



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
GRICOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**MICORRIZA ARBUSCULAR Y ESTRÉS ABIÓTICO EN EL  
CONTENIDO DE ALCALOIDES (VINBLASTINA Y  
VINCRISTINA) DE *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.**

**CLAUDIA JANETTE DE LA ROSA MERA**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2009

La presente tesis, titulada: **Micorriza arbuscular y estrés abiótico en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.**, realizada por la alumna: **Claudia Janette De la Rosa Mera**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA  
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. RONALD FERRERA- CERRATO

ASESOR:



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR:

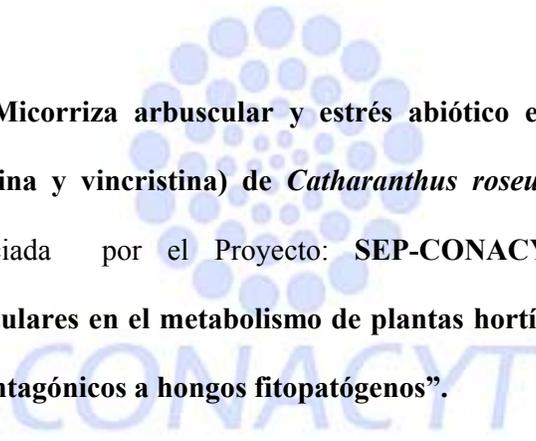


DR. OMAR DAVID MUÑOZ MUÑIZ

ASESOR:



M. en C. MARÍA DE JESÚS SÁNCHEZ  
COLÍN



La presente tesis “**Micorriza arbuscular y estrés abiótico en el contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.**”, fue parcialmente financiada por el Proyecto: **SEP-CONACYT 58594 “Hongos micorrízicos arbusculares en el metabolismo de plantas hortícolas, inoculadas con microorganismos antagónicos a hongos fitopatógenos”**.

**MICORRIZA ARBUSCULAR Y ESTRÉS ABIÓTICO EN EL CONTENIDO DE ALCALOIDES (VINBLASTINA Y VINCRISTINA) DE *Catharanthus roseus***

**(L.) G. Don.**

**Claudia Janette De la Rosa Mera, M. C.**

**Colegio de Postgraduados, 2009**

**RESUMEN**

Este estudio evaluó el incremento de vinblastina y vincristina en plantas micorrizadas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., establecidas en invernadero, sometidas a estrés abiótico causado por aplicaciones de bicarbonato de potasio (2.5 y 7.5 mM) y cloruro de sodio (40 mM). El presente trabajo fue dividido en tres fases experimentales. La primera fase describe la propagación de consorcios e identificación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) obtenidos de la rizósfera de plantas medicinales recolectadas del Parque Nacional Iztapopo, Zoquiapan y Anexas. En la segunda fase se realizó una selección de consorcios de HMA con base en la promoción del crecimiento en *C. roseus*. Finalmente, en la tercera fase se realizó una aplicación de bicarbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>) y cloruro de sodio (NaCl) en plantas micorrizadas de *C. roseus*, para evaluar su efecto en el contenido de los alcaloides vinblastina y vincristina. Como conclusiones generales, se tiene que en los consorcios obtenidos de plantas medicinales, los géneros de HMA predominantes fueron *Acaulospora* y *Glomus*. El consorcio de *Rumex mexicanus* Meins fue el consorcio más efectivo en la promoción del crecimiento en plantas de *C. roseus* y en el incremento del contenido de ambos alcaloides en ausencia del KHCO<sub>3</sub> y el NaCl. La aplicación de KHCO<sub>3</sub> (7.5 mM) incrementó la concentración de vinblastina y vincristina, mientras que el NaCl no produjo incrementos significativos en el contenido de estos metabolitos secundarios. Por otra parte, la aplicación de KHCO<sub>3</sub> y/o NaCl disminuyó significativamente la colonización micorrízica. Las plantas no micorrizadas a las que se les aplicó KHCO<sub>3</sub> (7.5 mM) tuvieron mayor presencia de metabolitos de interés biológico y un mayor poder reductor.

**Palabras clave:** planta medicinal, vinca, metabolitos secundarios, alcalinidad, salinidad

**ARBUSCULAR MYCORRHIZA AND ABIOTIC STRESS ON THE CONTENT OF ALKALOIDS (VINBLASTINE AND VINCRIStINE) OF *Catharanthus roseus***

**(L.) G. Don.**

**Claudia Janette De la Rosa Mera, M. en C.**

**Colegio de Postgraduados, 2009**

**SUMMARY**

This study evaluated the content of vinblastine and vincristine of mycorrhizal *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., under greenhouse conditions, subjected to abiotic stress induced by potassium bicarbonate (2.5 and 7.5 mM) and sodium chloride (40 mM). The study was divided in three experimental phases. The first phase describes the propagation and identification of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) of consortia obtained from medicinal plants collected from Parque Nacional Iztapopo, Zoquiapan y Anexas. In the second phase, a mycorrhizal consortia selection was performed based on their ability for promoting the growth of *C. roseus*. Finally, the third phase evaluated the effects of potassium bicarbonate (KHCO<sub>3</sub>) and sodium chloride (NaCl) on mycorrhizal *C. roseus* on the total content of the alkaloids vinblastine and vincristine. As general conclusions, it was observed that *Acaulospora* and *Glomus* were the predominant AMF-genera at consortia from medicinal plants. The consortium from *Rumex mexicanus* Meins was the most effective on enhancing both growth and total content of both alkaloids in *C. roseus*, regardless KHCO<sub>3</sub> or NaCl application. In addition, KHCO<sub>3</sub> (7.5 mM) resulted on significant increases of vinblastine and vincristine, whereas NaCl had no significant effects on both alkaloids. Either KHCO<sub>3</sub> or NaCl significantly reduced mycorrhizal colonization. Non-AMF plants with 7.5 mM of KHCO<sub>3</sub> had high content of secondary metabolites and Fe-reducing potential.

**Key words:** medicinal plants, vinca, secondary metabolites, alkalinity, salinity

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Colegio de Postgraduados por las facilidades proporcionadas para realizar mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para el desarrollo de esta investigación la cual forma parte de mi formación profesional.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por la beca proporcionada para la elaboración de la tesis.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato. Por la formación y orientación académica en la realización de esta investigación, por su disciplina y cariño.

Al Dr. Alejandro Alarcón. Por su apoyo en la revisión del escrito, sus consejos, paciencia y tiempo brindado. Su ayuda fue fundamental en la culminación de este escrito, muchas gracias.

A la M en C Alicia Franco Ramírez por su apoyo incondicional en la identificación taxonómica de este trabajo.

A mi consejo particular: Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, Dr. Alejandro Alarcón, Dr. Omar David Muñoz Muñiz y a la M en C María de Jesús Sánchez Colín. Por su ayuda y sugerencias para mejorar el trabajo científico.

Al personal del Área de Microbiología, por su apoyo en el laboratorio. Pero muy en especial al Sr. Edmundo Martínez Galán, por su amistad y por el mantenimiento dado a mis plantas y a Rosario Galicia por su amistad.

## DEDICATORIA

A Dios por darme salud y permitirme realizar uno más de mis objetivos, sus palabras señor confortan mi espíritu:

El Señor es mi Pastor; nada me faltará.

En lugares de delicados pastos me hará descansar;

junto a aguas de reposo me pastoreará.

Confortará mi alma; me guiará por sendas  
de justicia por amor de su nombre.

Aunque ande en valle de sombra de muerte,  
no temeré mal alguno, porque Tú estarás conmigo;  
tu vara y tu cayado me infundirán aliento.

Aderezas mesa delante de mí, en presencia  
de mis angustiadores; unges mi cabeza con  
aceite; mi copa está rebosando.

Ciertamente el bien y la misericordia me  
seguirán todos los días de mi vida, y en la  
casa del Señor moraré por largos días (Salmo 23).

A Fernanda Sofía Barcenás De la Rosa, por permitirme ser tu madre, y darme la fortaleza, por que cuando en algún momento sentí que ya no podía, con solo mirarme en tus ojitos mi alma recobraba fuerza para seguir luchando por ti, mi niña hermosa.

A Christian Iván Valencia De la Rosa, por dejar que forme parte de tu vida, y darme tanta felicidad y aunque no soy tu madre para mi eres como un hijo, siempre contaras conmigo mi niño te amo.

A mi madre de quien estoy orgullosa, mi mejor amiga, mi compañera inseparable, gracias por que la educación que me brindaste, fue la mejor arma para enfrentarme a la vida.

A Raúl Barcenás Aquino por que muy a tu manera me hiciste ser una persona más fuerte, y sobre todo por compartir conmigo la alegría de ser padres.

A mis hermanos, compañeros de toda la vida, a quienes amo y agradezco el amor que me brindan.

A Carlos López Ortíz, por confiar en mí, saber escuchar, en fin ser un muy buen amigo. Gracias por los momentos divertidos que pasamos juntos y por hacer esta etapa tan agradable, te quiero siempre contaras conmigo amigo.

Al Dr. Alejandro Alarcón. Por su amistad, y por enseñarme que los problemas, errores o fracasos a los que continuamente nos enfrentamos, son precisamente los que nos fortalecen de una u otra forma, el punto es encararlo con decisión y firmeza con el fin de superarlos de la mejor manera posible. Gracias Doctor.

