AZA/g P.S.	
Callos	Hojas	MS +2,4-D (1 mg/L) + Kn (0.5 mg/L) + glicina (90.3 g/L)	26800 µg AZA/g P.S.	Veeresham <i>et al</i> (1998)
	Flores		24600 g AZA/g P.S.	
Callos	Hojas	White+ IAA (0.2 mg/L) + BAP (1 mg/L)	64 µg AZA/g P.S.	Wewetzer (1998)
	Corteza		44 µg AZA/g P.S.	
Callos/ Suspensión	Hojas	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	*	Kuruvilla <i>et al</i> (1999)
Raíces transformadas	Hoja	MS sin hormonas de crecimiento	3.6 µg AZA/g P.S.	Sundaram <i>et al</i> (1996)
	Tallo		2.7 µg AZA/g P.S.	
Callo	Semilla	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	0.5 µg AZA/g P.S.	Schaaf <i>et al</i> (2000)
Callo	Semilla	MS+ANA (2mg/L)+BAP(4 mg/L)	189 µg AZA/g P.S.	Prakash <i>et al</i> (2005)
Callo	Hoja	MS+IBA (8mg/L)+BAP(4 mg/L)	23 µg AZA/g P.S.	
Suspensión	Hoja	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	274 µg AZA/g P.S.	Capataz (2005)
Callo	Flores	MS+2,4.D(1mg/L)+BAP(1mg/L)+NAA (0.2 mg/L)	254.1 µg AZRL/g P.S.	Rafiq y Dahot (2010)
Callo	Semillas	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	819.24 µg AZRL/g P.S.	
	Hojas	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	782.68 µg AZRL/g P.S.	Cruz (2015)
Suspensión	Semillas	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	256450 µg AZRL/g P.S.	
	Hojas	MS+IBA (4 mg/L) + BAP (2 mg/L)	212290 µg AZRL/g P.S.	
Plántula	Semillas	MS sin hormonas de crecimiento	142.31 µg AZRL/g P.S.	Méndez, (2016)

IBA (ácido indol butírico), IAA (ácido indol acético), 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), Kn (Kinetina), NAA (ácido naftalenacético), BAP (bencil amino purina), P.S. (Peso seco).

4.3. La elicitación como estrategia para aumentar la producción de metabolitos secundarios

La elicitación es un conjunto de técnicas en las que el fin es la inducción o incremento de la producción de metabolitos secundarios debido a la adición de sustancias y/o exposición a condiciones específicas que cuando son introducidas en bajas concentraciones en un sistema vivo, como células o plantas, inician o mejoran la producción de compuestos específicos debido a que desencadenan respuestas fisiológicas y morfológicas (Radman *et al.*, 2003).

Los cambios vienen dados por condiciones de estrés provocadas por la alteración las condiciones normales de la planta, posterior a eso existe una restauración de esas funciones fisiológicas y/o resistencia a las condiciones que provocaron el cambio. En algunos casos, cuando el estrés excede el límite de tolerancia y la capacidad para adaptarse a él, puede provocarse el daño celular permanente o incluso la muerte de la planta (Lichtenthaler, 1998).

Los elicitores se clasifican de acuerdo a su naturaleza, en bióticos y abióticos o de acuerdo a la interacción planta-elicitador, en generales (metil jasmonato, ácido salicílico), si desencadenan una respuesta de defensa en cualquier planta; y específicos (extractos fúngicos), cuando sólo actúan sobre una especie en particular (Wink, 2003). Los elicitores abióticos son sustancias de origen no biológico, principalmente sales inorgánicas y factores físicos. Los elicitores bióticos son sustancias de origen biológico que incluyen polisacáridos derivados de la pared celular de las plantas y los microorganismos (Namdeo, 2007). La respuesta de la planta puede llevarse a cabo en cuatro fases (Fig. 4): fase 1: respuesta (alarma), fase 2: recuperación (resistencia), fase 3: final (agotamiento), fase 4: regeneración (parcial o completa) de las funciones fisiológicas iniciales (Lichtenthaler, 1998).

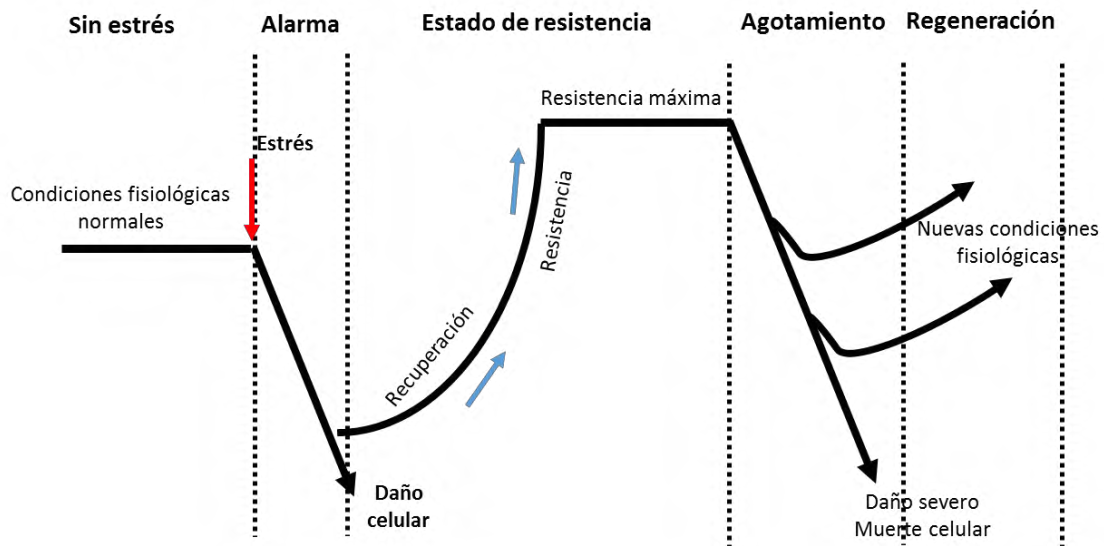


Figura 4 Fases y respuestas inducidas en plantas bajo condiciones de estrés. Tomado de Lichtenthaler (1998)

Cada una de las fases está caracterizada por ciertos cambios en el comportamiento de la planta. Al inicio del estrés la planta decae en una o varias de sus funciones fisiológicas como la fotosíntesis o el transporte de iones y metabolitos, esta desviación de las condiciones estándar conlleva a una disminución de la vitalidad. Si la planta tiene respuestas bajas o nulas ante el estrés puede haber un daño severo. Al final de esta fase la mayoría de las plantas activan sus mecanismos de resistencia al estrés adaptando su metabolismo, activando procesos de reparación y otros ajustes metabólicos y morfológicos de largo plazo. Este nuevo estado óptimo bajo las condiciones de estrés corresponde a la resistencia máxima de la planta. Si la condición de estrés es muy alta y excede la capacidad adaptativa de la planta se llega a una fase agotamiento en la que la vitalidad y la fisiología van decayendo pudiendo causar un severo daño y finalmente la muerte celular. Sin embargo cuando el agente causante de estrés es retirado o contrarrestado a tiempo la planta puede regenerarse y cambiar a un estado fisiológico de regeneración de las funciones.

4.3.1. Elicitación fúngica con oligosacáridos de pared celular

El éxito de la elicitación fúngica como una alternativa para aumentar la síntesis de metabolitos secundarios viene derivada de la respuesta y los mecanismos de defensa desencadenados por el ataque de patógenos. La elicitación fúngica puede realizarse con levaduras, micelios de hongos o esporas en soluciones con algún tipo de tratamiento, ya sean químicos o físicos, para obtener fragmentos de pared celular, esta técnica ha sido utilizada ampliamente. A pesar del poco conocimiento que se tiene de la composición y el mecanismo de acción de este tipo de elicitores se reconocen algunos compuestos del tipo polisacáridos, oligosacáridos, glicoproteínas, péptidos y proteínas (Zhao *et al.*, 2005; Ramírez-Estrada, 2016).

Los oligosacáridos son cadenas cortas de residuos de azúcares unidas por enlaces glucosídicos, y a bajas concentraciones provocan efectos biológicos en los tejidos vegetales, iniciando los mecanismos de respuesta ante el ataque de patógenos o insectos. Los oligosacáridos están también relacionados con varios procesos de desarrollo en plantas (Usov, 1994). Los oligosacáridos ejercen efectos específicos distintos de acuerdo a sus características fisicoquímicas y la especie que está percibiendo la señal, Estos compuestos son reconocidos por receptores en la superficie de la pared celular, dando como resultado la estimulación directa de rutas metabólicas y un aumento en la resistencia sistémica adquirida. Algunos oligosacáridos han servido como modelos para estudios del reconocimiento de elicitores y la transducción hacia la activación de maquinaria de defensa en plantas (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016). La mayoría de las respuestas inducidas por los oligosacáridos, también son observadas cuando las plantas son tratadas con elicitores no sacáridos o infectadas con patógenos. La principal diferencia de los oligosacáridos comparada con otros tipos de elicitores es que no inducen la respuesta hipersensitiva (Shibuya y Minami, 2001).

Diversos estudios han probado la elicitación fúngica obteniendo como resultado una mayor producción de metabolitos de interés además de una variedad de respuestas

de tipo enzimático (Cuadro 4). También ha sido comprobado que la elicitación fúngica lleva a la rápida acumulación de factores de transcripción que conduce a la expresión de metabolitos secundarios. Por ejemplo, en las enzimas que forman parte de la vía de los fenilpropanoides se han identificado regiones génicas que están reguladas por estos factores de transcripción (Davies y Schwim, 2003). Algunos autores han demostrado resultado favorables con el uso de los derivados de la pared celular fúngica. Xu *et al.* (2004), utilizando oligosacáridos de la pared de *Penicillium citrinum* tuvieron un aumento de óxido nitroso, actividad de PAL y producción de taxol; Lu y Mei (2003) lograron aumentar la producción de feniletanoides al elicitar cultivos de *Cistanche deserticola* con oligosacáridos de *Fusarium solani*.

Cuadro 4. Uso de elicitores fúngicos en diferentes especies vegetales.

Especie	Sistema	Fuente de elicitor	Elicitor Fúngico	Respuesta	Referencia
<i>Daucus carota</i>	Callo	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. flavus</i>	MF, MS	Aumento producción antocianinas	en de Rajendran <i>et al.</i> , 1994
<i>Taxus chinensis</i>	Suspensión	Flora propia de <i>Taxus</i>	OPC	Aumento en la producción de taxol, aumento en la producción de H ₂ O ₂ y peroxidación de lípidos	Yu <i>et al.</i> , 2002
<i>Taxus chinensis</i>	Suspensión	<i>Fusarium oxysporum</i>	OPC	Aumento de PAL y compuestos fenólicos	Yuan <i>et al.</i> , 2002
<i>Cistanche deserticola</i>	Suspensión	<i>Fusarium solani</i>	OPC	Aumento de la producción de verbascosidos y equinacosido	Lu y Mei, 2003
<i>Taxus chinensis</i>	Suspensión	<i>Penicillium citrinum</i>	OPC	Producción de NO, activación de PAL y mayor producción de taxol	Xu <i>et al.</i> , 2004
<i>Panax ginseng</i>	Raíces transformadas	<i>Colletotrichum lagenarium</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	n.e.	Producción ginsenosidos	de Liu <i>et al.</i> 2004
<i>Lupinus luteus</i>	Embriones	<i>Fusarium oxysporum</i>	SE	Aumento en la actividad de POD, APX y acumulación de isoflavonas	Morkunas y Gemerek, 2005

<i>Catharanthus roseus</i>	Suspensión	<i>Aspergillus niger</i>	OPC	Aumento de PAL, producción de ERO y catarantinas	Xu y Dong, 2005
<i>Panax ginseng</i>	Suspensión	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	OPC	Producción de ginsenósidos	Xu et al. 2005
<i>Phienix dactylifera</i>	Plántula	<i>Fusarium oxysporum</i>	MF,MS	Aumento de PAL	Modafar et al., 2006
<i>Euphorbia pekinensis</i>	Suspensión	<i>Fusarium sp.</i>	MS	Aumento en la producción de eufol. Aumento en la actividad de PAL, POD, CAT	Gao et al. 2011
<i>Andrographis paniculata</i>	Suspensión	<i>Aspergillus niger</i>	n.e.	Mayor producción de flavonoides	Mendhulkar et al. 2011
<i>Linun album</i>	Suspensión	<i>Fusarium graminearum</i>	MF	Producción de podofilotoxina y lignanos. Actividad de PAL	Bahabadi et al. 2011; Bahabadi et al. 2012
<i>Linun album</i>	Raíces transformadas	<i>Piriformospora indica</i>	EM,HV	Producción de podofilotoxina y 6-metoxipodofilotoxina. Actividad de PAL	Baldi et al. 2008; Kumar et al. 2012
<i>Coleus forskholii</i>	Suspensión	<i>Aspergillus niger,</i> <i>Rhizopus oryzae,</i> <i>Penicillium notatum</i>	n.e.	Producción del diterpeno forskolina	Swaroopaa et al. 2013
<i>Psoralea corylifolia</i>	Suspensión	<i>Aspergillus niger,</i> <i>Penicillium notatum</i>	EM	Mayor síntesis de la furocumarina psoralena	Ahmed et al. 2014
<i>Taxus spp.</i>	Suspensión	<i>Fusarium mairei</i>	n.e.	Producción de paclitaxel y taxanos relacionados	Badi y Farzin 2015
<i>Hypericum perforatum</i>	Suspensión	<i>Fusarium oxysporum,</i> <i>Phoma exigua,</i> <i>Botrytis cinerea</i>	EM	Aumento en la producción de hipericina, pseudohipericina, compuestos fenólicos antocianinas y flavonoides. Actividad aumentada de PAL, POD y CAT	Simic et al. 2015

MF (medio filtrado), MS (micelio suspendido), OPC (oligosacáridos de pared celular), SE (suspensión de esporas), EM (extracto de micelio), HV (hongos vivos), n.e (no especificado)

La respuesta generada por la planta elicitada es una serie de eventos bioquímicos en cascada que pueden ordenarse de la siguiente forma: reconocimiento del elicitador por receptores en la membrana, fosforilación y desfosforilación de proteínas de la

membrana y el citosol, aumento en la concentración de iones Ca^{2+} en el citoplasma, depolarización de la membrana celular, flujo de iones (Cl^- , K^+ y H^+), alcalinización extracelular y acidificación citoplasmática, activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno, activación de la NADPH oxidasa, producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), expresión de genes de defensa tempranos, producción de etileno y jasmonato, expresión de genes de defensa tardíos y acumulación de metabolitos secundarios (Figura 5) (Zhao *et al.*, 2005).

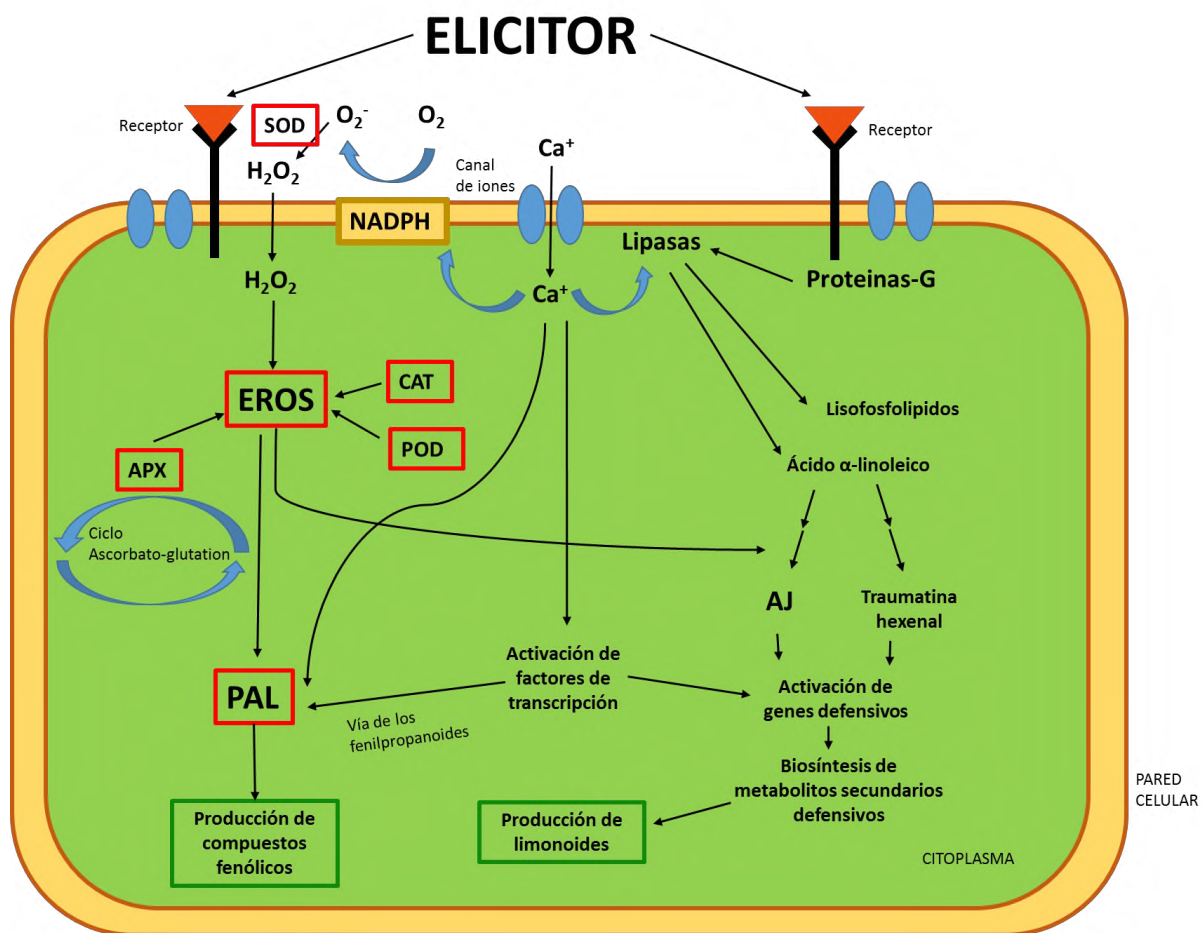


Figura 5. Esquema de la red de transducción en la elicitación. Adaptado de Zhao *et al.*, (2005). APX (ascorbato peroxidasa), CAT (catalasa), POD (peroxidasa), SOD (superóxido dismutasa), AJ (ácido jasmónico).