A mis compañeros, Esmeralda, Alicia, Alejandra, Claudia, Mariano, Magda, Susana, Rosalva, Katina, Blanca, por todas los momentos gratos que compartimos.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.....	3
CAPÍTULO III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis general.....	5
Hipótesis específicas.....	5
CAPÍTULO IV.	
REVISIÓN DE LITERATURA. LAS PLANTAS MEDICINALES Y SU RELACIÓN CON LA MICORRIZA ARBUSCULAR	
Las plantas medicinales.....	6
Definición.....	6
Antecedentes históricos del uso de plantas medicinales.....	6
Código florentino.....	8
El Código de la Cruz-Badiano.....	9
Obras Completas del Protomédico Español Francisco Hernández.....	11
Naturaleza de los componentes químicos de las plantas medicinales.....	11
Inorgánicos.....	11
Orgánicos.....	12
Principio activo.....	13
Definición.....	13
Métodos generales de obtención de principios activos.....	13
a) Extracción mecánica.....	14
b) Destilación.....	14
c) Extracción con gases en condiciones supercríticas.....	14
d) Extracción con disolventes.....	14

Micorriza arbuscular.....	15
Definición.....	15
Tipos morfológicos de la micorriza arbuscular.....	15
Características morfológicas de los hongos micorrízicos arbusculares.....	16
Desarrollo de la simbiosis.....	20
Taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares.....	22
Beneficios de la micorriza arbuscular.....	24
a) Incremento en la absorción de nutrimentos.....	24
b) Protección contra el estrés hídrico.....	25
c) Protección contra la herbivoría.....	25
d) Protección contra patógenos.....	25
e) Tolerancia a elementos tóxicos.....	26
Las plantas medicinales y la micorriza arbuscular.....	26
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. ....	29
Taxonomía y sinonimia.....	29
Origen y distribución.....	29
Descripción botánica.....	30
Cultivo y nutrición mineral.....	30
Composición química.....	31
Usos y propiedades terapéuticas.....	33

## CAPÍTULO V.

### PROPAGACIÓN DE CONSORCIOS E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES OBTENIDOS DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS MEDICINALES

Resumen.....	34
Introducción.....	35
Materiales y métodos.....	36
Resultados y discusión.....	40
Conclusiones.....	45

CAPITULO VI. SELECCIÓN DE CONSORCIOS DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES CON BASE EN LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO EN *Catharanthus roseus* (L.) G. DON.

Resumen.....	46
Introducción .....	47
Materiales y métodos .....	48
Análisis estadístico .....	49
Resultados y discusión .....	50
Conclusiones .....	57

CAPITULO VII.

APLICACIÓN DE BICARBONATO DE POTASIO Y CLORURO DE SODIO EN PLANTAS MICORRIZADAS DE *Catharanthus roseus* (L.) G. DON. Y SU EFECTO EN EL CONTENIDO DE VINBLASTINA Y VINCRISTINA

Resumen.....	58
Introducción.....	59
Materiales y métodos.....	60
a) Crecimiento y evaluación de actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y alcaloides por efecto de estrés abiótico.....	60
b) Evaluación del poder reductor por el ensayo de FRAP, Tamizaje fitoquímico y determinación de los alcaloides vincristina y vinblastina por Resonancia magnetica nuclear de protón (RMN <sup>1</sup> H) en <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. ....	63
Resultados y discusión.....	65
a) Crecimiento y evaluación de actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y alcaloides por efecto de estrés abiótico .....	65
b) Evaluación del poder reductor por el ensayo de FRAP, Tamizaje fitoquímico y determinación de los alcaloides vincristina y vinblastina por Resonancia magnetica nuclear de protón (RMN <sup>1</sup> H) en <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. ....	91
Conclusiones.....	97

CAPÍTULO VIII	
CONCLUSIONES GENERALES.....	98
LITRATURA CITADA.....	100
ANEXO .....	116

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 4.1	Compuestos orgánicos presentes en las plantas medicinales ..... 12
Cuadro 4.2	Clasificación actual de los hongos micorrízicos arbusculares ..... 24
Cuadro 5.1	Géneros de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), porcentajes de colonización micorrízica arbuscular y número de esporas presentes en la rizósfera de plantas medicinales recolectadas en áreas naturales de bosques mixtos..... 41
Cuadro 6.1	Colonización micorrízica, número y peso seco de flores y botones en <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares aislados de plantas medicinales después de 70 días..... 52
Cuadro 7.1	Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y la aplicación de cloruro de sodio (NaCl), y bicarbonato de potasio (KHCO <sub>3</sub> ), sobre el número de hojas, flores y botones florales en plantas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días ..... 67
Cuadro 7.2	Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y la aplicación de cloruro de sodio (NaCl) y bicarbonato de potasio (KHCO <sub>3</sub> ), sobre el peso seco de hojas, flores y botones florales, tallo y raíz en plantas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días ..... 69
Cuadro 7.3	Capacidad reductora de Fe <sup>+3</sup> a Fe <sup>+2</sup> mediante el ensayo FRAP en extractos metanolicos en hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., en cuatro tratamientos seleccionados..... 92
Cuadro 7.4	Metabolitos secundarios en extractos metanolicos en hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don..... 94

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 4.1	Códice Florentino. Capítulo de las Hierbas Medicinales..... 9
Figura 4.2	El Códice de la Cruz-Badiano ..... 10
Figura 4.3	Diagramas de los tipos de micorriza arbuscular, en las raíces de la planta hospedante. (a) <i>Paris</i> , (b) <i>Arum</i> y (c) <i>Paris</i> y <i>Arum</i> ..... 16
Figura 4.4	Desarrollo del arbusculo en la célula hospedante..... 17
Figura 4.5	Diagrama de hifas extramatriciales del hongo micorrízico arbuscular 18
Figura 4.6	Esquema del desarrollo de hifas intramatriciales y estructuras del hongo micorrízico arbuscular en la raíz..... 19
Figura 4.7	Etapas en la formación de la micorriza arbuscular..... 22
Figura 4.8	Estructura química de cuatro alcaloides indólicos presentes en <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. .... 32
Figura 5.1	Evaluación de la colonización por hongos micorrízicos arbusculares en el sistema radical de las plantas, con base en las raíces teñidas en el portaobjetos ..... 38
Figura 5.2	Esporas de hongos micorrízicos arbusculares identificados de la rizósfera de plantas medicinales obtenidas en campo. .... 43
Figura 5.3	Esporas de hongos micorrízicos arbusculares identificados de la rizósfera de plantas medicinales obtenidas en campo..... 44
Figura 6.1	Número de hojas y área foliar en <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares aislados de plantas medicinales después de 70 días. ... 51
Figura 6.2	Peso seco de hojas, tallo y raíz en <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares aislados de plantas medicinales después de 70 días..... 56

Figura 7.1	Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el peso seco total de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días.....	73
Figura 7.2	Peso seco total de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto de la aplicación de estrés abiótico e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares, después de 75 días. ....	74
Figura 7.3	Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el área foliar de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días. ....	76
Figura 7.4	Área foliar de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto de la aplicación de estrés abiótico e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares, después de 75 días.....	77
Figura 7.5	Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el actividad antioxidante de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días .....	79
Figura 7.6	Actividad antioxidante total en hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto del estrés abiótico e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares, después de 75 días. ....	80
Figura 7.7	Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el contenido de compuestos fenólicos de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días.....	82
Figura 7.8	Contenido de compuestos fenólicos totales en hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto del estrés abiótico e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares, después de 75 días. ....	83
Figura 7.9	Efecto del factor inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en el contenido los alcaloides de vinblastina y vincristina, en hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días.....	86
Figura 7.10	Efecto de la aplicación de factores de estrés abiótico en el contenido de los alcaloides vinblastina y vincristina, en hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 días.....	87
Figura 7.11	Contenido de alcaloides vinblastina y vincristina en hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., por efecto del estrés abiótico después de 75 días.....	89

Figura 7.12	Efecto de la aplicación de factor de estrés abiótico, en el porcentaje de colonización micorrízica en raíces de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., después de 75 día.....	91
Figura 7.13	Protones utilizados en RMN1H para la comparación entre los estándares y los tratamientos empleados.....	94
Figura 7.14	Espectros de RMN de los estándares vinblastina y vincristina.....	95

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Latinoamérica constituye la región más rica en diversidad vegetal a nivel mundial, Brasil, Colombia, Perú, Venezuela y México se destacan por presentar el mayor número de especies. Aproximadamente, el 50 % de esa diversidad se emplea para satisfacer alguna necesidad humana, y desde luego, las plantas medicinales (PM) ocupan el principal porcentaje (Estrada, 2002a).

Las PM son parte de nuestra historia, el ser humano desde su origen tuvo que aprender a cazar, vestirse y curarse (desde una perspectiva “espiritual o científica”) para obtener su bienestar. Es evidente que esta tendencia, inherente al ser humano, está presente en todo momento y en donde ha existido alguna sociedad, por primitiva que ésta parezca. Estas sociedades practicaban de manera empírica y a base de prueba y error, muchas de las disciplinas científicas actuales, entre ellas la medicina. Nuestros ancestros para sobrevivir tenían que ser espectadores cuidadosos de la naturaleza, de la cual pudieran seleccionar vegetales que tenían la propiedad de sanar o mitigar el dolor, pero también de sustancias tóxicas que le podían producir alucinaciones o incluso la muerte. Con el paso de los años y el cambio de las tribus nómadas a sedentarias, esos conocimientos, entre otros, se consolidaron y, el desarrollo de un lenguaje estructurado permitió su difusión con mucha mayor eficacia. La jerarquización de labores en las sociedades primitivas permitió que algunos integrantes del grupo comenzaran a especializarse en el manejo y utilización de plantas con fines curativos, estableciendo una incipiente ciencia médica que quedó en manos del llamado “chamán” o brujo. Los conocimientos generados fueron pasando verbalmente generación tras generación, hasta consolidarse como una materia de estudio con la finalidad de mantener el bienestar del ser humano y obtener materias primas

naturales que le proporcionaron mejor calidad de vida. Es aquí donde inicia de manera primitiva el progreso del estudio de las plantas medicinales hasta llegar a nuestros días como una ciencia consolidada (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004).

Actualmente, las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos, conocidos como metabolitos secundarios, que son utilizados como fármacos, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo que tiene una serie de desventajas, por ejemplo su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estacionales o de estrés, etc. (Trejo y Rodríguez, 2007).

Por otro lado actualmente, los microorganismos benéficos del suelo juegan un papel fundamental en el desarrollo de las plantas; entre ellos, se destacan los hongos formadores de micorriza arbuscular, los cuales han sido reportados por contribuir en el crecimiento de la planta hospedante y en la síntesis de algunos metabolitos secundarios (Guerra, 2008; Toussaint *et al.*, 2007).

Por lo anterior, el estudio científico de la acumulación de metabolitos secundarios en las plantas es fundamental, y en el cual la micorriza arbuscular juega un papel determinante, siendo su presencia de suma importancia en la síntesis, acumulación y calidad de los metabolitos secundarios (Khaosaad *et al.*, 2006; Kapoor *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO II

### JUSTIFICACIÓN

La tendencia a utilizar plantas como medicina alternativa se ha incrementado actualmente de manera significativa. Sin embargo, a pesar de que las plantas son fuente de una enorme variedad de compuestos químicos (metabolitos secundarios), tienen la desventaja de acumularlos en baja proporción, ya que su síntesis está regulada espacial y temporalmente por diversos factores. La producción de los fármacos como la vinblastina y la vincristina, derivados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., son de alta demanda por su actividad en el tratamiento contra la leucemia linfoblástica aguda y los mielomas. La demanda de estos compuestos es difícil de abastecer, ya que para obtener 1 g de vinblastina por ejemplo, se necesita media tonelada de hojas secas de la planta. Actualmente diversos trabajos muestran que la aplicación de algún factor de estrés en la planta medicinal puede influir de manera directa en la síntesis del metabolito secundario. Por otro lado, existen numerosos informes acerca del efecto positivo que ejerce la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, no hay reportes que indiquen el efecto de HMA aplicados solos o en combinación de algún estrés abiótico, en la concentración de vinblastina y vincristina en *C. roseus*. Por lo anterior, este trabajo evaluó el efecto del bicarbonato de potasio, cloruro de sodio y la interacción de HMA en el contenido de vinblastina y vincristina en *C. roseus*. Este estudio generó información básica relacionada con la utilización del bicarbonato de potasio y/o cloruro de sodio como compuestos alternativos para estimular la síntesis de uno o ambos alcaloides. Además, se aporta mayor evidencia de los HMA como elementos biológicos dirigidos al estímulo de la producción de vinblastina y vincristina.

## CAPÍTULO III

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### Objetivo general

- Determinar el efecto de la inoculación con hongos micorrízicos arbusculares y estrés abiótico inducido por la aplicación de cloruro de sodio y/o dosis de bicarbonato de potasio en el crecimiento y contenido de alcaloides (vinblastina y vincristina) en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

#### Objetivos específicos

- Identificar a nivel de género los grupos taxonómicos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de consorcios obtenidos de la rizósfera de plantas medicinales y propagados mediante cultivo trampa en invernadero.
- Realizar un estudio comparativo del comportamiento de ocho consorcios de HMA en el crecimiento de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.
- Evaluar el efecto del estrés inducido con la aplicación de dos dosis de bicarbonato de potasio y la aplicación de cloruro de sodio en el contenido de vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., inoculadas con HMA previamente seleccionados.

## Hipótesis general

- La inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en combinación con la dosis más alta de bicarbonato de potasio favorecerá el crecimiento y contenido de alcaloides (vinblasina y vincristina) en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

## Hipótesis específicas

- Los consorcios obtenidos de plantas medicinales, expresaran variabilidad en la riqueza taxonómica de hongos micorrízicos arbusculares.
- De los consorcios micorrizicos a evaluar existirá variación en la compatibilidad y efectividad en el crecimiento de *Catharanthus roseus*.
- La inoculación de plantas de *Catharanthus roseus* con hongos micorrízicos arbusculares y la aplicación de bicarbonato de potasio y cloruro de sodio estimularan el contenido de alcaloides (vincristina y vinblastina) en hojas de la planta.

**CAPÍTULO IV**  
**REVISIÓN DE LITERATURA**  
**LAS PLANTAS MEDICINALES Y SU RELACIÓN CON LA MICORRIZA**  
**ARBUSCULAR**

**Las plantas medicinales**

Día a día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, de forma tal que varias disciplinas como la etnobotánica y la fitoterapia, por ejemplo, están tomando gran importancia, tanto en la medicina aplicada como en la investigación experimental. Aproximadamente el 80 % de la población mundial, utiliza plantas como principal remedio medicinal en muchos de sus malestares. Llama la atención la creciente demanda de estas plantas sobre todo en los países desarrollados donde resurge la necesidad de lo natural y el rechazo a la medicina de patente. Por otra parte, en los países de menor desarrollo, las plantas constituyen un recurso ancestral transmitido de generación en generación (Martínez, 2000).

**Definición**

Una planta medicinal es todo aquel vegetal que en uno a más de sus órganos, sintetiza o almacena productos denominados principios activos. Su utilidad es de servir como droga (parte de la planta medicinalmente utilizada como medicamento) que alivie o neutralice el desequilibrio orgánico generado por una enfermedad (Ratera y Ratera, 1980; Muñoz, 2002; Vidal, 2003).

**Antecedentes históricos del uso de plantas medicinales**

Desde los tiempos más remotos el hombre ha utilizado las plantas, ya sea para alimentarse y para otros muchos usos como: medicinales, aromatización de alimentos, para cosméticos, entre otros (Villarino, 1999).

Los textos que se refieren a la historia de la medicina nos dice que el uso de las plantas medicinales se remonta a los tiempos más antiguos de la humanidad. Es probable que las propiedades medicinales de las plantas fueran aprovechadas desde la época de Neardenthal (hace 60. 000 años), ya que en los yacimientos arqueológicos de esa época en Shanidar, Irak, se ha hallado polen de plantas medicinales, pudiendo citarse la milenrama, el malvavisco, la centaurea y la efedra (Ratera y Ratera, 1980; Villarino, 1999)

Uno de los manuales de medicina más antiguo que se conoce, fue escrito hacia el final del tercer milenio antes de Jesucristo, y se halló enterrado entre las ruinas de Nippur, desde hacía más de 4,000 años. Este manual consiste en una tableta de arcilla en la que había inscritos nombres de una docena de remedios. También desde épocas muy remotas, datan los famosos papiros hallados en el antiguo Egipto. Estos papiros (Papiro de Kahun, 1900 a. de J.C.; Papiro de Ebers, 1500 a. de J.C., y otros) contienen instrucciones terapéuticas. En la medicina asirio-babilónica, se empleaban alrededor de 250 especies de vegetales con fines curativos. Los pueblos asirio-babilonios encontraron más de 800 tabletas médicas escritas con indicaciones sobre remedios y plantas medicinales, destinados a curar diversas enfermedades (Ratera y Ratera, 1980).

En la Edad Media, los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria farmacia. En el siglo XIII los alquimistas vendían aceites esenciales, siendo la esencia de romero una de las primeramente aisladas (Muñoz, 2002).

Con los avances en química analítica, en el siglo XIX se practicaron los primeros análisis químicos de las esencias y de otros principios activos de los vegetales, naciendo así la farmacoquímica. A comienzo de ese mismo siglo, en 1811, se produjo un hecho importante, el aislamiento de la morfina, alcaloide del opio, al que posteriormente siguieron

el aislamiento de otros principios activos (Villarino, 1999; Muñoz, 2002). Todo ello promovió el desarrollo de la investigación, a escala mundial, para conocer la composición química de los vegetales. A finales del siglo XIX y principios del XX se inició la producción general de medicamentos sintéticos y con ello, la base de la industria farmacéutica. Ante tal desarrollo tecnológico, pareció entonces que las plantas medicinales iban a caer en desuso. Pero al constatar los efectos secundarios de los fármacos sintéticos, se recuperó el interés por la terapéutica vegetal con investigaciones continuadas y cada vez más profundas (Villarino, 1999).

Gran parte del conocimiento de la flora medicinal se encuentra en las obras históricas hechas por los indígenas de las diferentes culturas de México y en las crónicas y escritos elaborados por algunos españoles. De la variedad de documentos inmediatos a la conquista, destacan tres obras fundamentales en la bibliografía médica mexicana: El Códice Florentino, El Códice de la Cruz-Badiano y Obras completas del Protomédico español Francisco Hernández. Cronológicamente pertenecen al siglo XVI, y estas tres obras son conocidas como la farmacopea náhuatl (Estrada, 2002b).

### **Códice Florentino**

Dentro la cultura Azteca o Mexica y con la llegada de los españoles fue que se originó lo que hoy conocemos como el “Códice Florentino” o “Historia General de las Cosas de Nueva España” (Figura 4.1). La edición facsímil revisada del Códice Florentino, obra escrita entre los años de 1548 a 1585 de Fray Bernardino de Sahagún, comprende todas las materias fundamentales del pensamiento indígena. El Códice está escrito en dos columnas, una en náhuatl y otra en caracteres latinos, presentada en tres tomos, conteniendo 12 libros. El Códice Florentino en varias de sus partes contiene información etnobotánica,

ya que proporciona los nombres, las descripciones y las características de muchas plantas mesoamericanas desde el punto de vista indígena (Códice Florentino Estrada, 1990).



Figura 4.1. Códice Florentino. Capítulo de las Hierbas Medicinales (Códice Florentino)

### El Códice de la Cruz-Badiano

Martín de la Cruz redactó un herbario y probablemente, él pudiera haber sido el autor de las pinturas de las plantas que ilustran el manuscrito y tener así una razón válida para darle la responsabilidad de escribir el documento ordenado por Francisco de Mendoza, hijo del primer virrey de Nueva España, para regalarlo al Rey de España. Este regalo aparentemente tenía el propósito de reconciliar ante el monarca a los indios que se educaban en el Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco, institución muy atacada por algunos

españoles a mediados del siglo XVI. En el campo de la botánica medicinal el manuscrito contiene información sobre 251 plantas, de las cuales 185 fueron ilustradas, a partir de aquellas que fue posible obtenerlas frescas y en floración, cuando se trataba de fanerógamas. La obra recibió el título de *Libellus de medicinalibus Indorum Herbis* y quedó concluida en 1552 (Figura 4.2). La división de los capítulos del *Libellus* muestra un intento de clasificación basada en la localización anatómica donde se situaba la enfermedad (De la Cruz, 1964; De la Cruz, 1996).