4.3.2. *Fusarium* spp.

Fusarium es un género cosmopolita de hongos filamentosos ascomicetos que producen diversas metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas), comprende 70 especies descritas, que a su vez están agrupadas en 12 secciones. Cada sección es un conjunto de especies relacionadas entre sí. Más de la mitad de las especies son parásitas de plantas y entre ellas se encuentran algunos de los más serios patógenos del mundo agrícola (Kikot, 2012). Algunas especies de *Fusarium* producen esporas sexuales y al menos tres tipos de esporas asexuales aunque no todos los tipos de esporas pueden ser generadas por todas las especies y menos del 20 % del género tiene un ciclo sexual conocido. Como hongos patógenos emplean diversos mecanismos de infección, la mayoría se puede clasificar como hemibiotrófico, ya que su infección inicial se asemeja a la de patógenos que se basan en organismos vivos, pero eventualmente viran hacia matar y consumir las células del hospedero (Ma *et al.*, 2013).

Análisis extensivos de los carbohidratos en paredes celulares de *Fusarium* indican la presencia de glicoproteínas β -D-(1 \rightarrow 3) [1 \rightarrow 6] con uniones a glucosa y ácido urónico. Algunas secuencias como β -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-manopiranosil, α -D-ácido glucurónico-(1 \rightarrow 2)- β -D-galacturofuranosil, β -D-galacturofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-manopiranosil y β -D-galacturofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-galacturofuranosil son comunes en diferentes especies de *Fusarium*. Los oligosacáridos de *Fusarium* están conformados principalmente de residuos de manosa con enlaces α -(1 \rightarrow 2) (Iwahara *et al.*, 1995; Jikibara *et al.*, 1992).

El tratamiento de protoplastos con las fracciones ricas en carbohidratos aisladas de las glicoproteínas de ácido urónico de *Fusarium* sp. M7-1 demuestran la capacidad de elicitar los mecanismos de respuesta en plantas de los oligosacáridos de origen fúngico (Nita-Lazar, 2000). También se ha reportado que las fracciones de disacáridos con las estructuras α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α/β -D-glucopiranosil y α -

D-manopiranosil (1→x)-inositol aisladas de pared celular de *Fusarium oxysporum* L, a una concentración de 0.2 µg/mL promovieron la actividad de PAL en células de *Rubus fruticosus* en 30 min (Nita-Lazar, 2004)

4.4. Estrés oxidativo

Una de las respuestas inevitables de las plantas a los elicitores es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los diferentes compartimentos celulares. Las ERO incluyen al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), anión superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (HO[·]) y oxígeno singulete (O₂¹) y son el resultado de la reducción parcial del oxígeno (O₂) atmosférico durante procesos metabólicos (fotosíntesis y respiración). En condiciones normales la producción de ERO en las células es baja (240 µM de O₂⁻ y 0.5 µM de H₂O₂). Sin embargo, durante condiciones de estrés esta homeostasis celular se rompe y los niveles de ERO incrementan (240-720 µM de O₂⁻ y 5- 15µM de H₂O₂) (Mittler, 2002). Todas las ERO son extremadamente dañinas cuando la concentración llega a niveles muy altos, si exceden los mecanismos de defensa vegetal se dice que la célula se encuentra en un estado de “estrés oxidativo”. Si estas concentraciones no logran ser contrarrestadas pueden causar peroxidación de los lípidos, oxidación de proteínas, daño a los ácidos nucleicos, inhibición enzimática y activación de la muerte celular programada (Sharma *et al.*, 2012).

Las plantas han desarrollado dos mecanismos de detoxificación para regular la concentración de las ERO, el enzimático y el no enzimático. El enzimático está formado por varias enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas (POD). Las rutas más importantes donde intervienen estas enzimas son: el ciclo agua-agua en los cloroplastos; el ciclo ascorbato-glutatión en cloroplastos, citosol, mitocondria, apoplastos y peroxisomas; el ciclo glutatión peroxidasa y la catalasa en peroxisomas (Fig. 6). El mecanismo no enzimático está compuesto por moléculas antioxidantes dentro de la célula como glutatión y ácido

ascórbico, los cuales son cruciales para la integridad celular durante el estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004, Sharma *et al.* 2012), también tocoferoles, carotenoides y compuestos fenólicos que interactúan con numerosos componentes celulares siendo inclusive cofactores enzimáticos.

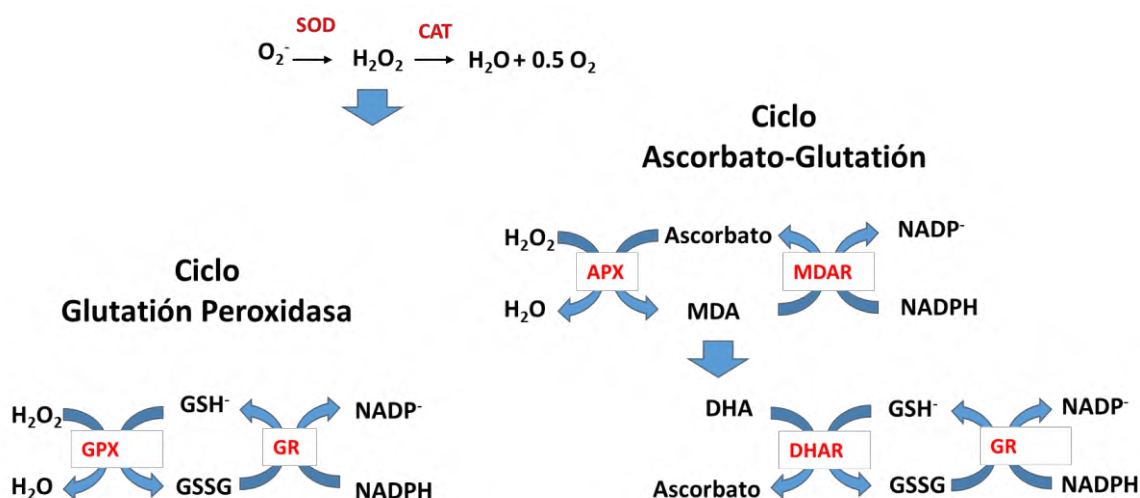


Figura 6. Mecanismo enzimático de detoxificación. En la figura, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), Ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), monodehidroascorbato reductasa (MDAR), monodehidroascorbato (MDA), dehidroascorbato (DHA), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG). (Wojtaszecz, 1997)

La enzima CAT fue la primera en ser descubierta y caracterizada. Cataliza la dismutación de dos moléculas de H_2O_2 a oxígeno y agua. Tiene una alta especificidad hacia el H_2O_2 pero una actividad débil ante peróxidos orgánicos. Las plantas contienen varios tipos de enzimas que degradan H_2O_2 sin embargo, CAT no requiere de ningún cofactor. Las catalasas se presentan rápidamente pero tienen una afinidad menor al H_2O_2 que la APX (Scandalios *et al.*, 1997; Corpas *et al.*, 2008; Del Rio *et al.*, 2006).

La POD es una enzima que oxida preferiblemente a donadores de electrones aromáticos como el guayacol y pirogalol a expensas del H₂O₂. La POD está asociada a importantes procesos biosintéticos como la lignificación de la pared celular, biosíntesis de etileno, curación de heridas y defensa contra estreses bióticos y abióticos (Kobayashi *et al.*, 1996). Esta enzima es ampliamente aceptada como una enzima del estrés.

En el ciclo de la Ascorbato-glutati6n, el APX juega un papel esencial en el control de los niveles intracelulares de ERO. APX usa dos moléculas de AsA para reducir H₂O₂ a agua y una cantidad afín de monodehidroascorbato. El APX y diferentes de sus isoformas se encuentran en diferentes localizaciones subcelulares como el citosol, la mitocondria, etc. (Jiménez *et al.*, 1997) Esta enzima está tomada como uno de los antioxidantes más ampliamente distribuidos y su afinidad hacia el H₂O₂ es mayor que la de las CATs haciéndolo muy eficiente para su degradación bajo condiciones de estrés (Wang *et al.*, 1999).

Dejando de lado su acción destructiva las ERO también han sido descritas como mensajeros secundarios en varios procesos celulares incluyendo la tolerancia al estrés ambiental (Desikan *et al.*, 2001, Neill *et al.*, 2002). La manera de actuar de las ERO, ya sea como mensajero o molécula dañina, depende del equilibrio entre la producción de ellas y la capacidad de neutralizarlas.

El estallamiento oxidativo también es una respuesta temprana ante ataques de patógenos o tratamientos con elicitores. En muchas plantas la producción de ERO sucede en dos fases siendo la primera cerca de los 10-30 minutos (min) y una segunda después de 1-3 horas después de la elicitación (Bolwell y Wojtaszek, 1997; Zhao *et al.*, 2001).

Las ERO ejercen varios efectos en las respuestas defensivas de las plantas incluyendo reforzamiento de la pared celular, muerte celular hipersensitiva, activación de genes defensivos e inducción de compuestos defensivos. Las ERO

han demostrado en algunas plantas ser suficientes para generar una acumulación de metabolitos secundarios. La manera en la que las ERO median la inducción de la producción de metabolitos secundarios vía elicitores aún no está clara, pero se sabe que induce la expresión de muchos genes de defensa y genes biosintéticos de metabolitos secundarios como las sesquiterpeno ciclasas y la PAL. Existen estudios en los que se relaciona el estrés oxidativo a la producción de metabolitos secundarios, Yuan *et al.* (2002) relacionaron el aumento en la producción de taxol en cultivos de *Taxus chinensis* con el estrés oxidativo generado por la exposición con *F. oxysporum*. Cultivos de *Catharanthus roseus* aumentaron la producción de catarantinas acorde a un aumento en la cantidad de O₂ que también activó la enzima PAL (Xu y Dong, 2005). Ali *et al.* (2005) indujeron la respuesta del sistema antioxidante en cultivo en biorreactor de raíces de *Panax ginseng* modificando los niveles de O₂. La producción de gingenósidos se incrementó, así como la actividad antioxidante enzimática. La adición de Cu²⁺ (5-25 μM) provocó estrés oxidativo y la acumulación de saponinas en cultivos de *Panax ginseng* (Ali *et al.*, 2006). En varios cultivos como *Catharanthus roseus* (Tang *et al.*, 2009) y *Uncaria tomentosa* (Marin, 2009) la adición de peróxido de hidrógeno mejoró la producción de metabolitos secundarios. Huerta-Heredia *et al.* (2010) incrementaron la producción de alcaloides oxindol monoterpénicos y 3-α-dihidrocadambinal con la adición de H₂O₂ en raíces de *Uncaria tomentosa*, además observaron el incremento de la actividad enzimática de peroxidasas conforme aumentaban la concentración de H₂O₂. Zhang *et al.* (2013) en cultivos de raíces transformadas de *Artemisia annua* evaluaron la producción de artemisinina por la adición de nano partículas de plata (AgNP), observando que la producción incrementó en las raíces tratadas, también indujeron el estrés oxidativo y se incrementó la actividad de CAT.

4.4.1. Estudios de elicitación fúngica en *A. indica*

En cultivos *in vitro* de *A. indica* se han realizado estudios de elicitación fúngica, observando incremento en la producción del limonoide azadiractina (Cuadro 5). Sin embargo, se desconoce el efecto de la elicitación fúngica, en la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática y si está relacionada con la biosíntesis de compuestos fenólicos y limonoides en *A. indica*.

Cuadro 5. Trabajos previos de elicitación en *A. indica*

Sistema	Fuente	Elicitor fúngico	Conc.	Aumento en la producción de AZA (PE/DE)	Referencia
Cultivo en suspensión	<i>Alternataria alternata</i>	MF, EM	5 % v/v	3.0 mg g ⁻¹ P.S. /3.98 mg g ⁻¹ P.S.	Balaji <i>et al.</i> (2003)
	<i>Verticillium dahliae</i>			3.0 mg g ⁻¹ P.S. /4.43 mg g ⁻¹ P.S.	
	<i>Fusarium solani</i>			3.0 mg g ⁻¹ P.S. /7.14 mg g ⁻¹ P.S.	
Raíces transformadas	<i>Claviceps purpurea</i>	MS	7 g/L	0.16 mg g ⁻¹ P.S. /0.74 mg g ⁻¹ P.S.	Satdive <i>et al.</i> (2006)
Cultivo en suspensión	Cianobacteria derivada de <i>Anabaena sp.</i>	MS	2.65 g/L	12.88 mg g ⁻¹ P.S./58.3 mg g ⁻¹ P.S.	Devi <i>et al.</i> (2008)
Raíces transformadas	<i>Myrothecium</i>	MF	3 mg/L	3.31 mg g ⁻¹ P.S. /5.5 mg g ⁻¹ P.S.	Srivastava y Srivastava (2014)
	<i>Phoma herbarium</i>		5 mg/L	3.31 mg g ⁻¹ P.S. /5.1 mg g ⁻¹ P.S.	
	<i>Alternaria alternata</i>		3 mg/L	3.31 mg g ⁻¹ P.S. /3.8 mg g ⁻¹ P.S.	
	<i>Fusarium solani</i>		3 mg/L	3.31 mg g ⁻¹ P.S./6.55 mg g ⁻¹ P.S.	
	<i>Curvularia sp.</i>		1 mg/L	3.31 mg g ⁻¹ P.S./ 7.1 mg g ⁻¹ P.S.	
	<i>Sclerotium rolfsii</i>		1 mg/L	3.31 mg g ⁻¹ P.S./4.9 mg g ⁻¹ P.S.	

MF: medio filtrado, EM: extracto de micelio, MS: micelio suspendido, PE: previo a la elicitación, DE: posterior a la elicitación.

5. JUSTIFICACIÓN

A. indica acumula compuestos químicos con actividades biológicas tan diversas como la antiinflamatoria, hipoglucémica, antimicrobiana, biopesticida, anticancerígena entre otras; algunos de estos metabolitos son únicos y exclusivos de la especie (ej. azadiractina).

A pesar de no ser una planta muy exigente, las condiciones climáticas pueden afectar la producción y acumulación de estos compuestos en los diferentes órganos de la planta, sumado a que su síntesis es compleja. Por esa razón la producción a partir de cultivos *in vitro* y la elicitación surgen como alternativas para un mejor aprovechamiento de las sustancias contenidas en el neem. Además, los estudios con elicitores en *A. indica* realizados previamente no muestran cómo esta elicitación afecta las diferentes respuestas emprendidas por las células en forma de cambios de la respuesta antioxidante y producción de metabolitos secundarios.

La elicitación de cultivos celulares de *A. indica* constituyen una alternativa para el estudio de los factores bióticos y abióticos que influyen en la acumulación y biosíntesis de los compuestos de interés. Además, de ayudarnos a tener aproximaciones de las diferentes respuestas en las células para superar las condiciones de estrés como la activación de la maquinaria antioxidante enzimática.

6. HIPÓTESIS

La elicitación con oligosacáridos de pared celular (OPC) de *Fusarium spp.*, incrementará la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática, así como la producción de limonoides y compuestos fenólicos en callos de *A. indica*.

7. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática, así como la producción de limonoides y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *A. indica* elicitados con oligosacáridos de pared celular (OPC) de *Fusarium spp.*

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la elicitación con OPC sobre la actividad enzimática de peroxidasa, catalasa, ascorbato peroxidasa y fenil amonio liasa en callos de *A. indica*.
2. Evaluar el efecto de los OPC de *Fusarium spp.* sobre la producción de limonoides y compuestos fenólicos en callos de *A. indica*.
3. Determinar si existe relación de la respuesta antioxidante enzimática y no enzimática provocado por elicitación con OPC en cultivos celulares de *A. indica*.

9. METODOLOGÍA

9.1. Material biológico

9.1.1. Vegetal

El material biológico consistió en cultivos de callos de *A. indica* pertenecientes al Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, los cuales fueron obtenidos a partir de explantes de semillas por Cruz, 2015. Los callos se mantuvieron mediante resiembra periódica cada 20 días en frascos con 20 mL de medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962, Sigma M5519) semisólido suplementado con sacarosa (30 g/L), ácido indol butírico (IBA, 4 mg mL⁻¹), bencil aminopurina (BAP, 1 mg mL⁻¹) y pH de 5.8, utilizando como agente gelificante Phytigel (2 g/L). Las condiciones de cultivo fueron temperatura controlada a 25 ± 2°C en condiciones de oscuridad (Cruz, 2015).

9.1.2. Obtención de oligosacáridos de pared celular

La obtención los oligosacáridos de pared celular (OPC) se realizó a partir de la técnica descrita por Yu *et al.* (2001) con algunas modificaciones realizadas en el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, la cual consistió en separar el micelio del cultivo mediante filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman No. 1, el micelio se lavó 3 veces con agua destilada estéril y re-suspendió en agua destilada. Luego se centrifugó a 4000 g por 60 min; el micelio se separó del sobrenadante y se secó en la estufa a 47 °C hasta obtener peso constante. Después se trituró manualmente en mortero de porcelana, y se mezcló con acetato de etilo durante 24h a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada y se descartó el filtrado que contenía los lípidos. Los restos celulares fueron colectados y se re-suspendieron en agua destilada estéril a una concentración de 5 mg de micelio/mL. Esta suspensión fue esterilizada a 121 °C durante 40 min;

posteriormente se centrifugó a 1000 *g* por 20 min. Finalmente al sobrenadante se le determinó la concentración de azúcares totales por el método fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), utilizando glucosa como estándar, siendo de 232 μg de azúcares totales/mL.

9.2. Cinética de conocimiento del sistema

Se realizó una cinética de crecimiento y de producción de compuestos fenólicos y AZRL con el fin de conocer el comportamiento de los callos de *A. indica*. La cuantificación del crecimiento celular fue realizada mediante peso seco, tomando muestras diariamente hasta alcanzar la fase estacionaria. Estas muestras fueron utilizadas para la cuantificación de metabolitos con las técnicas que se describen en los apartados 8.4 - 8.6.

9.3. Experimentos de elicitación fúngica

La elicitación se llevó a cabo en callos de *A. indica* con 6 días de edad desde la última resiembra, previa a la producción de metabolitos y durante la fase exponencial de crecimiento. La cinética se inició inoculando 1 g de biomasa fresca en frascos gerber con 20 mL del medio de cultivo antes descrito. En el día 6 de cultivo se agregó el elicitor de OPC a dos concentraciones: 25 μg de micelio mL^{-1} (equivalente 1.16 μg de azúcares totales/mL) y 50 μg de micelio mL^{-1} (equivalente 2.32 μg de azúcares totales/mL) en condiciones estériles. Las concentraciones se realizaron acorde con los antecedentes de Yu *et al.* (2002) y Srivastava y Srivastava (2014). El control consistió en callos crecidos en medio sin elicitor fúngico a los que solo se les adicionó agua estéril. Los experimentos se realizaron por sextuplicado a fin de tener suficiente material vegetal para todas las determinaciones requeridas.

9.4. Cuantificación de la biomasa

Se pesó la biomasa fresca retirándola completamente de cada frasco y trasladándola a tubos tipo Falcón de 15 mL con peso conocido y constante. La biomasa se congeló a -20°C y se liofilizó hasta alcanzar la sequedad. El peso seco se calculó con la diferencia de pesos. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

9.5. Determinación de limonoides relacionados a azadiractina (AZRL)

Los AZRL fueron determinados siguiendo la metodología de Dai *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Se obtuvo un extracto mezclando 200 mg de callo congelado pulverizado más 1 mL de metanol. Se recuperó el sobrenadante tras centrifugar a 13,500 g por 10 min. a 10°C. A 0.7 mL de extracto se agregaron 0.2 mL de solución metanólica de vanillina (0.2 mg mL⁻¹). Se mezcló y dejó reposar a temperatura ambiente por 2 min. Después se le adicionaron 0.3 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 %), 0.7 mL de metanol y se dejó reposar por 5 min. Finalmente, la absorbancia se midió a 577 nm en una celda de cuarzo con un volumen 0.350 mL. El cálculo de la concentración de los AZRL se basó en una curva de calibración realizada con estándar de azadiractina (A7430 Sigma-Adrich).

9.6. Determinación de compuestos fenólicos totales

Se obtuvo un extracto mezclando 200 mg de callo congelado pulverizado más 1 mL de metanol. Se recuperó el sobrenadante tras centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a 4°C (Medina, 2011). Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron siguiendo el método de Shoael *et al.*, (2006). Se preparó la mezcla de reacción con 2.5 µL de muestra y 150 µL de agua desionizada. Se mezcla con 10 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 10 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 30 µL de carbonato de sodio al 20 % w/v, tras mezclarse y dejarse reposar por 10 min, se incubó a 37°C por 15 min, se incubó de nuevo a 4°C por 15

min y finalmente se midió la absorbancia a 760 nm en un lector de microplacas. El cálculo de la concentración de compuestos fenólicos se basó en una curva de calibración utilizando como estándar ácido gálico (Merck 842649-0025).

9.7. Actividades enzimáticas

9.7.1. Obtención de extractos enzimáticos

El extracto enzimático se obtuvo basándose en la metodología de Yan *et al.* (2006). Se tomaron 200 mg de tejido fresco y se congeló inmediatamente con nitrógeno líquido. El tejido se pulverizó en mortero de porcelana y se agregó 0.1 % de polivinilpirrolidona (PVPP). Una vez obtenida la mezcla se agrega 500 µL de solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 50 mM a diferentes pH dependiendo la actividad enzimática a determinar (Cuadro 6), además se adicionó 4mM de ditioneitol (DTT) y 2 mM de ácido etilendiamino tetra acético (EDTA). La solución amortiguadora de pH 7 contenía adicionalmente 5mM de ascorbato de sodio. Luego se centrifugó en frío a 4 C°, 10,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se recuperó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Cuadro 6. Valor de pH para los extractos enzimáticos de acuerdo a la actividad enzimática a ensayar.

Enzimas	PAL	POD	CAT	APX
pH	8.5	7.0	7.0	7.0

9.7.2. Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó usando el método de Bradford (1976). Se tomaron 20 µL de extracto enzimático y se le agregaron 480 µL de agua y 500 µL del reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad, 500-0006). Se agitó suavemente y se dejó incubar por 10 min. Se leyó la absorbancia a 595 nm en una celda de

cuarzo de 1 mL de volumen. El blanco consistió en todos los reactivos excepto el extracto enzimático. Se elaboró una curva patrón con suero con albúmina sérica bovina (BSA) de la marca Bio-Rad de concentraciones entre 200-1000 ppm disuelto en agua.

9.7.3. Actividad enzimática PAL

La actividad de la enzima PAL se basa en la reacción enzimática de la fenilalanina a ácido trans-cinámico (Figura 7). Se cuantificó siguiendo el método sugerido por Havir *et al.* (1970). Se prepararon dos soluciones, la solución (A): solución amortiguadora Tris-HCl 150 mM pH 8.5 y la solución (B): solución A con 3 mM de fenilalanina. Se mezclaron 2 mL de la solución B con 900 μ L de solución A y se agregaron 100 μ L de extracto enzimático dejándolo incubar 10 min. La absorbancia se leyó a 270 nm. La actividad de PAL se expresó como unidades/mg de proteína (U/mg de proteína).

La fórmula para calcular la actividad volumétrica es la siguiente:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml enzima}} = \frac{A_{270} \text{Test} - A_{270} \text{Blanco}}{\text{min}} \frac{(3)}{(19.73)(0.1)} \quad (3)$$

Donde:

3=volumen total del ensayo (mL)

19.73=Coeficiente de extinción milimolar del ácido trans-cinámico a 270 nm

0.1= Volumen aplicado de extracto enzimático

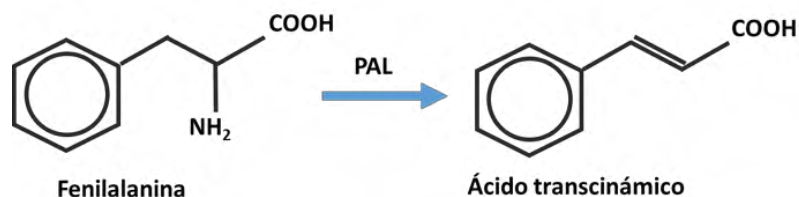


Figura 7. Mecanismo de acción de la enzima fenilalanina amonio liasa. Tomado de Havir *et al.*, 1970.

Para hacer la conversión a actividad específica se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{\frac{U}{\text{ml enzima}}}{\frac{\text{mg de proteína}}{\text{ml}}}$$

9.7.4. Actividad enzimática POD

La actividad de la enzima POD se basa en la reacción enzimática en la que el guayacol se oxida a tetra guayacol (Figura 8). Se cuantificó siguiendo el método sugerido por Kochba *et al.* (1977). Un mL de la solución de reacción contuvo 0.56 μL de guayacol, 0.228 μL H_2O_2 al 50 % en solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM pH 6.0, después se adicionaron 5 μL de extracto enzimático. Se midió el cambio de absorbancia a 470 nm tras un minuto. La absorbancia se leyó a 470 nm a un tiempo de 3 min en una celda de cuarzo de 1 mL de volumen. La actividad específica de la peroxidasa se expresa como unidades/mg de proteína. Una unidad de actividad de POD está definida como el cambio de absorbancia de 0.01 unidad sobre minuto.

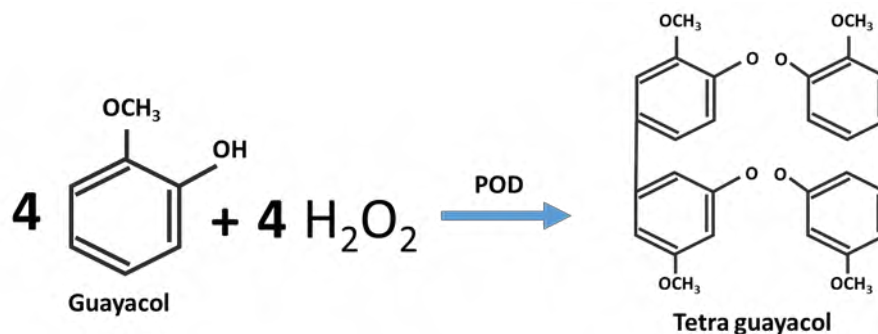


Figura 8. Mecanismo de acción de la enzima guayacol peroxidasa. Tomado de Cárdenas, 2013.

9.7.5. Actividad enzimática CAT

La actividad de la enzima CAT se cuantificó siguiendo el método reportado por Aebi (1984). Se basa en la degradación del peróxido de hidrogeno por acción de la catalasa. La mezcla de reacción consistió en una mezcla de solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM pH 7.0, 15 mM H₂O₂, 50 µL de extracto enzimático. La actividad de la catalasa se determinó por el consumo de H₂O₂ leyendo la absorbancia a 240 nm en una celda de cuarzo de 1 mL de volumen a los 30 s. La actividad de CAT se expresa como unidades/mg de proteína.

La fórmula para calcular la actividad volumétrica es la siguiente:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml}} = \frac{A_{270} \text{Test} - A_{270} \text{Blanco}}{\text{min}} \quad (1)$$
$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml}} = \frac{\phantom{A_{270} \text{Test} - A_{270} \text{Blanco}}}{(39.4) (0.025)}$$

Donde:

1=volumen total del ensayo (mL)

39.4=Coefficiente de extinción milimolar del peróxido de hidrogeno a 240 nm

0.025= Volumen aplicado de extracto enzimático en mililitros

9.7.6. Actividad enzimática del APX

La actividad de la enzima Ascorbato peroxidasa (Figura 9) se cuantificó siguiendo la metodología sugerida por Nakano y Asada (1981). La mezcla de reacción consistió en una solución amortiguadora fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, 0.5 mM de ascorbato, 0.1 mM de H₂O₂ y 0.1 mM de EDTA. La reacción inició al agregar el extracto enzimático, después se leyó a una longitud de onda de 290 nm en una celda de cuarzo de 1 mL de volumen. La actividad de APX se expresó como unidades/mg de proteína.

La fórmula para calcular la actividad volumétrica es la siguiente:

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{ml}} = \frac{A_{270}\text{Blanco} - A_{270}\text{Test}}{\text{min}} (1)$$

(2.8) (0.02)

Donde:

1= volumen total del ensayo (mL)

2.8= Coeficiente de extinción milimolar del monodehidroascorbato a 290 nm

0.02= Volumen aplicado de extracto enzimático en mililitros

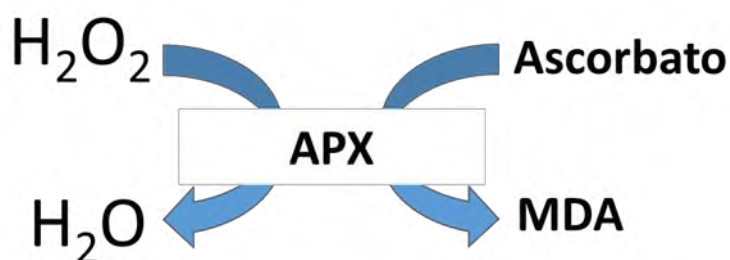


Figura 9. Mecanismo de acción de la ascorbato peroxidasa, perteneciente al ciclo del ascorbato-glutation. Adaptado de Wojtaszek, 1997

9.8. Análisis de datos

Se realizaron diseños de bloques al azar para evaluar la diferencia entre tratamientos y pruebas de medias por el método Tukey con un 95 % de confiabilidad para los datos obtenidos durante la elicitación. El análisis de datos se realizó con el programa Minitab® 16.1.0

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. Cinéticas de crecimiento y producción de metabolitos en callos de *A. indica*.

En la figura 10 se muestran las cinéticas de crecimiento, producción de AZRL y compuestos fenólicos en callos de *A. indica*. El valor máximo de biomasa fue de 226.3 mg en peso seco (P.S.) a los 14 días donde comienza la fase estacionaria de crecimiento (10A). La velocidad específica de crecimiento fue de 0.0849 d⁻¹. La producción máxima de compuestos fenólicos se alcanzó a los 7 días con un valor de 4707.50 µg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g de P.S. Mientras que la máxima producción de AZRL se alcanzó a los 9 días con 1321.421 µg AZRL/ g P.S. (10B).

El crecimiento obtenido en la cinética coincide con el trabajo de Cruz (2015) en donde la biomasa alcanzada a los 14 días fue de ≈300 mg P.S. La producción de AZRL en los callos de *A. indica* de este trabajo fueron mayores en un 61 %, debido probablemente al mantenimiento de la línea productora de AZRL. El contenido de AZRL en otros trabajos con cultivos y fitoreguladores semejantes fue de 7 µg/g P.S., 0.5 µg/g P.S., 23 µg/g P.S. según los estudios de Allan *et al.* (1994), Schaaf *et al.* (2000) y Prakash *et al.* (2005) respectivamente. Todas ellas menores a lo producido en el actual trabajo, posiblemente por la naturaleza del explante y/o la antigüedad de la línea.

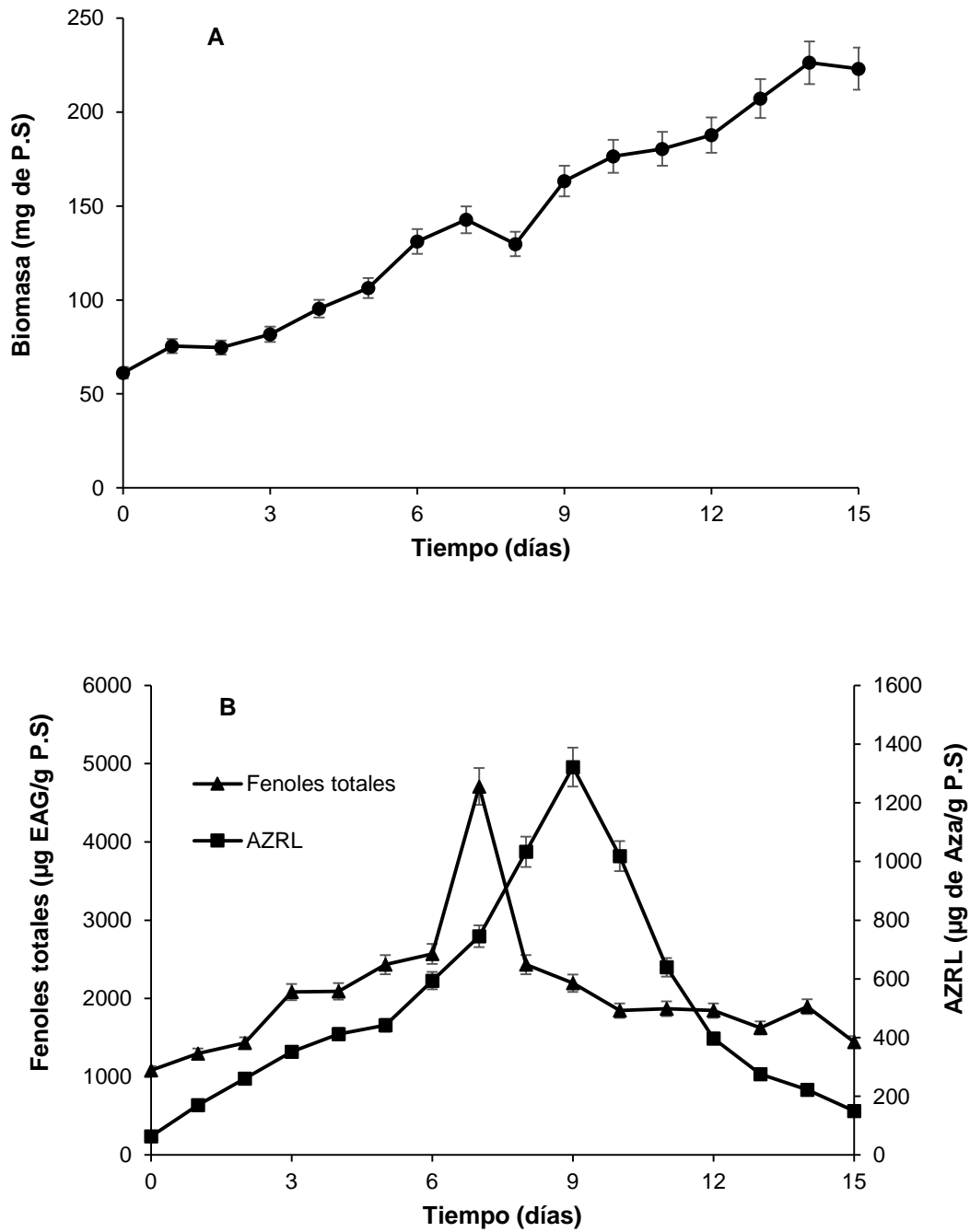


Figura 10. Cinética de crecimiento, producción de AZRL y compuestos fenólicos en callos de *A. indica*. **A.** Biomasa. **B.** Producción de compuestos fenólicos y AZRL.