Figura 4.2. El Códice de la Cruz-Badiano (De la Cruz, 1964)

## **Obras Completas del Protomédico Español Francisco Hernández**

Esta obra se inicia cuando Felipe II ordena a Francisco Hernández que parta a la Nueva España, porque se sabe que existe una enorme biodiversidad en plantas medicinales. Para dicha tarea reúne a personal calificado que proporcione información interesante. Al llegar Hernández a América comienza a recabar información de las plantas medicinales que se localizaban en el lugar, dentro de esta información estaba la localización de donde crecían, el clima, la forma de cultivo, su uso, la forma de empleo, vía de aplicación, etc. (Estrada, 2002b).

La obra de Francisco Hernández, incluye 3076 plantas, y se trata de una descripción exhaustiva, producto de siete años de estudio y viajes por diversas regiones de la Nueva España. Incluye plantas sin utilidad médica o de otro orden, pero a la mayoría de ellas se les atribuyen propiedades medicinales. A pesar de la gran influencia española que tiene esta obra, es importante porque nos proporciona los productos naturales del Nuevo Mundo y sus aplicaciones medicinales, además de las características vegetativas de las plantas mencionadas (De la Cruz, 1996; Estrada, 2002b).

### **Naturaleza de los componentes químicos de las plantas medicinales**

Los componentes químicos de las plantas medicinales son generalmente abundantes y de estructura química diversa. Según su naturaleza química se pueden clasificar en inorgánicos y orgánicos.

#### **Inorgánicos**

El agua es un componente inorgánico, el cual está presente en cantidades variables, en función del órgano donde se encuentre, generalmente las hojas y los tallos contienen más cantidad de agua, en comparación con las semillas. El otro componente inorgánico son

los minerales, algunos se encuentran en forma de sales solubles (cloruros, sulfatos, nitratos, fosfatos, etc.), otros formando sales cristalizadas (carbonato de calcio, oxalato de calcio, etc.) y ciertos oligoelementos (magnesio, manganeso, silicio, hierro, yodo, flúor, etc.) se encuentran combinados con sustancias orgánicas presentes en el vegetal (Kuklinski, 2003).

### Orgánicos

La diversidad de compuestos orgánicos presentes en las plantas son producto del metabolismo primario y secundario (Cuadro 4.1). Los metabolitos primarios como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, y ácidos orgánicos están implicados en el crecimiento y el desarrollo, la respiración, la fotosíntesis, y la síntesis de hormonas y proteínas. Los metabolitos secundarios, se distribuyen entre varios grupos taxonómicos dentro del reino Plantae. Dentro de sus funciones principales se tiene que determinan el color de la planta, protegen a la planta contra herbívoros y microorganismos, atraen a polinizadores, animales dispersores de semillas, y actúan como indicadores cuando la planta se encuentra bajo tensión; sin embargo, muchas de sus funciones siguen siendo desconocidas (Hounsoume *et al.*, 2008).

Cuadro 4.1. Compuestos orgánicos presentes en las plantas medicinales (Kuklinski, 2003).

Compuestos procedentes del metabolismo primario	Compuestos procedentes del metabolismo secundario
a) Glucidos (azúcares simples, oligosacáridos, polisacáridos) b) Lípidos y ceras vegetales c) Aminoácidos y proteínas d) Ácidos nucleicos e) Compuestos nitrogenados: glucósidos cianogenéticos, glucosinolatos, enzimas	a) Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos b) Derivados fenólicos: 1.-Shikimatos: Fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos c) Acetatos: Quinonas, antracénósidos d) Alcaloides

## **Principio activo**

Los principios activos de las plantas medicinales son sustancias que son sintetizados y almacenados en el curso de su crecimiento a través de su metabolismo. Sin embargo, no todos tienen un valor medicinal directamente aprovechable. En todas las especies están presentes al mismo tiempo, principios activos y sustancias acompañantes. Casi siempre en una misma planta existen varios componentes medicinalmente activos, de los cuales uno de ellos, el principal, determina las aplicaciones que tendrá la especie en cuestión. Sin embargo, el grado en el que los componentes secundarios influyen sobre la acción queda manifestado al aislar el principio activo principal. Es muy frecuente que su efecto sea entonces totalmente distinto. Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta. Se concentran preferentemente en las flores, las hojas, las raíces, los frutos, la corteza y/o a veces en las semillas. El contenido en principios activos en una planta medicinal oscila dependiendo del hábitat de la misma, de la recolección y de la preparación (Rizk, 1987; Pahlow, 1994; Álvarez, 2007; Arroyo *et al.*, 2007).

### **Definición**

Los principios activos son metabolitos secundarios del vegetal y no tienen un papel esencial en los fenómenos vitales de las plantas. Sus estructuras químicas son muy diversas, pudiendo tratarse de compuestos bien definidos (alcaloides, flavonoides, etc.) o de mezclas complejas. Su utilidad primordial es servir como medicamento que alivie el malestar y restablezca la salud (Villarino, 1999; Muñoz, 2002).

### **Métodos generales de obtención de principios activos**

Hay varios métodos extractivos para aislar los principios activos directamente de la planta, de los cuales se pueden mencionar los siguientes (Kuklinski, 2003):

a) Extracción mecánica. Esta técnica permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta. La extracción mecánica se realiza ejerciendo una presión sobre la planta con calor y mediante incisiones por las que fluyen los fluidos de la planta.

b) Destilación. Esta técnica se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la planta, lo cual permite la separación de componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles. Se suelen hacer destilaciones por arrastre de vapor o hidrodestilaciones que facilitan la extracción de principios activos volátiles. La destilación permite obtener por ejemplo, las esencias de la planta, y se basa en la utilización de una fuente de calor por lo que sólo es aplicable a principios activos termoestables.

c) Extracción con gases en condiciones supercríticas. Para tal fin, se trabaja con dispositivos especiales donde es posible controlar la presión y la temperatura. La extracción con gases suele ser muy selectiva y posteriormente, es relativamente sencillo eliminar el gas extractor, pero resulta muy cara y es difícil encontrar las condiciones óptimas de presión y temperatura.

d) Extracción con disolventes. Este proceso consiste en poner en contacto la planta con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben pasar de la planta al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente, dicho extracto se puede concentrar eliminando mayor o menor cantidad de disolvente. La extracción con disolventes es uno de los métodos que se emplean con más frecuencia para la obtención principios activos.

## **Micorriza arbuscular**

### **Definición**

El término micorriza literalmente significa “raíces fungosas” y fue utilizado por primera vez en 1885 para describir la íntima asociación entre hongos micorrízicos y las raíces de las plantas, que se caracteriza por no ser patógena (Frank, 2005; Bucher, 2006). La micorriza arbuscular (MA) se define como una estructura especializada, la cual se origina al asociarse mutuamente diversos grupos de hongos específicos con la raíz de las plantas vasculares (Alarcón, 2007).

### **Tipos morfológicos de la micorriza arbuscular**

Los hongos micorrízicos arbusculares forman simbiosis con el 85% de las plantas terrestres. Dos clases morfológicas importantes de esta simbiosis fueron identificadas por Gallaud en 1904, las cuales fueron nombradas micorrizas tipo-*Arum* y tipo-*Paris* (Figura 4.1), cuyos nombres están relacionados con las plantas donde fueron encontradas. La mayoría de las plantas cultivadas poseen micorriza tipo *Arum*, que consiste en asociaciones que crecen de manera intercelular a través de la corteza externa, aunque una hifa atraviesa la célula directamente. Una vez dentro de la corteza interna, el hongo forma las hifas dicómicamente ramificadas (arbúsculos) dentro de las células corticales (Dickson, 2004; Harrison, 2005). Muchas especies herbáceas y árboles silvestres forman micorriza tipo *Paris*, la cual se caracteriza por la ausencia o escaso desarrollo de hifas intercelulares, y en lugar de arbúsculos dentro de las células corticales, se presenta el desarrollo de enrollamientos (Smith-Smith, 1997; Dickson, 2004).

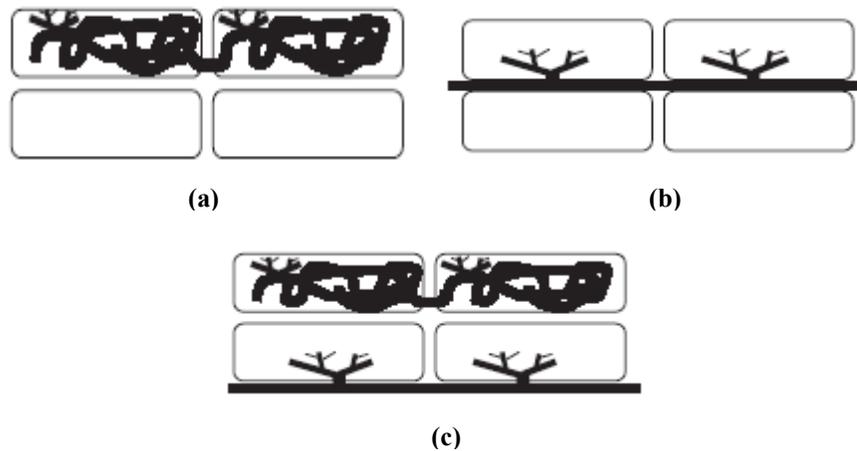


Figura 4.3. Diagramas de los tipos de micorriza arbuscular, en las raíces de la planta hospedante. (a) *Paris*, (b) *Arum* y (c) *Paris* y *Arum* (Dickson, 2004).