10.2. Cinética de elicitación fúngica en callos de *A. indica*

10.2.1. Efecto de la elicitación sobre el crecimiento

En la figura 11 se observa el efecto de la aplicación de dos concentraciones de elicitor y el tiempo de exposición en el crecimiento. Durante las primeras 12 h no se observó diferencia significativa entre los tratamientos. A partir de las 36 h los valores del control y el tratamiento con 1.16 μg de OPC mL^{-1} se mantienen semejantes, mientras que el tratamiento con 2.32 μg de OPC mL^{-1} tiene valores inferiores. A las 216 h de cinética, se observa en el control un valor máximo de crecimiento de 303.45 mg. P.S mientras que con 1.16 y 2.32 μg de OPC mL^{-1} el crecimiento disminuyó 13.24 y 15.49 %. Además, no se observó diferencia entre la apariencia o el color de los callos elicitados y los controles por efecto de la dosis y el tiempo de exposición (Figura 12).

Este comportamiento ha sido previamente observado en cultivos de células de *Taxus chinensis*, que al incrementar la dosis del elicitor fúngico (10-80 mg/L) disminuyó el crecimiento de las células, reportando que con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ homogenizado fúngico se redujo el crecimiento hasta en un 15 % con respecto al control (Wang *et al.*, 2001). Sudha y Ravishankar (2003) reportaron que la elicitación con micelio de *A. niger* (M, 5 % p/v) y el medio filtrado (MF, 5 % v/v) en callos de *Daucus carota* redujo el crecimiento de los mismos. Los cultivos elicitados con EM obtuvieron 3.51 g/frasco mientras que para MF fue de 3.31 g/frasco, inferior a los cultivos control (4.07 g/frasco). Por otro lado, la elicitación con homogenizado fúngico de *A. niger* y *A. flavus* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de células en suspensión de *Morinda elliptica* disminuyó en un 45 y 52 % respectivamente, el crecimiento comparado con las células no elicitadas (Chong *et al.*, 2005). En cultivo de callos de *Zingiber officinale*, el uso de elicitores como el extracto de levadura y *A. niger* a las concentraciones de 250, 500 and 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ redujo en 63.5, 56.7, 40.4 y 16, 58.8, 38 % respectivamente, el crecimiento de los callos con respecto al control (El-Nabarawy *et al.*, 2015). Los resultados de Srivastava y Srivastava en 2014

mostraron que los cultivos de raíces transformadas de *A. indica* elicitados con micelio a una concentración de 1 % v/v de *Phoma herbarium*, *Alternaria alternata*, *Myrothecium sp.*, *Curvularia lunata* y *Sclerotium rolfsii*, provocaron una disminución en la biomasa de 41, 3.75, 51.12, 41.35, 9.02 % respectivamente, comparado con el control. Únicamente la elicitación con *Fusarium solani* provocó un aumento del 3.75 %. Esta disminución generalizada en el crecimiento podría tener dos significados: un cambio del metabolismo primario hacia el metabolismo secundario por efecto del uso de elicitores en cultivos vegetales (Chong *et al.*, 2005). También la producción de ciertas moléculas defensivas, como las fitoalexinas, pueden inhibir el crecimiento (Srivastava y Srivastava, 2014).

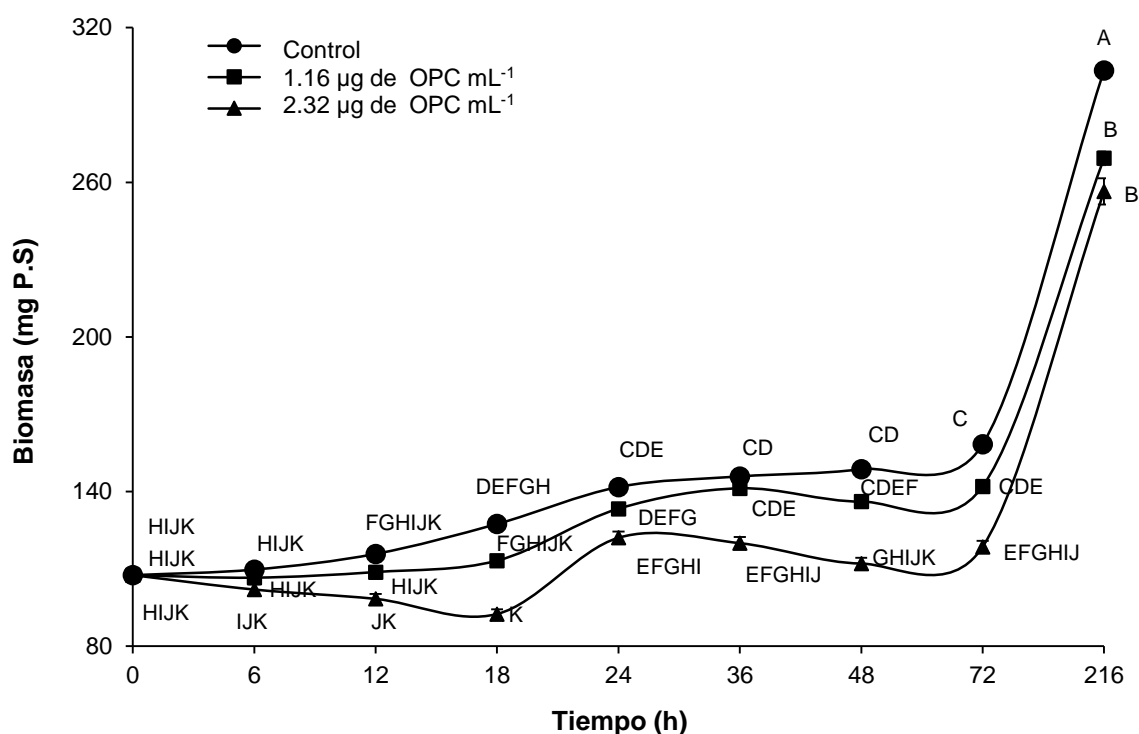


Figura 11. Cinética de crecimiento de callos bajo condiciones de elicitación fúngica. Cultivos control (●), cultivos elicitados con 1.16 µg de OPC mL⁻¹ (25 µg de micelio mL⁻¹) (■) y 2.32 µg de OPC mL⁻¹ (50 µg de micelio mL⁻¹) (▲). Los valores que no comparten alguna letra son estadísticamente diferentes.

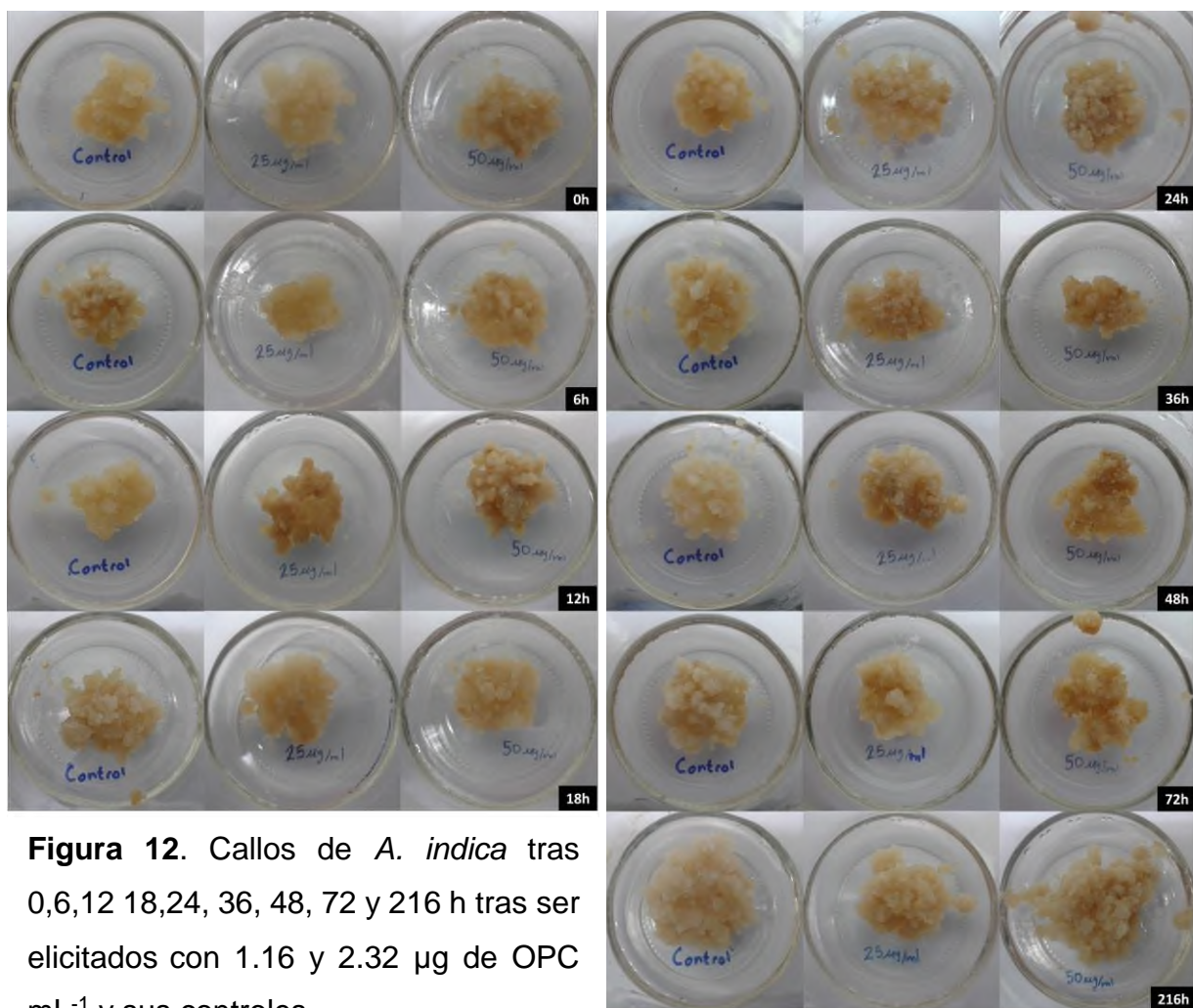


Figura 12. Callos de *A. indica* tras 0,6,12 18,24, 36, 48, 72 y 216 h tras ser elicitados con 1.16 y 2.32 μg de OPC mL^{-1} y sus controles.

10.2.2. Efecto de la elicitación en la producción de fenoles totales y AZRL

En la Fig. 13 se observa la cinética de producción de fenoles totales con las dos concentraciones de *Fusarium spp.*, donde el valor máximo de producción de los callos de *A. indica* fue de $\approx 4770 \mu\text{g EAG/ g P.S.}$ de extracto a las 24h de cinética donde no hay diferencia significativa debido al tratamiento. Este valor es bajo comparado con el contenido de compuestos fenólicos reportados en otras investigaciones y puede ser debido a la naturaleza del tejido no al efecto directo de la elicitación o la situación de estrés. Sultana *et al.* (2007, 2009) obtuvo 0.12, 0.93 y 0.96 g EAG/ g P.S. en la corteza de *A. indica* al extraerlos con 80 % etanol, 80

%metanol y 80 % acetona, respectivamente. Hossain *et al.* (2014) obtuvieron rendimientos altos de compuestos fenólicos (0.24 g EAG/g P.S.) en raíces de *A. indica*. Naseer *et al.* (2014) obtuvo 0.176, 0.104, 0.106 g EAG/ g P.S. en hojas, semillas y corteza de *A. indica*. Existen pocas investigaciones que reportan el contenido de compuestos fenólicos en *A. indica*, a pesar de que muchas reportan su actividad antioxidante (Nahak *et al.*, 2010; Sithisarn *et al.*, 2005; Manikandan *et al.*, 2009; Pokhrel *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2016). Sin embargo, no existen estudios previos en *A. indica* donde se relacione su producción bajo condiciones de estrés.

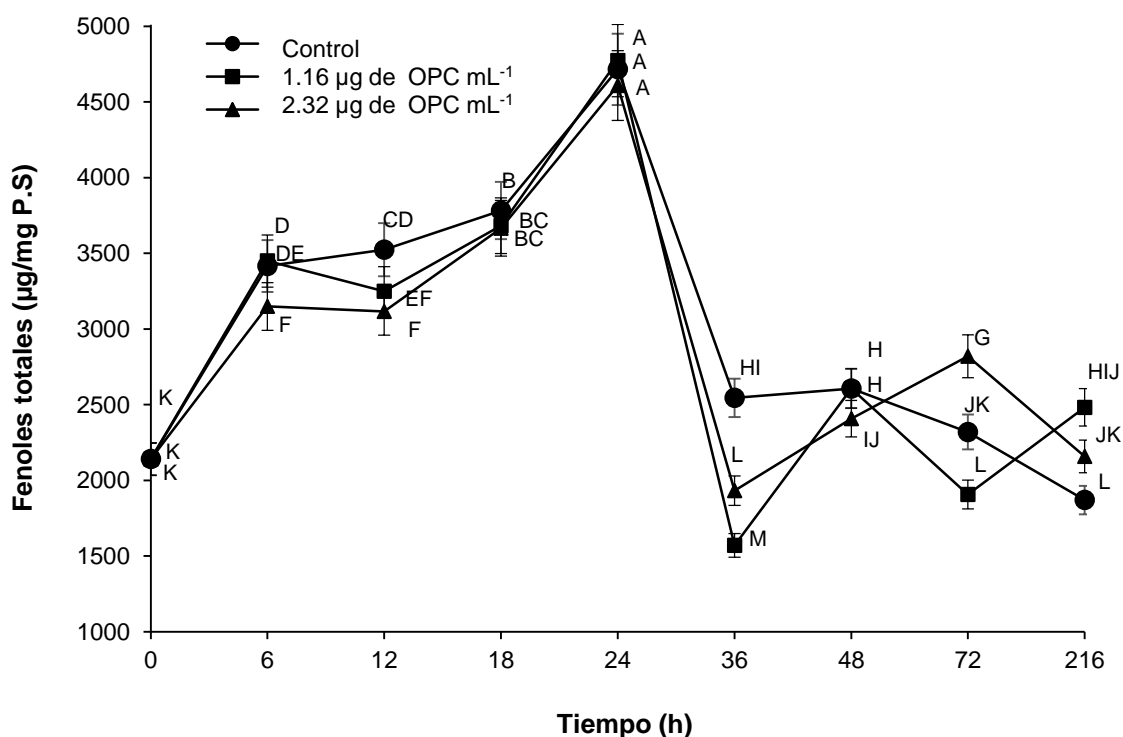


Figura 13. Cinética de producción de fenoles totales en callos de *A. indica* bajo elicitación fúngica. Cultivos control (●), cultivos elicitados con 1.16 µg de OPC mL⁻¹ (25 µg de micelio mL⁻¹) (■) y 2.32 µg de OPC mL⁻¹ (50 µg de micelio mL⁻¹) (▲)

La producción de AZRL se incrementó alrededor del 16 % después de 6 h de elicitación con 1.16 µg de OPC mL⁻¹ y siendo estadísticamente diferente con respecto al control (743.4 µg Aza/mg P.S); este aumento se mantuvo constante hasta las 24 h (Figura 14). Después de 72h de exposición al elicitor los cultivos

tratados con $1.16 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} incrementaron la acumulación de AZRL en un 49 % con respecto al máximo del control ($1327.88 \mu\text{g Aza}/\text{mg P.S.}$). Mientras que para el tratamiento con $2.32 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} los valores de concentración se mantuvieron en un valor entre el control y el tratamiento con $1.16 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} durante las primeras 48 h, el mayor incremento de AZRL se alcanzó hasta las 216h con un 12.3 % más que el máximo del control.

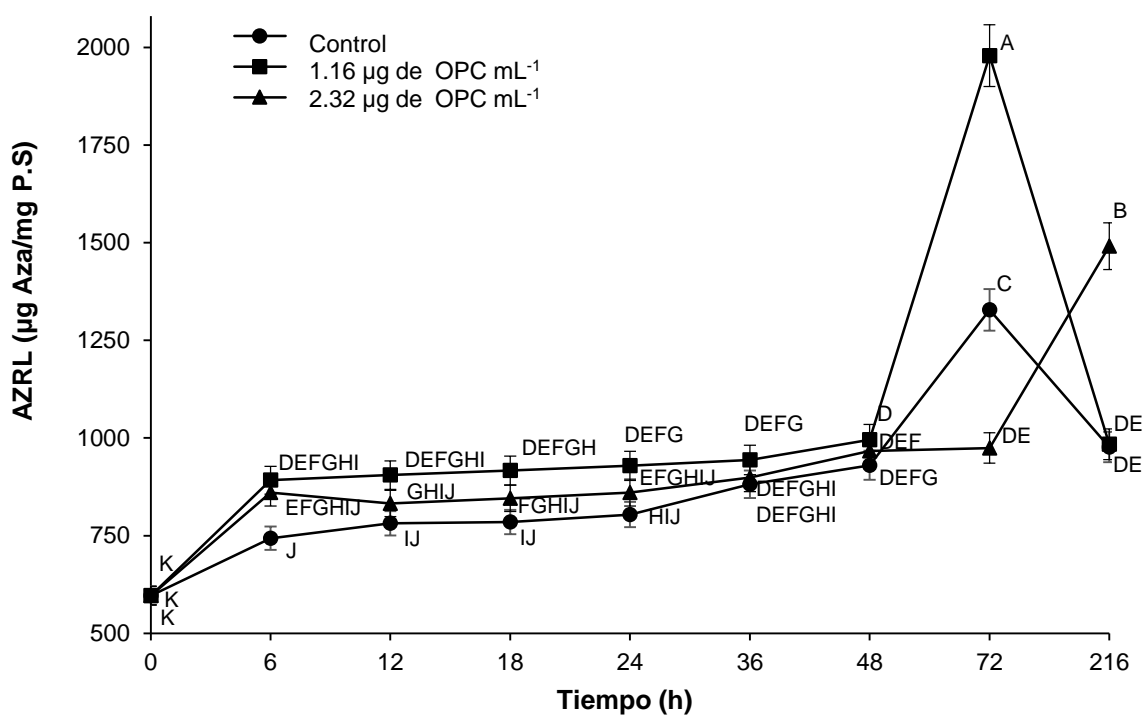


Figura 14. Cinética de acumulación de AZRL en callos de *A indica* bajo elicitación fúngica. Cultivos control (●), cultivos elicitados con $1.16 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} ($25 \mu\text{g}$ de micelio mL^{-1}) (■) y $2.32 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} ($50 \mu\text{g}$ de micelio mL^{-1}) (▲)

En *A. indica*, son escasos los reportes realizados de cultivos *in vitro* bajo condiciones de elicitación. Balaji *et al.* (2003), realizaron la elicitación de cultivos de células en suspensión de *A. indica* utilizando 1 y 5 % p/p de homogenizado (HF) y medio filtrado (MF) de *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* y *Verticillium dahliae*. No se observó incremento en la producción azaridactina utilizando los diferentes HF o MF de los hongos utilizados, excepto HF de *F. solani* que incrementó 2 veces la

producción del metabolito sobre el control (2.4 ± 0.56 mg/L). Satdive *et al*, (2006), utilizando cultivos de raíces transformadas de *A. indica* y homogenizados de *Claviceps purpurea* incrementaron 0.074 % (p/p) la producción de azaridactina, 5 veces más que los cultivos control. Srivastava y Srivastava (2014), utilizando diferentes elicitores fúngicos como *Phoma herbarium*, *Alternaria alternata*, *Myrothecium sp.*, *Fusarium solani*, *C. lunata*, y *Sclerotium rolfsii* incrementaron la producción de azadiractina. Al adicionar 1 % v/v de *C. lunata*, obteniendo 7mg/g P.S. como la máxima producción alcanzada bajo el régimen de elicitación fúngica.

10.2.3. Efecto de la respuesta enzimática relacionada a PAL

Una vez obtenidos los resultados del contenido de proteína en cada muestra se realizaron las pruebas enzimáticas conforme a lo descrito en la sección 8.7.3.

En la Figura 15 se observan los resultados de actividad de la enzima PAL. El control no presenta cambios, siendo la mayoría de sus valores muy semejantes (~ 0.024 U/mg proteína); excepto por un pico de actividad a las 36h (0.028 U/mg proteína). El tratamiento con $1.16 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} tiene dos valores bajos de 0.016 y 0.0208 U/mg de proteína a las 24h y 36h, los demás valores se mantienen en promedio en un valor de 0.025 U/mg proteína. El tratamiento con $2.32 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} tiene tres picos a las 6h (0.027 U/mg proteína), 18h (0.029 U/mg proteína) y 36h (0.032 U/mg proteína); los demás datos tienen un valor promedio de 0.021 U/mg proteína.

Todos los tratamientos presentan al menos un pico de actividad antes de las 24h, que es cuando sucedieron los picos máximos de producción de compuestos fenólicos y también presentan valores bajos a las 24h respecto a sus medias. Las variaciones en los valores de actividad de PAL pueden ser causadas por el corto tiempo en que fueron tomadas las muestras.

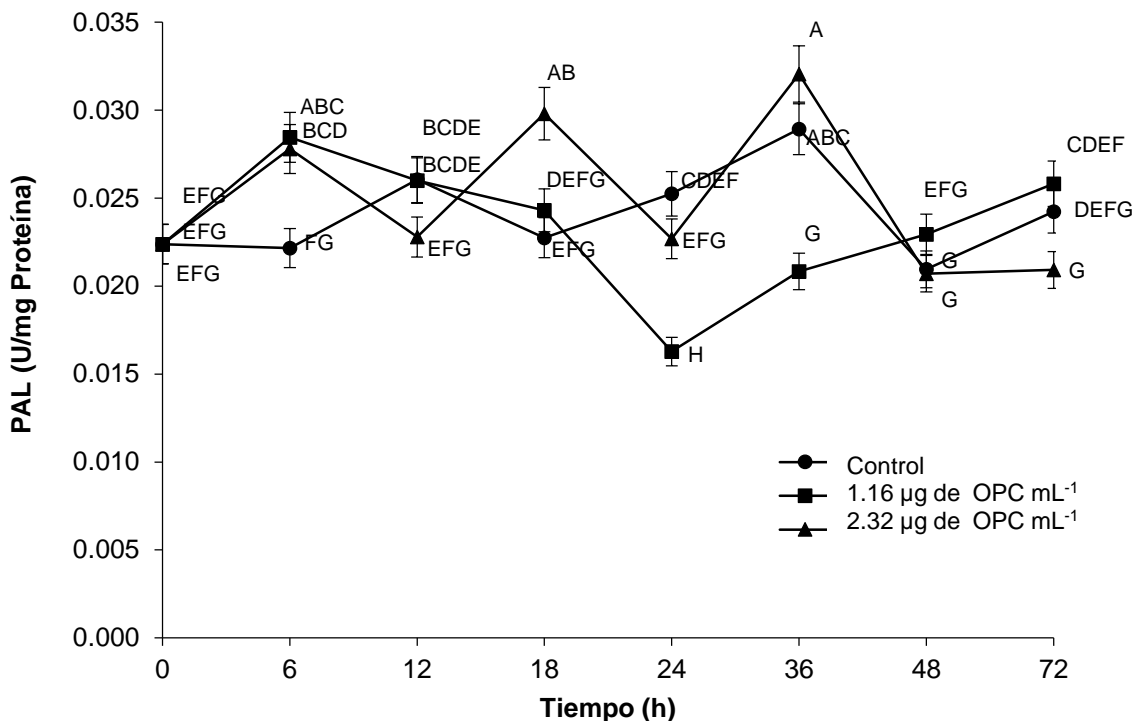


Figura 15. Cinética de actividad enzimática PAL en cultivos elicitados de callos de *A. indica*. Cultivos control (●), cultivos elicitados con 1.16 µg de OPC mL⁻¹ (25 µg de micelio mL⁻¹) (■) y 2.32 µg de OPC mL⁻¹ (50 µg de micelio mL⁻¹) (▲)

Diversos estudios han demostrado la relación directa que existe entre la actividad de PAL con la acumulación de compuestos fenólicos, siendo una enzima importante en su ruta de biosíntesis. Bahabadi *et al.* (2011, 2012) detectaron un aumento en la expresión del gen que codifica para PAL en cultivos elicitados con *F. gramineum* que producían una alta concentración de lignanos y podofilotoxinas. Los estudios hechos por Baldi *et al.* (2008) demuestran que el nivel de actividad de PAL determina la concentración de podofilotoxinas y sus derivados. También la investigación realizada por Simic *et al.* (2015) relacionó la actividad de PAL con la acumulación de compuestos fenilpropanoides (compuestos fenólicos, flavonoides, flavonoles)

En este estudio, no se detectó aumento de la actividad en la enzima PAL en ninguno de los tratamientos y el control, lo cual estuvo relacionado a lo observado en la

producción de fenoles (Fig. 13). Al no aumentar la actividad de PAL podría verse afectada la producción de otros compuestos como los flavonoides que han sido encontrados en *A. indica*, tales como dihidrochalcona, taninos, flavanonas y otros compuestos como cumarinas (Biswas *et al.*, 2002; Nakahara *et al.*, 2003). Este comportamiento podría significar que los callos elicitados de *A. indica* no se valen de compuestos fenólicos para contrarrestar los efectos de especies oxidantes sin tener que activar ninguna de las vías mostradas en la Figura 16.

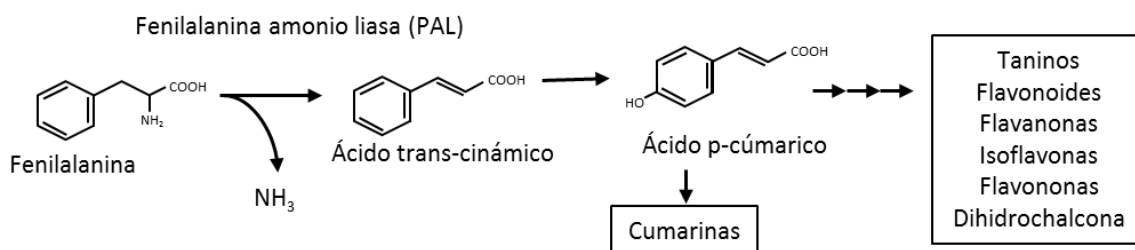


Figura 16. Compuestos derivados de la actividad de PAL en *A. indica*

10.2.4. Efecto de la elicitación en la respuesta antioxidante enzimática

En la figura 17 se muestran los valores de actividad específica de CAT, POD y APX. La actividad de CAT muestra diferencia entre los tratamientos (Figura 17 A). La actividad en el control fue semejante en toda a cinética con un valor promedio de ~ 5.62 U/mg proteína. En los callos tratados con $1.16 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} los niveles de actividad incrementan a las 18h, encontrando su máximo a las 36h (21.8 U/mg proteína) para luego descender. El tratamiento con $2.32 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} presenta dos picos de actividad, el primero a las 18h (19.1 U/mg proteína) y el máximo a las 36h (28.6 U/mg proteína).

La actividad de la enzima POD fue la más alta del mecanismo antioxidante enzimático y se vuelve a presentar el comportamiento bifásico de actividad, que posiblemente sirvió para contrarrestar la producción de ERO (Figura 17 B). El control tiene una actividad semejante durante toda la cinética (~ 20604 U/mg

proteína, en promedio). El tratamiento con $1.16 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} muestra un aumento desde las 18h y alcanza su máximo hasta las 36h (79261 U/mg proteína). El tratamiento con $2.32 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} tiene un primer pico a las 18h (193359 U/mg proteína) y uno máximo a las 36h (365037 U/mg proteína).

En la Figura 17 C se puede apreciar el comportamiento de la enzima APX a lo largo de la cinética. El control mantiene valores semejantes desde las 0 hasta las 12h (~ 9.27 U/mg proteína) que van disminuyendo hasta alcanzar su mínimo a las 72h (0.053 U/mg proteína). El tratamiento con $1.16 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} muestra un valor mínimo a las 12h (1.42 U/mg proteína) y un incremento a las 36h (14.51 U/mg proteína), los demás valores mantienen valores semejantes con un promedio de actividad de 7.22 U/mg proteína. La actividad en el tratamiento con $2.32 \mu\text{g}$ de OPC mL^{-1} empezó a aumentar a las 24h (32.60 U/mg proteína) alcanzando el máximo a las 36h (82.79 U/mg proteína).

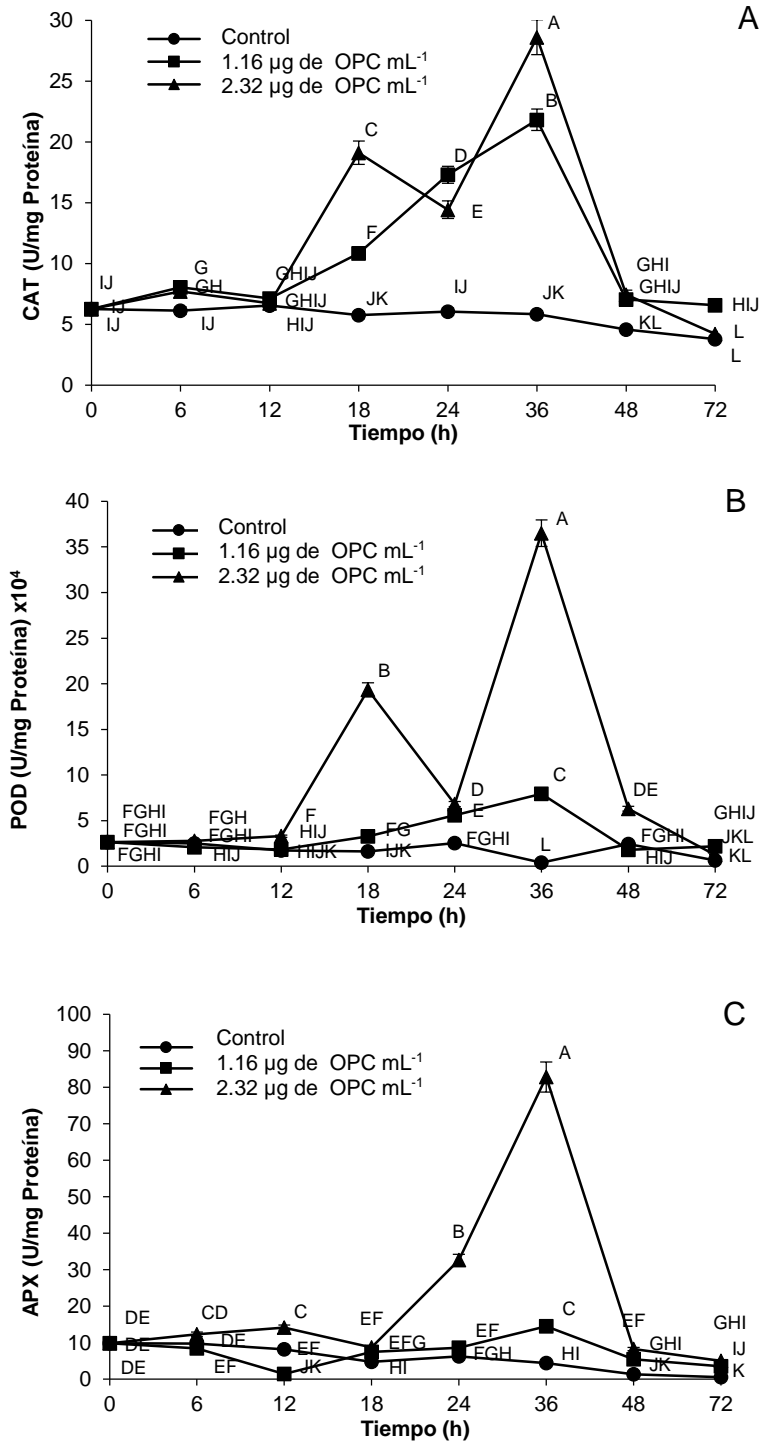


Figura 17. Cinética de actividad enzimática de las enzimas CAT (A), POD (B) y APX (C) en cultivos elicitados de callos de *A. indica*. Cultivos control (●), cultivos elicitados con $1.16 \mu\text{g de OPC mL}^{-1}$ (■) y $2.32 \mu\text{g de OPC mL}^{-1}$ (▲)

El aumento en la actividad de varias enzimas del mecanismo antioxidante ha sido detectado anteriormente en procesos de elicitación fúngica. Gao *et al.* (2011) elicitaron cultivos en suspensión de *Euphorbia perkinensis* con *Fusarium sp.* y detectaron un aumento de 166 % en la actividad de CAT y de 1003 % en la actividad de POD, desde el segundo día y a las 36 h, respectivamente con respecto al control. Por otro lado, en cultivos en suspensión de *Hypericum perforatum* elicitados con *Fusarium oxysporum*, *Phoma exigua* y *Botrytis cinerea* condujeron a un aumento en la actividad de CAT y de POD. En este estudio POD fue la principal enzima encargada de la detoxificación de ERO aumentando desde el primer día hasta en un 37.5 % respecto al control. CAT se presentó de forma tardía sin aumento significativo sino hasta el séptimo día después de la exposición a los elicitors (Simic *et al.*, 2015). Morkunas *et al.* (2007) observaron un aumento de hasta el 33 % en la actividad de peroxidasas y un aumento de la actividad de APX citosólica comparadas con el control en embriones de *Lupinus luteus* elicitados con *Fusarium oxysporum*. La actividad de las enzimas antioxidantes de los estudios mencionados está relacionada a las respuestas defensivas de los cultivos.