#### **Características morfológicas de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA)**

La MA se caracteriza principalmente por formar estructuras tanto extramatriciales como intrarradicales (Alarcón, 2007). Cuyas estructuras se describen de manera general a continuación.

Son nombrados HMA porque dentro de las células corticales de las raíces forman estructuras ramificadas llamadas arbusculos (Figura 4.2). Los arbusculos son estructuras hifales, ramificadas en la parte final, que pueden llenar la mayor parte del lumen de las células de la corteza, y proporcionan una superficie de transferencia nutrimental entre la planta y el hongo, principalmente carbono y fósforo (Harrison, 2005; Sekhara *et al.*, 2007).

El establecimiento del arbusculo dentro de las células, es acompañado de cambios en la organización celular de la célula hospedera, dentro de éstos cambios se encuentran la fragmentación vacuolar, migración del núcleo de la periferia al centro y reorganización del citoesqueleto (Strasburger *et al.*, 2004; Reinhardt, 2007; Uehlein *et al.*, 2007). Sin embargo, después de 4 a 10 días los arbusculos se colapsan, producto posiblemente del ambiente

continuamente agotador de la célula del hospedante. Cuando el hongo deja de vivir en la célula ésta vuelve a su estado inicial (Strack *et al.*, 2003; Paszkowski, 2006).

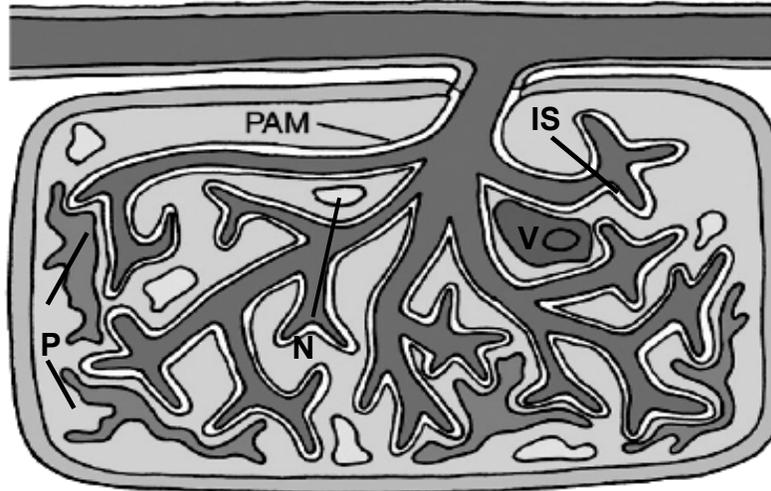


Figura 4.4. Desarrollo del arbusculo en la célula hospedante. Durante la colonización fragmentos de la vacuola (V) y los núcleos migran a posición central (N). Los plastidios (P) forman estructuras tubulares que se asocian con finas hifas del arbusculo. Éstas quedan rodeadas por la membrana periarbuscular (PAM), la cual es continua con el plasmalema. El espacio entre la PAM y el plasmalema del hongo se denomina interfase simbiótica (IS), la cual consta de restos de la pared celular del hongo y material apoplástico de la planta. Finalmente, el arbusculo ocupa una gran parte del volumen celular (Smith-Smith, 1997).

Junto con los arbusculos, la micorriza arbuscular se caracteriza por presentar otras estructuras denominadas vesículas. Las vesículas contienen lípidos y son probablemente las estructuras donde se almacenan compuestos de carbono, y su formación depende del simbionte fúngico así como de las condiciones ambientales (Hodge, 2000).

En la simbiosis micorrízica se desarrolla una extensa red de hifas extramatriciales (Figura 4.5) constituida por hifas exploradoras primarias, encargadas de comenzar un desarrollo abundante en el medio, las cuales dan origen mediante ramificaciones, a hifas

exploradoras de ordenes superiores (secundarias, terciarias, etc). Cuando la planta se asocia con el hongo para formar la micorriza arbuscular, se incrementan los nutrientes absorbidos de la solución del suelo por las plantas hospedantes, debido a que el micelio extrarradical proporciona un camino directo para el desplazamiento del carbono derivado de la fotosíntesis, estableciéndose una ruta de transferencia de fotoasimilados (Bago *et al.*, 2000; Toljander *et al.*, 2007).

En la actualidad, se discute, cómo las hifas exploradoras de orden secundario, poco después del ápice, forman unas ramificaciones cortas que a su vez se ramifican de manera dicotómica para dar lugar a estructuras con apariencia de árbol, denominadas estructuras ramificadas de absorción (branched absorbing structures, BAS). La función de estas BAS puede estar relacionada con la absorción de nutrimentos como fósforo y nitrógeno, pero no de carbono, lo que las diferencia de los arbusculos (Bago *et al.*, 2000).

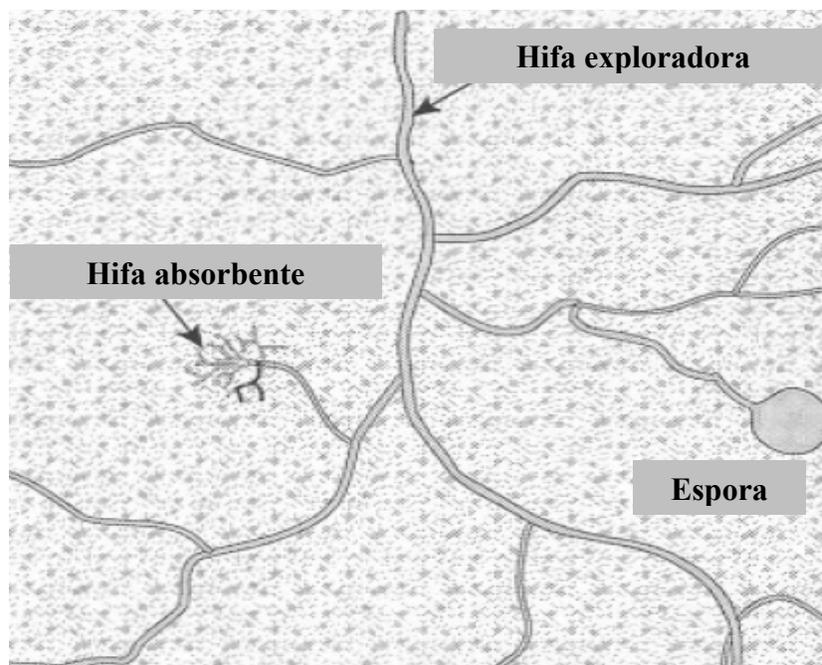


Figura 4.5. Diagrama de hifas extramatriciales del hongo micorrízico arbuscular (Brundrett y Abbott, 2002).

Por otro lado, las hifas intrarradicales o internas (Figura 4.6) permiten la dispersión de la asociación dentro del sistema radical, la cual está regulada de tal forma que su colonización sólo comprende las células del córtex de la raíz (Alarcón, 2007).

Finalmente las esporas, que son estructuras de propagación, son generalmente producidas en el suelo, aunque algunas especies de *Glomus* tienen la capacidad de formarlas en el interior de la raíz. En su interior contienen sustancias lipídicas. El ciclo de vida del hongo formador de micorriza arbuscular se inicia con la germinación de las esporas, las cuales, pueden ser solitarias o agrupadas en esporocarpos (Maia y Yano, 2001; Strack *et al.*, 2003).

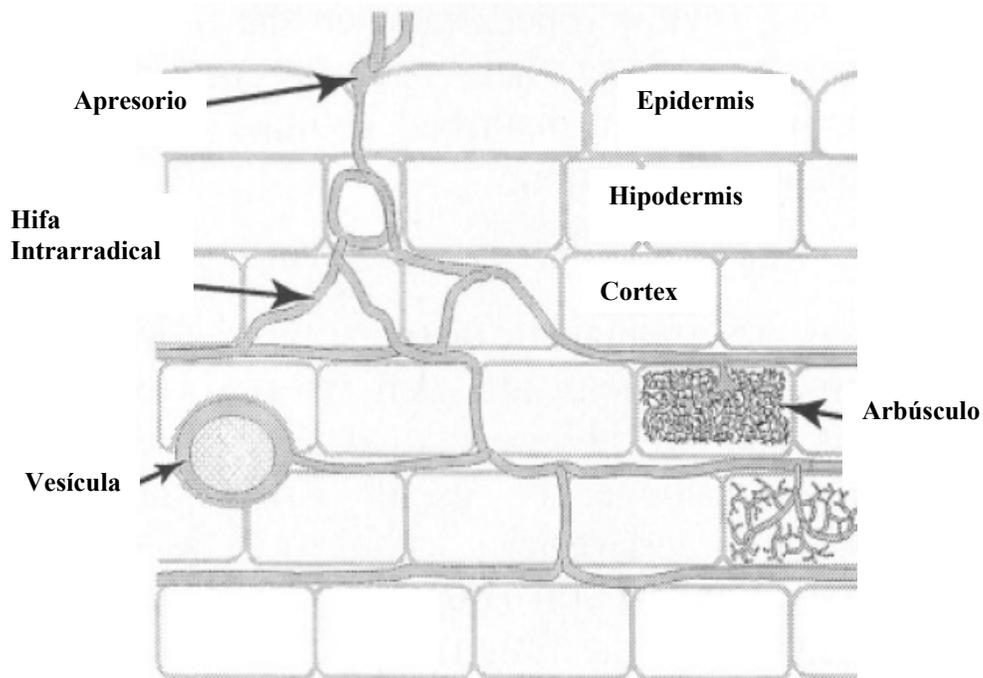


Figura 4.6. Esquema del desarrollo de hifas intramatriciales y estructuras del hongo micorrízico arbuscular en la raíz (Brundrett y Abbott, 2002).