La actividad de CAT y POD (Fig. 17 A, B) en la presente investigación evidencia la presencia de H₂O₂ en los cultivos elicitados de *A. indica*. Los cultivos tratados con 2.32 µg de OPC mL⁻¹ presentaron un comportamiento bifásico con dos picos de actividad en las enzimas CAT y POD a las 18 y 36 horas después de la exposición. Esta conducta se presentó probablemente como una respuesta al comportamiento bifásico de la producción de especies reactivas de oxígeno, donde el primer pico sucede después de la adición del elicitor de forma no específica y el segundo es una respuesta determinada por el reconocimiento del patógeno. Este comportamiento es característico ante el ataque de patógenos incompatibles (Dat *et al.*, 2000; Wojtaszek, 1997; Apel y Hirt, 2004).

La actividad de APX (Fig. 17 C) en el tratamiento con 1.16 µg de OPC mL⁻¹ tuvo un aumento mínimo, probablemente el nivel de estrés oxidativo no fue tan alto y no fue

necesario activar otro mecanismo para encargarse de las ERO, esta afirmación se basa en el comportamiento mostrado por las enzimas POD y CAT a la misma concentración. La actividad de APX fue mayor al aplicar 2.32 μg de OPC mL^{-1} activando también las otras enzimas del mecanismo antioxidante enzimático, por tanto con un mayor estado de estrés oxidativo. APX es un componente central del ciclo del ascorbato-glutatión, su aumento refleja la activación del mismo y que estas dos moléculas forman parte de la maquinaria antioxidante no enzimática en callos de *A. indica*.

Su actividad también tiene relación con la adquisición de resistencia sistémica que conduce a la producción de metabolitos secundarios con carácter defensivo (Gechev *et al.*, 2003), como el incremento de AZRL que tienen actividad comprobada contra organismos patógenos (Dubey y Kumar, 2003; Xingli, 2006; Shaker y Darwish, 2005; Srivastava y Singh, 2009; Barsagade y Wagh, 2010; Park *et al.*, 2014).

El comportamiento de los callos de *A. indica* puede resumirse en el siguiente esquema (Figura 18). La actividad enzimática antioxidante aumentó al ser tratada con OPC de *Fusarium spp.* en comparación con el control, eso está de acuerdo con lo demostrado en estudios previos durante el ataque de hongos hacia plantas (Polkowska-Kowalczyk *et al.*, 2007; Nowogórska y Patykowski, 2015). Los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes en cada tratamiento sugieren que el estado de estrés oxidativo generado con 2.32 μg de OPC mL^{-1} es más alto que el generado en el tratamiento con 1.16 μg de OPC mL^{-1} , probablemente por una mayor formación de ERO. Las ERO pudieron haber servido como señales para la activación de genes defensivos para la producción de metabolitos secundarios, como limonoides, sin afectar la actividad de PAL y en consecuencia no hubo un aumento en la producción de compuestos fenólicos. Según los datos reportados por Cruz (2015) los callos de *A. indica* acumulan el limonoide azadiractina mayoritariamente, también podríamos suponer que se produjeron otros limonoides como nimbina o gedunina debido a sus cualidades antifúngicas, dada la naturaleza

del elicitor y algunos análogos o derivados de la azadiractina (azadiractol, 11-demetoxicarbonil, 3-deacetil-3-cinnamoil, 3-tigtol azadiractina).

Los altos niveles de ERO generados durante la elicitación podrían explicar también el retraso y el menor nivel de la producción de AZRL en los callos tratados con 2.32 μg de OPC mL^{-1} . La situación pudo haber provocado que el cultivo diera prioridad a sobrevivir y superar la situación de estrés oxidativo que podría llevarla a la muerte, y por tanto, retrasar la producción de metabolitos secundarios acorde con el comportamiento adaptativo de las plantas ante una situación de estrés (Lichtenthaler, 1998). Yu *et al.*, (2002) detectaron una concentración de taxol de ≈ 6 mg/L (500 % respecto al control) en cultivos en suspensión de *Taxus chinensis* al ser elicitados con 100 mg/L de elicitor fúngico, sin embargo al aumentar la concentración hasta 200 mg/L de elicitor la concentración de taxol disminuyó hasta 3.2 mg/L. Esta disminución coincidió con un aumento de casi el 30 % en la concentración de peróxido de hidrogeno respecto al elicitado con 100 mg/L. Los trabajos en los que se relacionan los niveles de ERO con la producción de metabolitos son escasos pero en las investigaciones de Srivastava y Srivastava (2014) sucedió algo similar que en el caso anterior. La producción de azadiractina en raíces transformadas elicitadas con 5 % v/v de *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Curvularia lunata* y *Sclerotium rolfsii* disminuyó en 52, 35, 76 y 77 %, respectivamente, en comparación a cuando fueron elicitadas con 1 % v/v. Esto significa que un exceso en la concentración de elicitor puede llevar a daños en el tejido que podrían derivar en una mayor situación de estrés, mayor concentración de ERO, menor acumulación de metabolitos y en casos extremos la muerte.

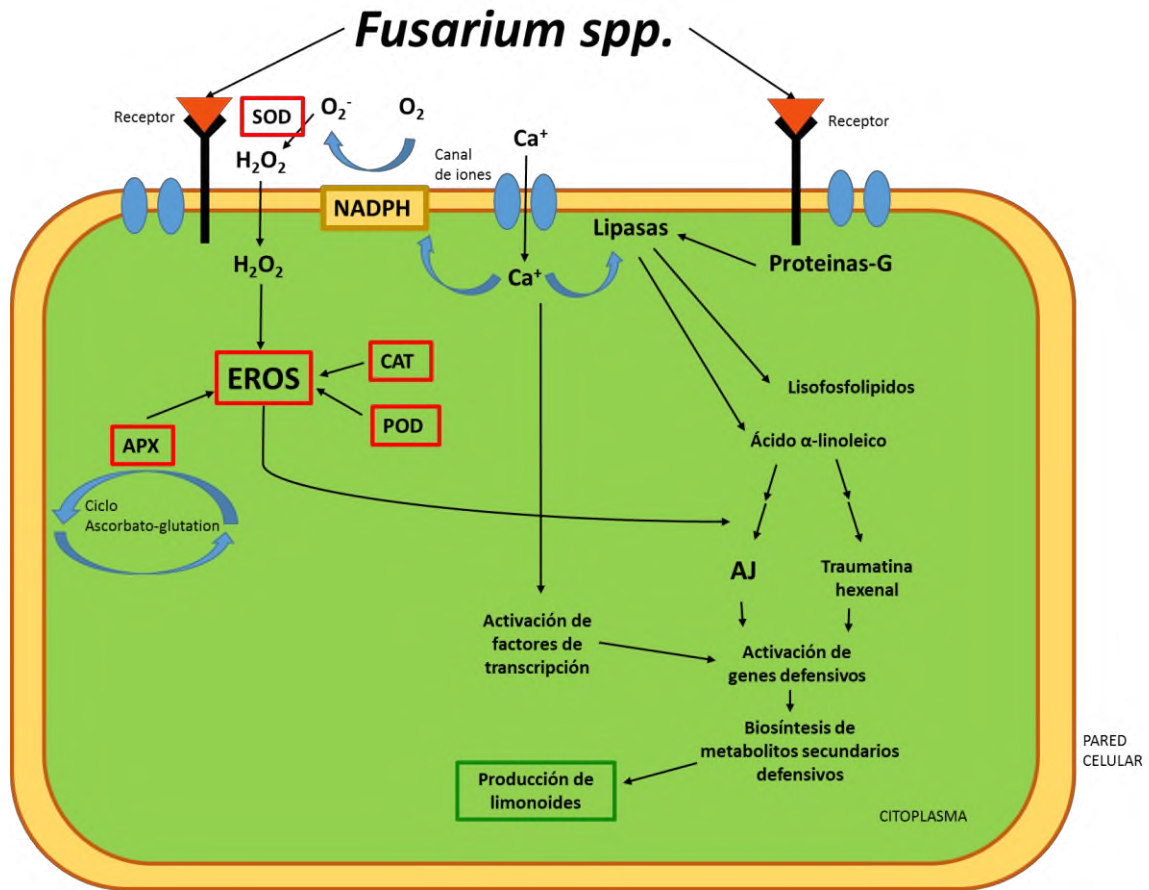


Figura 18. Esquema sugerido de la señalización en callos de *A. indica* durante la elicitación con *Fusarium spp.*

11. CONCLUSIONES

La biosíntesis de AZRL en callos de *A. indica* fue estimulada por elicitación biótica (*Fusarium spp*), además es dependiente de la dosis y el tiempo de exposición al elicitor.

La elicitación con OPC de *Fusarium spp.* no promueve la actividad de la enzima PAL y en consecuencia la producción de compuestos fenólicos.

La elicitación con OPC de *Fusarium spp.* activó la respuesta antioxidante enzimática en los callos de *A. indica*, aumentando la actividad específica de POD, CAT y APX. Esto puso en evidencia el estallamiento oxidativo dentro de las células.

11. RECOMENDACIONES

Caracterizar los OPC obtenidos a partir de *Fusarium spp.* para su posterior uso y así determinar cuál o cuáles son reconocidos por los receptores celulares.

Identificar los limonoides producidos mayoritariamente en callos de *A. indica* elicitados con OPC de *Fusarium spp.*

Usar agentes para bloquear el estallamiento oxidativo durante la elicitación para validar la participación de éste dentro de los mecanismos de señalización involucrados en la biosíntesis de AZRL.

Se sugiere también el monitoreo del H₂O₂ como una forma directa de medir la producción de ERO y relacionarlo con el comportamiento del mecanismo antioxidante enzimático (POD, CAT).

Utilizar otro tipo de elicitores de tipo biótico en callos de *A. indica* para comparar las respuestas generadas.

Involucrar la expresión de algunos genes relacionados con la ruta de biosíntesis con el incremento en la producción de AZRL.

12. REFERENCIAS

- Abraham, T.; Devaki, N.; Kuruvilla, T. and Joseph, J. (2005). Production of peroxidase from plant cell and callus cultures. International Application published under the Patent Cooperation Treaty. Patent No. WO 2005/116196, PCT/IB2005/001421.
- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, 105: 121-126.
- Aharoni, A., Jongsma, M. A., Bowmeester, H. J. (2005), Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants, Trends Plant Science, 10: 594-562.
- Ahmed, S. A., and Baig, M. M. V. (2014). Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. Saudi Journal of Biological Sciences, 21(5): 499-504.
- Akihisa, T., Takahashi, A., Kikuchi, T., Takagi, M., Watanabe, K., Fukatsu, M. and Yasukawa, K. (2011). The melanogenesis-inhibitory, anti-inflammatory, and chemopreventive effects of limonoids in n-hexane extract of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) seeds. Journal of Oleo Science, 60(2): 53-59.
- Aliero, B.L. (2003). Larvaecidal effects of aqueous extracts of *Azadirachta indica* (neem) on the larvae of anopheles mosquito. African Journal Biotechnology. 2: 325–327
- Allan, E. J., J. P. Eeswara, J. Johnson, A. J. Mordue, E. D. Morgan, and T. Stuchbury (1994) The production of azadirachtin by *in vitro* tissue culture of neem, *Azadirachta indica*. Journal of Pesticide Science. 42: 147-152.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A., and Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell, 92(6):773-784.
- Anderson AJ, Roger K, Teeper CS (1991). Timing of molecular events following elicitor treatment of plant cells. Physiology Molecular Plant Pathology, 38: 1-13.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review Plant Biology, 55: 373-399.

- Ara, I., Siddiqui, B. S., Faizi, S., Siddiqui, S. (1989). Diterpenoids from the stem bark of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, 28(4): 1177-1180.
- Arencibia, A. D., Bernal, A., Zayas, C., Carmona, E., Cordero, C., González, G., García, R., Santana, I. (2012). Hydrogen peroxide induced phenylpropanoids pathway eliciting a defensive response in plants micropropagated in temporary immersion bioreactors (TIBs). *Plant Science* 195: 71–79.
- Ávalos Garcia Adolfo, Pérez-Urria Carril Elena (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología vegetal. 2 (3): 119-145.
- Badi, H. N., Abdoosi, V., and Farzin, N. (2015). New approach to improve taxol biosynthetic. *Trakia Journal of Sciences*, 13(2): 116.
- Bahabadi, S. E., Sharifi, M., Behmanesh, M., Safaie, N., Murata, J., Araki, R. and Satake, H. (2012). Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *Journal of plant physiology*, 169(5): 487-491.
- Bahabadi, S. E., Sharifi, M., Safaie, N., Murata, J., Yamagaki, T., and Satake, H. (2011). Increased lignan biosynthesis in the suspension cultures of *Linum album* by fungal extracts. *Plant biotechnology reports*, 5(4): 367-373.
- Balaji, K., Veeresham, C., Srisilam, K., and Kokate, C. (2003). Azadirachtin, a novel biopesticide from cell cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of plant biotechnology-daejeon-*, 5(2): 121-130.
- Balandrin, M. F., and Klocke, J. A. (1988). Medicinal, aromatic, and industrial materials from plants. In *Medicinal and Aromatic Plants* , 1: 3-36.
- Baldi, A., Jain, A., Gupta, N., Srivastava, A. K., and Bisaria, V. S. (2008). Co-culture of arbuscular mycorrhiza-like fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) with plant cells of *Linum album* for enhanced production of podophyllotoxins: a first report. *Biotechnology letters*, 30(9): 1671-1677.
- Barsagade, N. B., and Wagh, G. N. (2010). Comparative screening of leaf extracts of common plants and weeds for their antibacterial and antifungal activities. *Asiatic Journal of Biotechnology Resources*, 3: 227-232.

- Beyer, W., Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Annals Biochemistry*. 161:559-566.
- Bhargava, K. P., Gupta, M. B., Gupta, G. B., Mitra C. R., (1970), Anti-inflammatory activity of saponins and other natural products. *Indian Journal Medical Research*, 58: 724-730.
- Bhide, N. K., Mehta, D. J., Lewis, R. A. (1958), Diuretic action of sodium nimbinate. *Indian. Journal Medical Science*, 12: 141-145
- Biswas, K., Chattopadhyay, I. Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U. (2002) Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*) *Current Science*, 82(11):1336-1345
- Boeke, Sara J. , Boersma, Marelle G., M., Alink Gerrit, van Loon, Joop J.A., van Huis, Arnold, Dicke, Marcel, Rietjens, Ivonne M.C (2004), Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 25–41
- Boller T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology* , 46:189– 214.
- Bolwell GP, Wojtaszek P. (1997) Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiologic Molecular Plant Pathology*, 51: 347–66.
- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* , 68(22):, 2722-2735.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Capataz-Tafur, J. (2005). Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera sp* (Tesis Maestría en Biotecnología, Facultad De Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín).
- Capataz-Tafur, J., G. Trejo-Tapia, M. Rodríguez-Monroy and G. Sepulveda-Jimenez, (2011). Arabinogalactan proteins are involved in cell aggregation of

- cell suspension cultures of *Beta vulgaris* L. Plant Cell, Tissue and Organ Cultures, 106:169–177.
- Chandlee, Joel M., Scandalios, John G. (1983). Gene Expression During Early Kernel Development in *Zea Mays*. Developmental Genetics, 4:99-115
- Chavarría, R. y M. Reyes. (1978). Experiencias Silviculturales con *Azadirachta indica*, en Nicaragua. En: Salazar, R. Manejo y Aprovechamiento de Plantaciones Forestales con especies de uso Múltiple. CATIE - IUFRO. Nicaragua y Guatemala
- Cheung, T., Singh-Nee Nigam, P., and Owusu-Apenten, R. (2016). Antioxidant Activity of Curcumin and Neem (*Azadirachta indica*) Powders: Combination Studies with ALA Using MCF-7 Breast Cancer Cells. Journal of Applied Life Sciences International, 4(3): 1-12.
- Chong T. M., Abdullah M. A., Lai O. M., Nor'Aini F. M., Lajis N. H. (2005). Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. Process Biochemistry. 40:3397-3405.
- Corpas, F. J., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Valderrama, R., Barroso, J. B., Del Río, L. A. (2008) Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves, Journal of Plant Physiology, 165 (13) : 1319–1330.
- Cruz Hernández, A. (2015). Producción de limonoides en cultivos *in vitro* de *A. indica*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. Tuxtepec, Oaxaca. México. 90 pp.
- Dai, J.; Yaylayan, V.; Vijaya G. S. and Pare, J. (1999). Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47: 3738-3742
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 57(5): 779-795.

- David, E.; Jarvis, A. and Jonesa, G. (2000). Ratio of products formed on photo-oxidation of the neem triterpenoids nimbin and salannin. *Arkivok*, 1(3): 312-319
- Davies KM, Schwinn KE (2003). Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology*; 30:913–25.
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., Barroso, J. B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling, *Plant Physiology*, 141(2), 330–335.
- Devi, B. P., Vimala, A., Sai, I., and Chandra, S. (2008). Effect of cyanobacterial elicitor on neem cell suspension cultures. *Indian Journal of Science and Technology*, 1(7): 1-5.
- Dubey, R. C., and Kumar, R. (2003). Efficacy of azadirachtin and fungicides on growth and survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of soybean. *Indian Phytopathology*, 56(2): 216-217.
- DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350–356.
- El Modafar, C., A. Tantaoui and E. El Boustani, (2001). Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in date palm roots in response to inoculation with *Fusarium oxysporum f. sp. Albedinis* and to elicitation with fungal wall elicitor. *Journal Plant Physiology*, 158:715–722
- El Modafar. C., El Boustani, E., Rahioui, B., El Mezalane, A., El Alaoui-Talibi, Z. (2006). Suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity elicited in date palm by *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* hyphal wall elicitor. *Biologia Plantarum* 50(4): 697–700.
- El-Nabarawy M.A., El-Kafafi S.H., Hamza M.A., Omar M.A. (2015). The effect of some factors on stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. *Annals of Agricultural Sciences*. 60:1-9.

- Gao, F. K., Yong, Y. H., and Dai, C. C. (2011). Effects of endophytic fungal elicitor on two kinds of terpenoids production and physiological indexes in *Euphorbia pekinensis* suspension cells. *Journal Medical Plants Research*, 5: 4418-4425.
- Gautam, V.; Nanda, K. and Gupta, S. (1993). Development of shoots and roots in anther-derived callus of *Azadirachta indica* A.Juss – a medicinal tree. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 34: 13-18.
- Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., Toneva, V., and Minkov, I. (2003). Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology*, 160(5): 509-515.
- Girish, K., Shankara Bhat, S. (2008) Neem- A Green Treasure. *Electronic Journal of Biology*, 4(3):102-111
- Havir, E.A. Handson, K.R.(1970). *Methods in enzymology*, XVII(A): 575-581
- Hermel, K., E. Pahlich y H. Schumetter, (1987). Azadirachtin content of Neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity and light. *Journal of Agricultural Sciences*, 27: 171-184.
- Hollowach – Keller, L. P; Birman, I. and Patterson D. R. (1997). Method for producing azadirachtin by cell culture of *Azadirachta indica*. United States Patent No. 5,693,423.
- Hossain, M. D., Sarwar, M. S., Dewan, S. M. R., Hossain, M. S., Shahid-Ud-Daula, A. F. M., and Islam, M. S. (2014). Investigation of total phenolic content and antioxidant activities of *Azadirachta indica* roots. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(2): 97.
- Jajic, I., Sarna, T., and Strzalka, K. (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*, 4(3): 393-411.
- James, E., and Lee, J. M. (2001). The production of foreign proteins from genetically modified plant cells. In *Plant Cells*, 127-156.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., Del Río, L. A., Sevilla, F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology*, 114 (1): 275–284.

- Johnson, S., E.D. Morgan y C.E. Peiris, (1996). Development of the major triterpenoids and oil in the fruits and seeds of Neem (*Azadirachta indica*). *Annals of Botany*, 78: 383-388.
- Kearney, M. L., Allan, E., Hooker, J.E., Mordue, J. (1994), Antifeedant effect of *in vitro* culture extracts of neem tree, *Azadirachta indica* against the desert locust (*Schistocerca gregaria*(Fosskal)), *Plant Cell Tissue Organs Culture*, 37: 67-71
- Khalid, S. A., Duddect, H., Gonzales-Sierra, M. J. (1989), Isolation and characterization of an antimalarial agent of the neem tree *Azadirachta indica*, *Journal Natural Products*, 52: 922-927.
- Kikot, G. (2012). Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad (Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas).
- Kikuchi, T., Ishii, K., Noto, T., Takahashi, A., Tabata, K., Suzuki, T., and Akihisa, T. (2011). Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of limonoids from the seeds of *Azadirachta indica* (neem). *Journal of Natural Products*, 74(4): 866-870.
- Kitdamrongtham, W., Ishii, K., Ebina, K., Zhang, J., Ukiya, M., Koike, K. and Akihisa, T. (2014). Limonoids and flavonoids from the flowers of *Azadirachta indica* var. *siamensis*, and their melanogenesis-inhibitory and cytotoxic activities. *Chemistry and Biodiversity*, 11(1): 73-84.
- Kobayashi, K., Y. Kumazawa, K. Miwa, and S. Yamanaka (1996) ϵ -(γ -Glutamyl) lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 144 (2-3): 157–160.
- Koolman, J., H.J. Bidmon, M. Lehmann y G. Kauser, (1998). One the mode of action of azadirachtin in blowfly larvae and pupae. *Endocrinological Fronteirs in Physiological Insect Ecology*, 1: 55-67.
- Kumar, A. S., Bose, K. S. C., Kumar, K. P., Raghavan, S., and Murali, P. M. (2014). Terpenoids and Its Commercial Utility from Neem: The Nature's Own Pharmacy. *Asian Journal of Chemistry*, 26(16): 4940.
- Kumar, G. H., Priyadarsini, R. V., Vinothini, G., Letchoumy, P. V., and Nagini, S. (2010). The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit cell

- proliferation and induce apoptosis in an animal model of oral oncogenesis. *Investigational New Drugs*, 28(4): 392-401.
- Kumar, V., Rajauria, G., Sahai, V., and Bisaria, V. S. (2012). Culture filtrate of root endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes the growth and lignan production of *Linum album* hairy root cultures. *Process Biochemistry*, 47(6): 901-907.
- Kuruvilla, T., P. Komaraiah, and S. V. Ramakrishna (1999) Enhanced secretion of azadirachtin by permeabilized margosa (*Azadirachta indica*) cells. *Indian Journal Experimental Botany* 37: 89- 91.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Leos, M.J., R.P. Salazar S. (2002) The insecticide Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss in México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Agronomy Faculty. Technology Brochure 3. Marín, N.L. México.
- Liu, J., Ding, J. Y., Zhou, Q. Y., He, L., and Wang, Z. T. (2004). Studies on influence of fungal elicitor on hairy root of *Panax ginseng* biosynthesis ginseng saponin and biomass. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 29(4): 302-305.
- Lu, C.-T. and Mei, X.-G. (2003). Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. *Biotechnology Letters* 25: 1437–1439.
- Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F. and Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, 67: 399-416.
- Manikandan, P., Anandan, R., and Nagini, S. (2009). Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for *in vitro* antioxidant potential and protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage to pBR322 DNA and red blood cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15): 6990-6996.
- Manosroi, A., Kitdamrongtham, W., Ishii, K., Shinozaki, T., Tachi, Y., Takagi, M. and Akihisa, T. (2014). Limonoids from *Azadirachta indica* var. *siamensis* extracts and their cytotoxic and melanogenesis-inhibitory activities. *Chemistry and Biodiversity*, 11(4): 505-531.

- Medina, P. V. (2011). Efecto de la reducción de nitrógeno en el metabolismo de compuestos fenólicos en brotes de *Castilleja tenuiflora Benth.* cultivados en biorreactor de inmersión temporal. Tesis de Maestría, CEPROBI-IPN. Yautepec, Morelos.
- Méndez Sánchez, L., I. (2016) Actividad hipoglucémica de plántulas *in vitro* de *Azadirachta indica*. Tesis de licenciatura Ingeniería en Biotecnología. Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. Tuxtepec, Oaxaca. México. 77 pp.
- Mendhulkar, V.D.; Vakil, M.M.A. (2013) Chitosan and *Aspergillus niger* mediated elicitation of total flavonoids in suspension culture of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. International Journal Pharma Bio Sciences, 4: 731–740.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, 7(9): 405-410.
- Moreno, M.I. (1996) The Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss in the Southern Sonora, México. Technical Report Yaqui Valley Experimental Field-INIFAP. Ciudad Obregón, Sonora, México.
- Morkunas, I., Gmerek, J. (2005). The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*, Journal of Plant Physiology, 164: 185–194.
- Muñoz-Cruz, W.; Vanegas-Monterrosa, O. A.; Guzman-Rojas, A. A.; Capataz-Tafur, J.; Hoyos-Sánchez, R. A. y Orozco-Sánchez, F. (2006). Estimación de variables de operación de un biorreactor con células de *Azadirachta indica* A. Juss. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 59(2): 3467-3478.
- Murthy, S. P., Sirsi, M. (1958), Pharmacological studies on *Melia azadirachta*, Linn. (no Meliaceae). Indian Journal Physiology Pharmacology, 2: 387-396.
- Nahak, G., and Sahu, R. K. (2010). *In vitro* antioxidative activity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* leaves by DPPH scavenging assay. Natural Sciences, 8(4): 22-8.

- Naina, N. S., Gupta P. K. and Mascarenhas A. F. (1989). Genetic transformation and regeneration of transgenic neem (*Azadirachta indica*) plants using *Agrobacterium tumefaciens*, *Current Science*, 58: 184 – 187.
- Namdeo, A.G.(2007), Plant cell elicitation of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1 (1): 69-79.
- Naseer, R. Sultana, B., Anwar, F., Mehmood, Z., and Mushtaq, M. (2014). Variations in phenolics, antioxidant and antifungal activities among different parts of selected medicinal plants. *Pakistan Journal Botany*, 42(2): 705-712.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. (2002) Hydrogen peroxide signalling, *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (5): 388–395.
- Nowogórska A, Patykowski J (2015) Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Botrytis cinerea* infection. *Acta Physiology Plant*, 37:1–10
- Oksman-Caldentey, K. M., and Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9): 433-440.
- Orozco-Sánchez F., Rodríguez-Monroy M. (2007). Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6 (3): 251-258
- Pandreka, A., Dandekar, D. S., Haldar, S., Uttara, V., Vijayshree, S. G., Mulani, F. Aarth T. and Thulasiram, H. V. (2015). Triterpenoid profiling and functional characterization of the initial genes involved in isoprenoid biosynthesis in neem (*Azadirachta indica*). *BMC Plant Biology*, 15(1): 214.
- Park, E. S., Bae, I. K., Jeon, H. J., and Lee, S. E. (2014). Limonoids derivatives and its pesticidal activities. *Entomological Research*, 44(4): 158-162.
- Pérez-Urria Carril, E., and Ávalos García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3): 119-145.
- Pokhrel, B., Rijal, S., Raut, S., and Pandeya, A. (2015). Investigations of antioxidant and antibacterial activity of leaf extracts of *Azadirachta indica*. *African Journal of Biotechnology*, 14(46): 3159-3163.

- Polkowska-Kowalczyk L., Wielgat B., Maciejewska U. (2007) Changes in the antioxidant status in leaves of *Solanum* species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. *Journal Plant Physiology*, 164:1268–1277
- Prakash, G. and Srivastava, A. K. (2006). Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal*, 29: 62 – 88.
- Prakash, G. and Srivastava, A. K. (2007). Azadirachtin production in stirred tank reactors by *Azadirachta indica* suspension culture. *Process Biochemistry* 42(1): 93-97.
- Prakash, G., Bhojwani, S., Srivastava, A. (2002). Production of azadirachtin from plant tissue cultures: state of the art and future prospects. *Biotechnology Bioengineering*. 7: 185-193.
- Pütter J. (1971). Peroxidases. In: Bergmeyer, *Methods of enzymatic analysis* 2. Academic Press, New York. 685–690
- R. Desikan, S. A.-H.-Mackerness S., J. T. Hancock, and S. J. Neill, (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress, *Plant Physiology*, 127(1):159–172.
- R. Radman, T. Saez, C. Bucke, T. Keshavarz (2003). Elicitation of plant and microbial systems. *Biotechnology Applied Biochemistry* 37: 91-102.
- Rafiq, M, Dahot, M. U., (2010) Callus and related limonoids production through *in vitro* culture of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) *African Journal of Biotechnology*. 9 (4): 449-453
- Rajendran, L., G. Suvarnalatha, G. A. Ravishankar, L. V. Venkataraman (1994) Enhancement of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. under the influence of fungal elicitors, *Applied Microbiology Biotechnology*, 42:227-231
- Rao, N. S. (1995). *Soil microbiology-Fourth Edition of Soil Microorganisms and Plant Growth*. Science Publishers, 4
- Rodríguez, D.A. y S.R. Rodríguez. (1994). Insecticidas de Origen Botánico (Familia Meliaceae). *El Árbol del Nim (Azadirachta indica) una Revisión de la*

- Literatura como Introducción a su Conocimiento. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Instituto de Fitosanidad Campus Córdoba. México.
- Roy, A., Saraf, S. (2006). Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biology Pharmacology Bulletin*. 29: 191-201.
- Satdive, R. K., Fulzele, D. P., and Eapen, S. (2006). Production of biopesticide azadirachtin by hairy root cultures of neem (*Azadirachta indica* A. juss). *Barc newsletter*, 273: 195.
- Scandalios, G., Guan, L., Polidoros, A. N. (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression, in *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses*, 343–406.
- Schaaf, O. (2000) Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoid from neem (*Azadirachta indica*) by high performance liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal Chromatography*. 886: 89-97.
- Shaker, E. S., and Darwish, I. M. (2005). Antioxidative and antifungal activity of azadirachtin derivative on infected tomato seed germination. *Bulletin-faculty of Agriculture University of Cairo*, 56(3): 483.
- Sharma, Pallavi; Bhushan Jha, Ambuj; Shanker, Rama; Dubey; Pessarakli, Mohammad (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, *Journal of Botany*, 26.
- Sharma, V. N., Saksena, K. P. (1959), Sodium-nimbinate. *in vitro* study of its spermicidal action. *Indian Journal Medical Research*, 13: 1038
- Shibuya, N., and Minami, E. (2001). Oligosaccharide signaling for defense responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 223-233.
- Shohael, A. M., Chakrabarty, D., Ali, M. B., Yu, K. W., Hahn, E. J., Lee, H. L., Paek, K. Y. (2006). Enhancement of eleutherosides production in embryogenic cultures of *Eleutherococcus senticosus* in response sucrose-induced osmotic stress. *Process Biochemistry*, 41: 512–518.

- Simic, S. G., Tusevski, O., Maury, S., Hano, C., Delaunay, A., Chabbert, B. Hagege, D. (2015). Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrone contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(1): 213-226.
- Sithisarn, P., Supabphol, R., and Gritsanapan, W. (2005). Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1): 109-112.
- Srivastava, P., Singh, M., and Chaturvedi, R. (2009). Production of Azadirachtin in anther cultures of *Azadirachta indica* A. Juss., and its bioactivity against *Aspergillus sydowii*. *Journal of Biotechnology*, 3(3).
- Srivastava, S., and Srivastava, A. K. (2012). Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(9): 1549-1553.
- Srivastava, S., and Srivastava, A. K. (2013). Production of the biopesticide azadirachtin by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in liquid-phase bioreactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(6): 1351-1361.
- Srivastava, S., and Srivastava, A. K. (2014). Effect of elicitors and precursors on azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4): 2286-2297.
- Srividya, N., B. P. Sridevi, and P. Satyanarayana (1998) Azadirachtin and nimbin content *in vitro* cultured shoots and roots of *Azadirachta indica* A. Juss. *Indian Journal Plant Physiology*. 3: 129-134.
- Sudha, G., and Ravishankar, G. A. (2003). Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and involvement of calcium channel modulators. *Current Science Bangalore*, 84(6):775-779.
- Sultana, B., Anwar, F., and Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6): 2167-2180.
- Sultana, B., Anwar, F., and Przybylski, R. (2007). Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia*