Las esporas poseen un valor taxonómico, ya que las especies de HMA a menudo se identifican basándose en la interpretación de las características morfológicas de las esporas como las características de la pared, cuyo número y posición de capas son de suma importancia (Alarcón, 2007; Rosendahl, 2008).

Las esporas son los propágulos más importantes para el hongo micorrízico arbuscular ya que el impacto que estos organismos producen en su hospedante dependerá de la capacidad de germinación y colonización en el sistema radical. La germinación de la espora se puede ver afectada por muchos factores, tales como: a) la necesidad de un período de inactividad, b) exudados de la raíz y/o de compuestos volátiles, c) humedad del suelo, d) temperatura, e) pH, f) luz, g) CO<sub>2</sub>, h) flavonoides y c) la presencia de bacterias (Maia y Yano, 2001).

### **Desarrollo de la simbiosis**

El desarrollo de la simbiosis requiere que ambos simbioses experimenten cambios morfológicos significativos los cuales son coordinados por un intercambio recíproco de señales. Poco se sabe sobre las interacciones moleculares antes y durante del contacto entre el hongo y las raíces de la planta, debido principalmente a las dificultades en la sincronización del desarrollo en los dos simbioses (Balestrini y Lanfranco, 2006; Herrera-Medina *et al.*, 2007). Sin embargo, durante la formación de la micorriza arbuscular, el hongo experimenta varias fases de desarrollo (Balestrini y Lanfranco, 2006), la fase asimbiótica, la fase presimbiótica y la fase simbiótica (Figura 4.7).

La fase asimbiótica fúngica se restringe a la germinación de la espora y a la producción de una cantidad limitada de micelio, lo cual ocurre en ausencia de la planta hospedante (Balestrini y Lafranco, 2006; Bucher 2006). En esta fase la espora tiene diámetros medios entre 50 y 100  $\mu\text{m}$  y una pared celular gruesa, además de un número

grande de núcleos (hasta 2000 por espora). Durante la fase asimbiótica el hongo vive principalmente de sus reservas de triacilglicéridos, ya que las fuentes de carbono y nitrógeno en el medio en el que se localiza, tienen poco efecto sobre su desarrollo (Requena *et al.*, 2007).

En presencia de raíz, los exudados estimulan a la etapa presimbiótica que es caracterizada por una ramificación extensa de las hifas, mediante la cual el hongo entra en contacto con la superficie de la raíz, formando un apresorio en la epidermis, previo a la penetración hifal (Bucher, 2006; Requena *et al.*, 2007). Los apresorios son estructuras responsables del contacto y la penetración del tejido radical. El desarrollo del apresorio se acciona por la topografía de las células epidérmicas, aunque es necesario que las células estén vivas e intactas para la colonización (Balestrini y Lafranco, 2006).

En un trabajo reciente, se demostró que las células epidérmicas de la planta hospedante reorganizan profundamente su citoplasma cuando el hongo se adhiere a la superficie de la raíz. La célula de la planta construye un compartimiento apoplástico, organizando un aparato de la pre-penetración (PPA), en donde el hongo se prepara para penetrar (Balestrini y Lafranco, 2006).

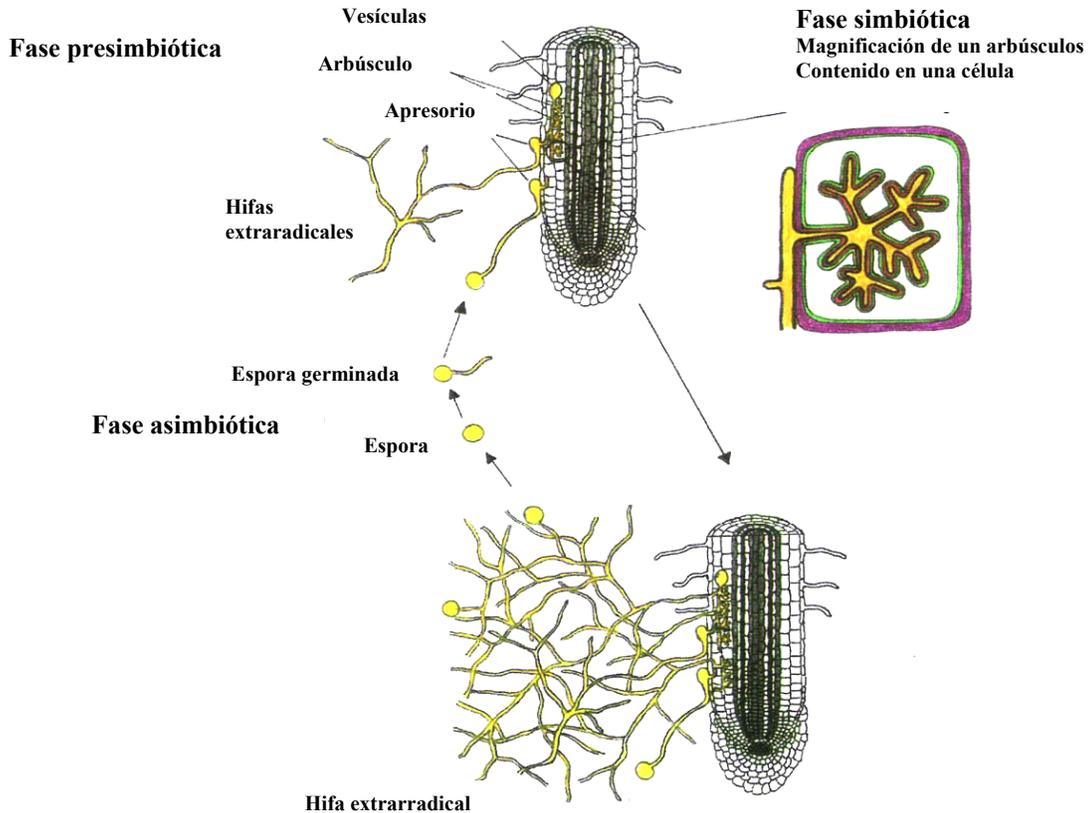


Figura 4.7. Etapas en la formación de la micorriza arbuscular (Balestrini y Lafranco, 2006).

Después de la formación del apresorio, se continúa con la etapa simbiótica en las células corticales de la raíz, que implica la formación de arbusculos intracelulares (estructuras abundantemente ramificadas) o los enrollamientos hifales, y concomitantemente, la producción de micelio extraradical esporulativo. Finalmente, la colonización fúngica de una célula cortical de la raíz lleva al desarrollo del arbúsculo que se caracteriza por ser la interfase raíz-hongo, sitio donde ocurre el mutuo intercambio de nutrientes y metabolitos (Bucher, 2006).

### **Taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares**

El registro fósil y los datos moleculares demuestran que la historia evolutiva de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se dio por lo menos en el periodo Ordovícico

(hace 460 millones de años), coincidiendo con la colonización del ambiente terrestre por las primeras plantas. En aquél momento, la flora de la tierra consistía solamente en plantas briofitas. (Redecker, 2002; Sánchez, 2005). Los HMA, con cerca de 157 especies descritas, establecen la asociación simbiótica más distribuida entre las plantas (Da Silva *et al.*, 2006).

Los HMA se agruparon inicialmente en el Phylum Zygomycota y originalmente habían sido clasificados en la familia Endogonaceae, en el orden Mucorales, debido a la semejanza superficial entre las esporas de las especies del género *Endogone* y las de las especies *Glomus esporcarpico*. Esta semejanza no tuvo validez, como criterio de grupo, debido a que *Endogone* spp., forma zigosporas sexuales, mientras que los HMA producen únicamente esporas asexuales. Más tarde, los HMA se agruparon en el orden Glomales. Sin embargo, la evidencia molecular (basada en la secuencia de la subunidad pequeña de ARN) complementó la evidencia morfológica que afirma que este grupo tiene un linaje distinto y es un grupo supuestamente hermano de Basidiomycota y Ascomycota (Guerra, 2008). Actualmente, las secuencias ribosomales del ADN indican que la diversidad dentro los HMA es mucho más alta que aquella basada solamente en la taxonomía tradicional, donde la interpretación de las características morfológicas de las esporas es muy importante (Redecker, 2002; Rosendahl, 2007). Actualmente, los HMA se agrupan en el Phylum Glomeromycota y en la clase Glomeromycetes que incluye a 13 géneros (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Clasificación actual de los hongos micorrízicos arbusculares

(<http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/>).

Ordenes	Familias	Géneros
Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
Diversisporales	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> y <i>Scutellospora</i>
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> y <i>Kuklospora</i>
	Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>
	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
Archaeosporales	Geosiphonaceae*	<i>Geosiphon</i> *
	Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>
	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i> e <i>Intraspora</i>

\*Familia y género que no corresponde a hongos micorrízicos arbusculares.