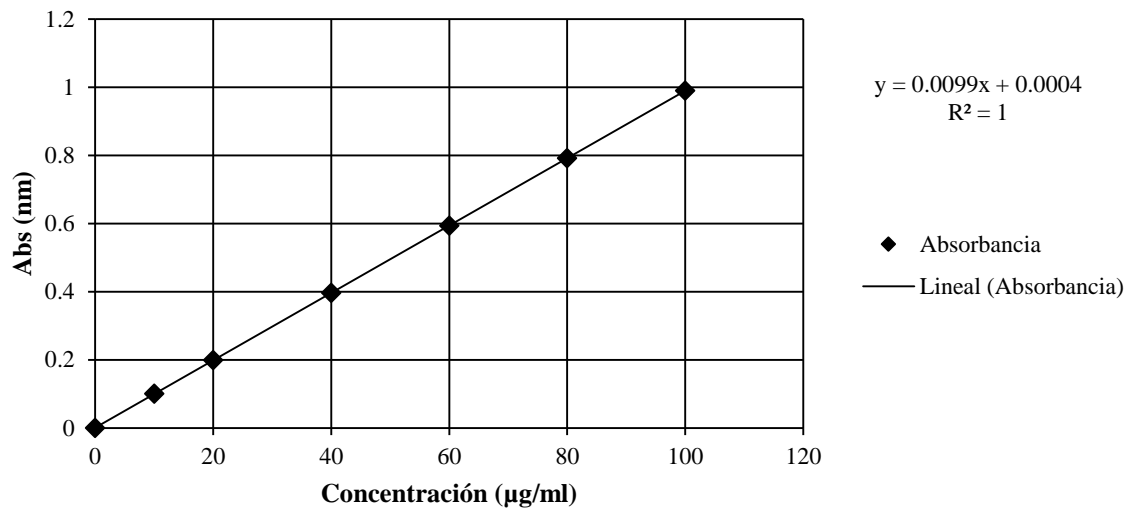
- nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. Food Chemistry, 104(3): 1106-1114.
- Sundaram, K. M. S. and J. Curry (1996) Effect of some UV light absorber on the photostabilization of azadirachtin, a neem based pesticide. Chemosphere 32: 649-659.
- Swaroop, G., Anuradha, M., and Pullaiah, T. (2013). Elicitation of forskolin in suspension cultures of *Coleus forskohlii* (Willd.) Briq. using elicitors of fungal origin. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 7(3): 755-762.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B. (1997). Sub-cellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. The Plant Journal 11:1187-1194.
- Usov, A. I. (1993). Oligosaccharins. A new class of signaling molecules in plants. Russian Chemical Reviews, 62(11): 1047-1071.
- Vásquez-Rivera, A., Chicaiza-Finley, D., Hoyos, R. A. and Orozco-Sánchez, F. (2015). Production of limonoids with insect antifeedant activity in a two-stage bioreactor process with cell suspension culture of *Azadirachta indica*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 177(2): 334-345.
- Veeresham C., Kumar M. R., Sowjanya D., Kokate C. K., and Apte S. S. (1998) Production of azadirachtin from callus cultures of *Azadirachta indica*. Fitoterapia 69: 423- 424.
- Wang C., Wu J., Mei X (2001). Enhancement of Taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Applied Microbiology and Biotechnology. 55:404-410.
- Wang, J., H. Zhang, and R. D. Allen (1999) Overexpression of an *Arabidopsis peroxisomal* ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. Plant and Cell Physiology, 40(7): 725–732.
- Wewetzer, A. (1998), Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of azadirachtin, Phytoparasitica, 26: 47-52.
- Wohlgemut H, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, KangasJärvi, Sandermann H, Langebartels C. (2002). Activation of an

- oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant cell environment*. 25: 717-726.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322(3): 681-692.
- Xingli, Z. H. A. I. (2006). Study on the bacteriostasis activity of azadirachtin against *Bacillus spp.* *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 34(9): 1908.
- Xu, M., Dong, J. (2005). O₂ from elicitor induced oxidative burst is necessary for triggering phenylalanine ammonia-lyase activation and catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 280– 284.
- Xu, M., Dong, J., Zhu, M. (2004). Involvement of NO in fungal elicitor-induced activation of PAL and stimulation of taxol synthesis in *Taxus chinensis* suspension cells. *Chinese Science Bulletin* 10 (49): 1038–1043.
- Xu, X., Hu, X., Neill, S. J., Fang, J., and Cai, W. (2005). Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng*. *Plant and Cell Physiology*, 46(6): 947-954.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., Wu, J.Y. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science* 170: 853–858.
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M., and Patil, B. S. (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6)
- Yu, L. J., Lan, W. Z., Qin, W. M., Jin, W. W., Xu H. B. (2002), Oxidative stress and taxol production induced by fungal elicitation in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*, *Biologia Plantarum*, 45(3): 459-461.
- Yuan, Y. J., Li, C., Wu, J. C., Hu, Z. D. (2002). A model for signal transduction in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* induced by an oligosaccharide from *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology Letters* 24: 407–412.

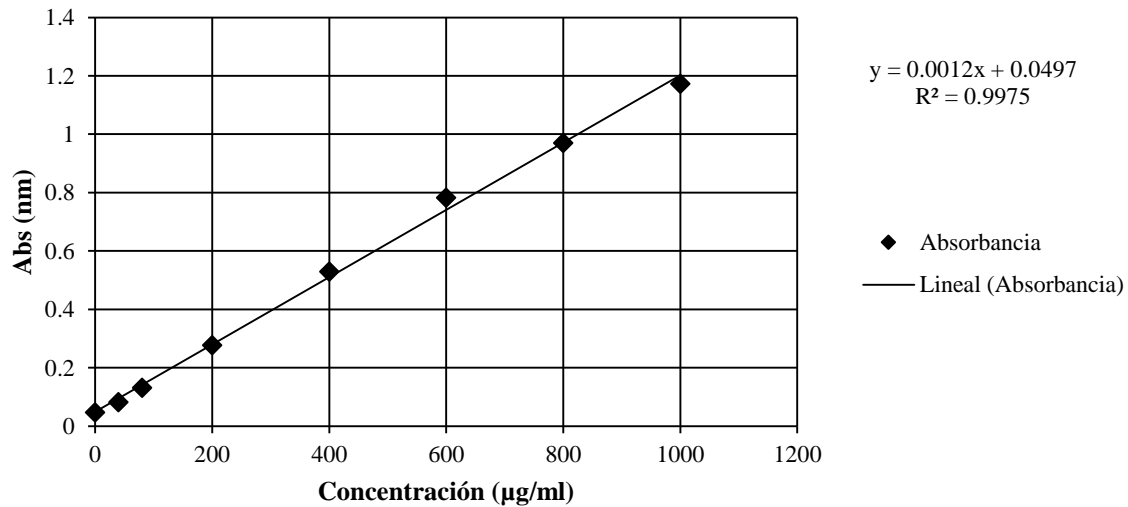
- Zhao J, Hu Q, Guo YQ, Zhu WH. (2001) Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca² influx and the oxidative burst. *Plant Science*; 161:423 – 31.
- Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23:283-333.

13. ANEXOS

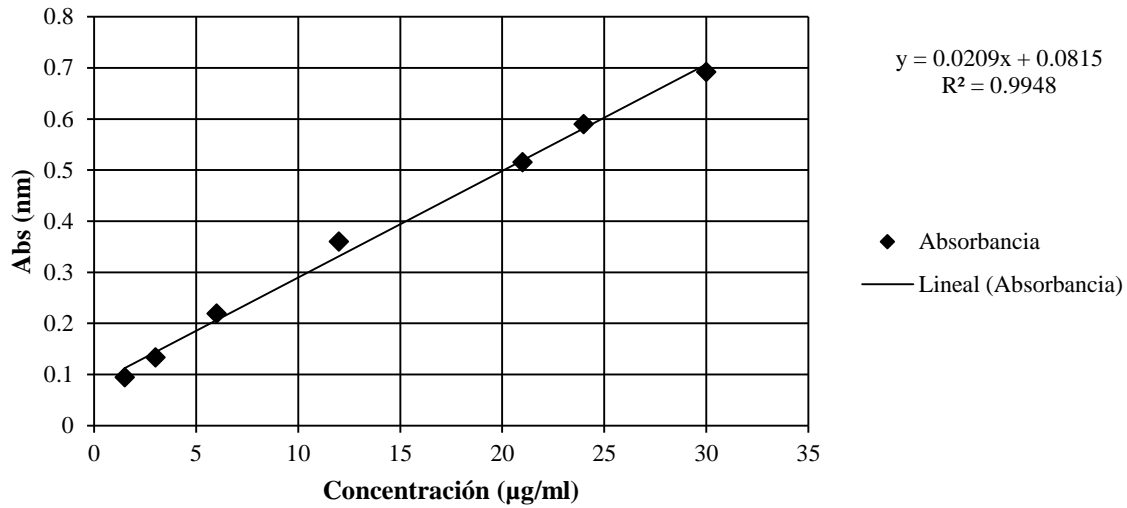
Anexo 1. Curva de calibración azadiractina



Anexo 2. Curva de calibración compuestos fenólicos totales



Anexo 3. Curva de calibración BSA



Anexo 4. Análisis estadísticos y pruebas de medias

Biomasa

Analysis of Variance for C1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempo	8	205425	205425	25678	284.45	0.000
Trat	2	8800	8800	4400	48.74	0.000
Error	70	6319	6319	90		
Total	80	220544				

S = 9.50125 R-Sq = 97.13% R-Sq(adj) = 96.73%

Grouping Information Using Tukey Method

Trat_Tiem	N	Mean	Grouping
c-216	3	303.45	A
T1-216	3	269.35	B
T2-216	3	256.45	B
c-72	3	158.35	C
c-48	3	148.70	C D
c-36	3	145.85	C D
T1-72	3	142.00	C D E
c-24	3	141.75	C D E
T1-36	3	141.25	C D E
T1-48	3	136.10	C D E F
T1-24	3	133.33	D E F G
c-18	3	127.40	D E F G H
T2-24	3	122.05	E F G H I
T2-36	3	119.95	E F G H I J
T2-72	3	118.55	E F G H I J
c-12	3	115.80	F G H I J K
T1-18	3	113.17	F G H I J K
T2-48	3	112.05	G H I J K
c-6	3	109.70	H I J K
T1-12	3	108.75	H I J K
T2-0	3	107.53	H I J K
T1-0	3	107.53	H I J K
c-0	3	107.53	H I J K
T1-6	3	106.57	H I J K
T2-6	3	101.95	I J K
T2-12	3	98.33	J K
T2-18	3	92.47	K

Means that do not share a letter are significantly different.

Compuestos fenólicos

Analysis of Variance for Cl, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempo	8	59067955	59067955	7383494	135.24	0.000
Trat	2	221497	221497	110748	2.03	0.139
Error	70	3821781	3821781	54597		
Total	80	63111233				

S = 233.660 R-Sq = 93.94% R-Sq(adj) = 93.08%

Grouping Information Using Tukey Method

Trat_Tiem	N	Mean	Grouping
T1-24	3	4774.2	A
c-24	3	4715.8	A
T2-24	3	4607.5	A
c-18	3	3782.5	B
T1-18	3	3682.5	B C
T2-18	3	3665.8	B C
c-12	3	3524.2	C D
T1-6	3	3449.2	D
c-6	3	3415.8	D E
T1-12	3	3249.2	E F
T2-6	3	3149.2	F
T2-12	3	3115.8	F
T2-72	3	2820.0	G
T1-48	3	2607.5	H
c-48	3	2607.5	H
c-36	3	2545.0	H I
T1-216	3	2482.5	H I J
T2-48	3	2407.5	I J
c-72	3	2320.0	J K
T2-216	3	2157.5	K
T2-0	3	2140.8	K
T1-0	3	2140.8	K
c-0	3	2140.8	K
T2-36	3	1932.5	L
T1-72	3	1907.5	L
c-216	3	1870.0	L
T1-36	3	1570.0	M

Means that do not share a letter are significantly different.

Limonoides

Analysis of Variance for Cl, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempo	8	3931203	3931203	491400	17.29	0.000
Trat	2	292897	292897	146449	5.15	0.008
Error	70	1989705	1989705	28424		
Total	80	6213806				

S = 168.595 R-Sq = 67.98% R-Sq(adj) = 63.40%

Grouping Information Using Tukey Method

Trat_Tiem	N	Mean	Grouping
T1-72	3	1978.8	A
T2-216	3	1490.9	B
c-72	3	1327.9	C
T1-48	3	995.2	D
T1-216	3	983.9	DE
c-216	3	976.8	DE
T2-72	3	974.5	DE
T2-48	3	966.7	DEF
T1-36	3	943.6	DEFG
c-48	3	930.3	DEFG
T1-24	3	928.8	DEFG
T1-18	3	916.8	DEFGH
T1-12	3	904.9	DEFGHI
T2-36	3	898.5	DEFGHI
T1-6	3	891.9	DEFGHI
c-36	3	881.8	DEFGHI
T2-6	3	860.6	EFGHIJ
T2-24	3	860.6	EFGHIJ
T2-18	3	845.5	F G H I J
T2-12	3	832.3	G H I J
c-24	3	804.0	H I J
c-18	3	784.8	I J
c-12	3	781.8	I J
c-6	3	743.4	J
T2-0	3	596.5	K
T1-0	3	596.5	K
c-0	3	596.5	K

Means that do not share a letter are significantly different.

Fenil amonio liasa

Analysis of Variance for C1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempc	7	0.0003079	0.0003079	0.0000440	4.58	0.000
Trat	2	0.0000278	0.0000278	0.0000139	1.45	0.243
Error	62	0.0005949	0.0005949	0.0000096		
Total	71	0.0009305				

S = 0.00309753 R-Sq = 36.07% R-Sq(adj) = 26.79%

Grouping Information Using Tukey Method

Trat_Tiem	N	Mean	Grouping
T2-36	3	0.032062	A
T2-18	3	0.029810	A B
c-36	3	0.028920	A B C
T1-6	3	0.028453	A B C
T2-6	3	0.027798	B C D
c-12	3	0.026054	B C D E
T1-12	3	0.026000	B C D E
T1-72	3	0.025821	C D E F
c-24	3	0.025250	C D E F
T1-18	3	0.024303	D E F G
c-72	3	0.024237	D E F G
T1-48	3	0.022941	E F G
T2-12	3	0.022792	E F G
c-18	3	0.022751	E F G
T2-24	3	0.022691	E F G
T1-0	3	0.022387	E F G
T2-0	3	0.022387	E F G
c-0	3	0.022387	E F G
c-6	3	0.022160	F G
c-48	3	0.020953	G
T2-72	3	0.020924	G
T1-36	3	0.020830	G
T2-48	3	0.020709	G
T1-24	3	0.016278	H

Means that do not share a letter are significantly different.

Peroxidasa

Analysis of Variance for C1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempo	7	1.28764E+11	1.28764E+11	18394794039	5.82	0.000
Irat	2	87283917389	87283917389	43641958695	13.81	0.000
Error	62	1.95983E+11	1.95983E+11	3161023433		
Total	71	4.12031E+11				

S = 56223.0 R-Sq = 52.43% R-Sq(adj) = 45.53%

Grouping Information Using Tukey Method

Treat_Item	N	Mean	Grouping
I2-36	3	365037	A
I2-18	3	193360	B
I1-36	3	79262	C
I2-24	3	68075	D
I2-48	3	63066	D E
I1-24	3	55793	E
I2-12	3	32997	F
I1-18	3	32588	F G
I2-6	3	27774	F G H
I2-0	3	26509	F G H I
I1-0	3	26509	F G H I
c-0	3	26509	F G H I
c-24	3	25209	F G H I
c-6	3	25136	F G H I
c-48	3	24189	F G H I
I1-72	3	21720	G H I J
I1-6	3	20970	H I J
I1-12	3	18411	H I J
I1-48	3	17877	H I J
c-12	3	17235	H I J K
c-18	3	16201	I J K
I2-72	3	12503	J K L
c-72	3	6444	K L
c-36	3	3914	L

Means that do not share a letter are significantly different.

Catalasa

Analysis of Variance for C1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempo	7	1393.77	1393.77	199.11	15.01	0.000
Treat	2	518.09	518.09	259.05	19.53	0.000
Error	62	822.32	822.32	13.26		
Total	71	2734.19				

S = 3.64188 R-Sq = 69.92% R-Sq(adj) = 65.56%

Grouping Information Using Tukey Method

Trat_Item	N	Mean	Grouping
T2-36	3	28.601	A
T1-36	3	21.816	B
T2-18	3	19.104	C
T1-24	3	17.296	D
T2-24	3	14.427	E
T1-18	3	10.845	F
T1-6	3	8.061	G
T2-6	3	7.717	G H
T2-48	3	7.433	G H I
T1-12	3	7.123	G H I J
T1-48	3	7.053	G H I J
T2-12	3	6.737	G H I J
T1-72	3	6.574	H I J
c-12	3	6.562	H I J
T2-0	3	6.260	I J
T1-0	3	6.260	I J
c-0	3	6.260	I J
c-6	3	6.128	I J
c-24	3	6.041	I J
c-36	3	5.847	J K
c-18	3	5.769	J K
c-48	3	4.571	K L
T2-72	3	4.197	L
c-72	3	3.792	L

Means that do not share a letter are significantly different.

Ascorbato peroxidasa

Analysis of Variance for C1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tiempo	7	6056.0	6056.0	865.1	6.04	0.000
Trat	2	3725.5	3725.5	1862.7	13.01	0.000
Error	62	8878.5	8878.5	143.2		
Total	71	18659.9				

S = 11.9667 R-Sq = 52.42% R-Sq(adj) = 45.51%

Grouping Information Using Tukey Method

Trat_Tiem	N	Mean	Grouping
T2-36	3	82.798	A
T2-24	3	32.601	B
T1-36	3	14.519	C
T2-12	3	14.122	C
T2-6	3	12.292	C D
T2-0	3	9.838	D E
T1-0	3	9.838	D E
c-0	3	9.838	D E
c-6	3	9.800	D E
T2-18	3	8.737	E F
T1-24	3	8.601	E F
T1-6	3	8.472	E F
T2-48	3	8.276	E F
c-12	3	8.172	E F
T1-18	3	7.449	E F G
c-24	3	6.252	F G H
T1-48	3	5.431	G H I
T2-72	3	4.986	G H I
c-18	3	4.719	H I
c-36	3	4.437	H I
T1-72	3	3.560	I J
T1-12	3	1.428	J K
c-48	3	1.345	J K
c-72	3	0.537	K

Means that do not share a letter are significantly different.