### **Beneficios de la micorriza arbuscular**

La micorriza arbuscular es la simbiosis más estudiada debido a la variedad de hábitats donde se encuentra y la cantidad de especies vegetales en las que se establece. Sus beneficios son múltiples como por ejemplo:

a) Incremento en la absorción de nutrimentos. La principal función de la micorriza es el incremento en el volumen del suelo explorado, para favorecer la eficiencia de absorción de nutrimentos por la planta a partir de la solución del suelo. La explicación de esta eficiencia de la utilización de nutrientes es que las hifas fúngicas que se extienden de la raíz son capaces de absorber y transportar fosfato (u otro nutrimento) desde el suelo a la

raíz hospedante. La superficie de absorción ofrecida por la ramificación del micelio externo alrededor de las raíces micorrizadas permite a la planta aprovechar el nutrimento en el suelo más allá de la zona de agotamiento en la superficie radical. Se reconoce actualmente que la respuesta en crecimiento de la planta es a menudo resultado del incremento en nutrición de P y otros nutrimentos como Cu, Zn, Mg, Mn, Ca y N (Douds-Schenck, 1990; González-Chávez *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2007).

b) Protección contra el estrés hídrico. La micorriza arbuscular promueve la resistencia a deficiencias hídricas en la planta por medio de diferentes mecanismos que van desde una respuesta física hasta una bioquímica. Uno de los mecanismos que explica este hecho es que el micelio de los HMA influye en el ambiente edáfico previniendo la formación de claros entre las raíces y el suelo, lo que mantiene la continuidad del líquido en la interfase del suelo y la raíz. Además, las hifas extrarradicales incrementan la zona de captación de agua e incluso pueden tomarla del suelo cuando el agua se encuentra con un potencial hídrico que no permite que sea extraída por las raíces de las plantas (Guadarrama *et al.*, 2004; Panwar *et al.*, 2008).

c) Protección contra la herbivoría. Las micorrizas aumentan la capacidad compensatoria de crecimiento en plantas que son consumidas por herbívoros. Este fenómeno a nivel comunidad fue observado principalmente en plantas C4, donde las plantas micorrizadas expresaron mayor biomasa final aún cuando éstas fueron sometidas a pastoreo. Uno de los mecanismos que explica ese hecho es que la micorriza arbuscular proporciona los nutrimentos que son limitantes después de que es retirado el tejido fotosintético por los herbívoros (Kula *et al.*, 2005).

d) Protección contra patógenos. La protección ejercida por las micorrizas se traduce en la reducción en el daño causado por los patógenos en las plantas que afectan el sistema

radical. Sin embargo, este beneficio no se puede generalizar para todas las plantas, ni frente a todos los patógenos. Entre los mecanismos descritos se incluyen indirectos y directos. Dentro de los mecanismos indirectos se pueden mencionar aquellos derivados de la mejora en la nutrición de la planta, la compensación de los daños producidos por el patógeno o la competencia entre HMA y organismos patógenos por fuentes de carbono y/o por sitios de colonización. Como mecanismos directos están la inducción de cambios citológicos o histológicos en la raíz (que van desde un incremento en la lignificación de las células de la endodermis, estableciendo una barrera entre el patógeno y el cilindro vascular, hasta cambios en las células epidérmicas), cambios en la arquitectura radical de la planta (mayor ramificación), cambios en la exudación radical de las plantas que pueden favorecer el desarrollo de microorganismos antagonistas hacia el patógeno, y finalmente, la activación de mecanismos de defensa de la planta como consecuencia de la colonización micorrízica (Azcón-Aguilar *et al.*, 2004; Pozo y Azcón, 2007).

e) Tolerancia a elementos tóxicos. Diversos reportes mencionan la tolerancia de los HMA a metales pesados. Como ejemplo, se considera la influencia de los HMA en el incremento en la tolerancia en ciertas plantas al arsénico. Se reporta que la presencia de estos hongos disminuyó la captación y la traslocación de arsénico a la parte aérea, debido a que el micelio externo de estos hongos tiene mecanismos para secuestrar al metaloide y podría estar involucrado en procesos específicos de bombeo hacia el exterior de las células (González-Chávez, 2004).

### **Las plantas medicinales y la micorriza arbuscular**

Actualmente existen pocos trabajos relacionados con el estudio de la interacción micorriza arbuscular y plantas medicinales, enfocado al incremento de sus metabolitos

secundarios. La mayoría de éstos se enfocan principalmente a analizar el incremento en el crecimiento en estas especies vegetales. Como ejemplo, se tiene a *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq., (familia Sapindaceae) la cual es una planta característica de las zonas áridas de México, conocida también como Chapulixtle, Ocotillo o Jarilla. *Dodonaea viscosa*, se emplea en medicina tradicional contra problemas gastrointestinales, enfermedades de la piel, gota y reumatismo y en enfermedades venéreas, fiebre y cólicos. Los HMA (*Glomus* sp. Zac-6 y *Glomus* sp. Zac-2) probadas en esta planta produjeron mayores rendimientos de biomasa aérea, en comparación con el testigo (Gardezi *et al.*, 2000).

También se puede mencionar un estudio realizado en *Carica papaya* L. (Familia Caricaceae) la cual es empleada en medicina tradicional, donde altura, diámetro del tallo, número de hojas, floración y fructificación fueron estimuladas por efecto de la inoculación con HMA (Escalona *et al.*, 2000).

*Rubus* es una planta empleada como astringente por algunas comunidades. Carreón *et al.* (2000) reportan que plantas micropropagadas de zarzamora inoculadas con la cepa TIR-1 aislada de rizosfera de maíz cultivado en la localidad de Tiripetio, Michoacán, presentaban significativamente mayor crecimiento, biomasa, contenido de fósforo en hojas y tallos, y mayor porcentaje de sobrevivencia en condiciones de invernadero. Estas observaciones sugieren que dicha asociación ayuda a incrementar el potencial de las plantas micropropagadas para tener éxito al ser transplantadas.

En la actualidad se observa un aumento en la demanda de las plantas medicinales. Lo anterior ha motivado el desarrollo de estrategias para la producción de este tipo de plantas, que a diferencia de las alimenticias en donde lo que importa son los kilos por hectárea, en las medicinales lo que se busca es una mayor concentración de las sustancias activas (principios activos) (Estrada, 2002a).

Con base en lo anterior, actualmente se realizan evaluaciones de la respuesta en el incremento de la concentración de principios activos en plantas medicinales cuando son inoculadas con HMA. Al respecto Khaosaad *et al.* (2006) reportaron el efecto de *Glomus mosseae* en la calidad y cantidad de aceite esencial de tres genotipos de orégano. Dicho trabajo demostró que la micorrización incrementa la concentración del aceite esencial en *Origanum vulgare* var. Cona y *Origanum vulgare* b13/2 en comparación con los tratamientos no micorrizados. En términos de composición del aceite esencial en los tres genotipos, el HMA no produjo cambios significativos. Por otra parte, Morone y Avato (2008) reporta un aumento en la producción de glándulas secretoras en plantas micropropagadas de *O. vulgare* L. ssp. *Hirtum* (Link), al ser inoculadas con *Glomus viscosum*.

Toussaint *et al.* (2007) mostraron resultados sobre el incremento en la producción de antioxidantes (ácido cafeico y ácido rosmarinico) en la parte aérea de *Ocimum basilicum* al ser inoculadas con *Glomus caledonium* y *Glomus mosseae*. Posiblemente el mecanismo por el cual *Glomus caledonium* y *Glomus mosseae* incrementaron la concentración de estos fitoquímicos está relacionado con el suministro de nitrógeno. Una alta asimilación de nitrógeno en las plantas micorrizadas contribuye a la producción de aminoácidos como la tirosina y la fenilalanina, aminoácidos que resultan importantes en la producción de ácido cafeico y rosmarinico. De esta forma, al incrementarse estos aminoácidos, subsecuentemente, existe una alta producción de enzimas importantes en la síntesis de estos antioxidantes.

Kapoor *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la micorrización y el incremento del contenido de artemisina en *Artemisia annua* L. Los resultados muestran que los dos hongos micorrízicos inoculados (*Glomus macrocarpum* y *Glomus fasciculatum*) incrementaron

significativamente la concentración del terpenoide artemisina en la planta. Lo anterior sugiere que el incremento de artemisina está relacionado con la alta densidad de tricomas glandulares foliares (sitio en donde se desarrolla la síntesis de artemisina) encontrados en las plantas micorrizadas, en comparación con las plantas no micorrizadas.

### ***Catharanthus roseus* (L.) G. Don.**

#### **Taxonomía y sinonimia**

La especie conocida comúnmente en los países de habla inglesa como periwinkle o pervinca de Madagascar, ha recibido los siguientes nombres científicos: *Vinca rosea*, *Lochnera rosea*, *Catharanthus roseus*, razón por la que en 1966 Stearn realizó una investigación para determinar cuál de ellos era el nombre correcto, y encontró que desde 1920 los botánicos habían convenido adoptar el nombre de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., para la flora de las Apocinaceas de las Indias Occidentales (Acosta y Rodríguez-Ferrada, 2002; Gordon y Newman, 2005).

#### **Origen y distribución**

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, es una especie originaria de Madagascar. Se distribuye en numerosos países tropicales y subtropicales como en África del Sur, Asia del Sur, América del Sur, y Australia como planta decorativa; además, se ha reportado en la India, en Sri-Lanka, Israel y Mozambique. En Cuba se cultiva en patios y jardines como planta ornamental y medicinal, hallándosele en las costas (Levêque *et al.*, 1996; Acosta y Rodríguez-Ferrada, 2002). Su distribución en México se registra en Baja California Sur,

Campeche, Chiapas, Morelos, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Villaseñor y Espinosa-García, 1998).

### **Descripción botánica**

Es una hierba anual, leñosa en su base y muy ramificada, que puede alcanzar hasta 80 cm de altura. Presenta hojas opuestas, oblongas, simples, enteras, de color verde oscuro, brillantes en el haz y cortamente pecioladas. Sus ramas pueden ser erectas o decumbentes y sus flores relativamente grandes son axilares, solitarias, de pedúnculo corto. Existen varias formas diferentes por la coloración de las flores que van desde el blanco, blanco con centro rojo, blanco con centro disperso hasta el rosa violeta. Su fruto es un folículo dehiscente que contiene numerosas semillas (más de 20) de color negro (Acosta y Rodríguez-Ferrada, 2002).

### **Cultivo y nutrición mineral**

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, es una planta que se desarrolla en climas tropicales, Su propagación puede ser posible por medio de semillas y/o cortes. Sin embargo, la siembra directa de las semillas en el campo no es aconsejable, pues se afecta su germinación de forma considerable, por lo que se recomienda hacer semilleros en naves techadas. La temperatura adecuada para su crecimiento oscila entre 25 y 30 °C. Las fechas aconsejables para su siembra son entre noviembre y mayo, aunque parece que la mejor fecha resulta el mes de enero. Las plantas de *C. roseus* son tolerantes a rangos amplios de salinidad y pH. En cuanto a su nutrición mineral son altamente demandantes de nitrógeno (Acosta y Rodríguez-Ferrada, 2002; Lata, 2007).

## Composición química

Históricamente, el descubrimiento de los alcaloides de *Catharanthus roseus*, tuvieron sus orígenes dentro de la medicina tradicional, los cuales eran extraídos de las hojas de esa planta tropical, para su uso en el tratamiento contra la diabetes. Las propiedades pseudoantidiabéticas de esta planta motivaron la investigación de sustancias hipoglycémiantes. Estos primeros trabajos permitieron que a finales de 1958 se aislara un alcaloide llamado vincaleucoblasina, y después renombrado como vinblastina (Levêque *et al.*, 1996; Kruczynski y Hill, 2001; Shasany *et al.*, 2007).

Investigaciones posteriores permitieron aislar más alcaloides: leurocristina llamada después vincristina, vindesina la cual fue originada semi-sintéticamente a finales de los años 70 a partir de la vinblastina y finalmente, la vinorelbina otro compuesto sintético, formado por el equipo del profesor Potier del Instituto de Química de Sustancias Naturales, en Francia. A partir de investigaciones químicas y farmacológicas se logró identificar un nuevo alcaloide semi-sintético, denominado vinflunina. En sus raíces destacan los alcaloides: ajmalicina y reserpina de efecto hipotensor (Levêque *et al.*, 1996; Acosta y Rodríguez-Ferrada, 2002; Kruczynski y Hill, 2001; Shasany *et al.*, 2007).

Las moléculas de vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina son moléculas diméricas unidas por una relación carbono-carbono, formadas por una unidad de catarantina y una unidad de vindolina, esta última a su vez, es sintetizada en seis pasos a partir del alcaloide tabersonina. Mientras que la catarantina se encuentra en cualquier órgano de la planta, la vindolina es sintetizada únicamente en las hojas y el tallo. La vindolina y la catarantina son sintetizadas en el citosol, pero su condensación para dar lugar a la

vinblastina por ejemplo, ocurre en la vacuola (Trejo y Rodríguez, 2007; Levêque y Jehl, 2007; Verma *et al.*, 2007).

La vinblastina, la vincristina y la vindesina difieren estructuralmente solamente en un grupo funcional (Figura 4.8). Contrariamente a sus análogos, la vinorelbina presenta una modificación en la unidad de catarantina sobre la parte de un átomo de carbono en donde se establece un doble enlace. Finalmente, estos alcaloides son compuestos lipofílicos, básicos y de peso molecular elevado (Levêque *et al.*, 1996; Shasany *et al.*, 2007).

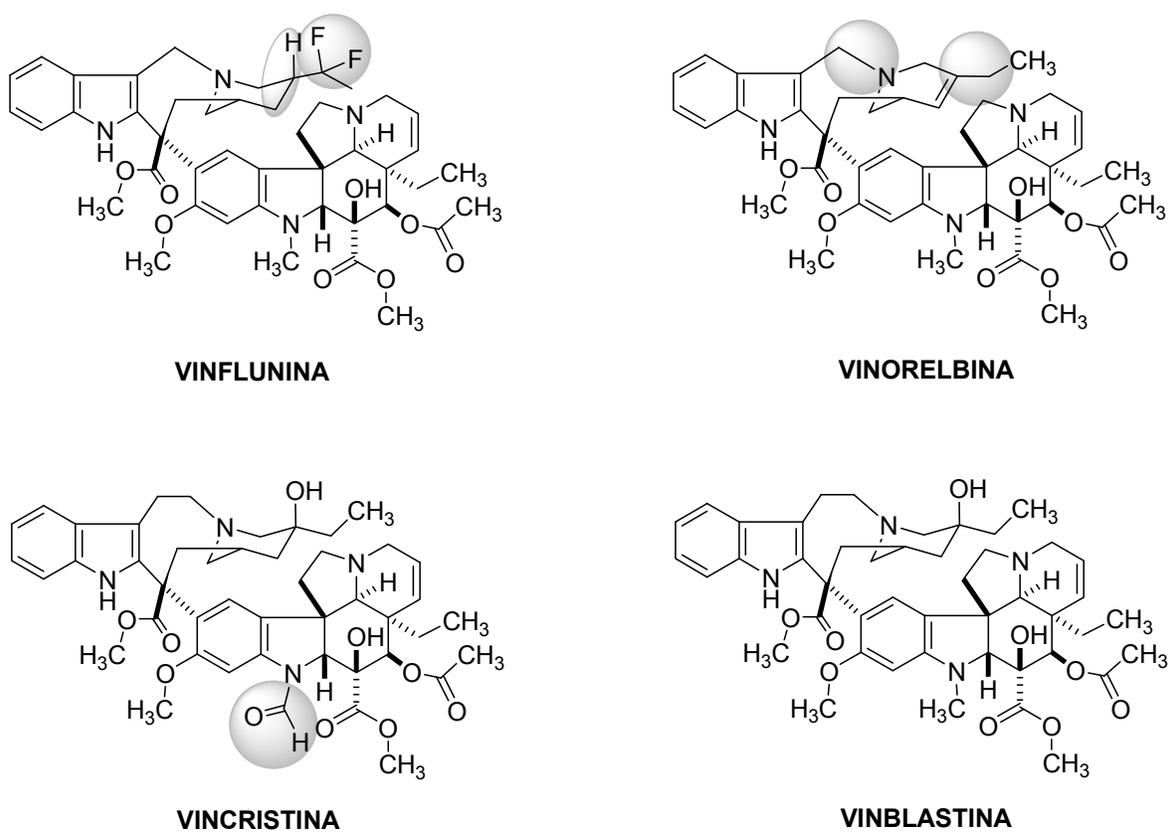


Figura 4.8. Estructura química de cuatro alcaloides indólicos presentes en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (modificado de Kruczynski y Hill, 2001).

## Usos y propiedades terapéuticas

Los alcaloides de *Catharanthus roseus*, en combinación con metabolitos de otras plantas, son utilizados para el tratamiento de una variedad de cánceres, incluyendo leucemias, linfomas, cáncer testicular avanzado, cáncer de seno y de pulmón (Gordon y Newman, 2005).

Por más de cuatro décadas, los compuestos vinblastina y vincristina han sido reconocidos por su importancia como agentes antitumorales, ya que éstos presentan una fuerte actividad antineoplásica contra un amplio espectro de tumores en humanos. Estos dos alcaloides aunque estructuralmente casi idénticos (Figura 4.8), difieren marcadamente en el tipo de tumores que pueden afectar y en sus propiedades tóxicas. En particular, el alcaloide vinblastina es usado en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin's (la cual consiste en un cáncer en el sistema linfático), mientras que la vincristina se emplea de manera general o bien, es considerado un medicamento selecto en el tratamiento de la leucemia infantil aguda. Los alcaloides vinblastina y vincristina son medicamentos potentes, sin embargo, también tienen severos efectos secundarios, especialmente en el sistema neurológico. Por lo anterior se realizaron modificaciones estructurales que produjeron análogos más efectivos y menos tóxicos (Carretero, 2001; Chen y Hong, 2006; Shasany *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO V

### Propagación de consorcios e identificación de hongos micorrízicos arbusculares obtenidos de la rizósfera de plantas medicinales

#### RESUMEN

En este capítulo se hace la descripción de la propagación e identificación de 13 consorcios de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) colectados de la rizósfera de plantas medicinales, en Áreas Naturales de Bosques mixtos. Para dicho fin, se tomaron al azar las raíces de cada planta medicinal, además de suelo rizosférico. En las raíces recolectadas de campo se evaluó el porcentaje de colonización, mientras que una parte del suelo colectado se utilizó para la extracción y cuantificación de esporas. El resto del suelo fue utilizado para establecer cultivos trampa, utilizando *Bracharia brizantha* Hochst, en condiciones de invernadero. Después de diez meses las plantas fueron cosechadas para determinar el porcentaje de colonización y hacer la identificación de géneros de HMA. Los resultados muestran que todas las plantas medicinales en su condición natural, presentaron micorriza arbuscular, presentando cierta diversidad, integrada por cinco géneros predominantes: *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*. Con base en la colonización micorrízica (CM) se realizó una selección de ocho consorcios correspondientes a aquellos recolectados de: *Adiantum capillus-veneris* L. (50% CM), *Castilleja tenuiflora* Benth. (84% CM), *Erigeron karvinskianus* DC. (94% CM), *Pimpinella anisum* L. (85% CM), *Plantago major* L. (87% CM), *Ricinus communis* L. (44% CM), *Rubus fruticosus* L. (98% CM) y *Rumex mexicanus* Meisn. (40% CM), para su uso en las siguientes fases experimentales.

**Palabras clave:** colonización micorrízica, suelo, cultivos trampa.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) no son capaces de crecer en ausencia de una planta hospedante, por lo que son considerados simbioses obligados, lo cual representa mayor dificultad para producir un inóculo en cantidades industriales. Esto a su vez ha sido el principal impedimento de la difusión del uso de los HMA entre los productores. La manera más común de propagarlos consiste en colocar sus esporas o propágulos en un suelo previamente esterilizado y sembrar luego la semilla pregerminada de una planta micorrízica. Al cabo de 3-4 meses, el suelo y las raicillas de la planta trampa pueden utilizarse como un inoculante de HMA (Blanco y Salas, 1997; Cuenca *et al.*, 2007).

La planta trampa debe de tener características especiales como: 1) ser micótrofa obligada y no selectiva a las diferentes especies de HMA; 2) adaptarse a un rango amplio de condiciones de suelo y clima; 3) de fácil mantenimiento; 4) que no requiera mucho espacio en el invernadero o en laboratorio; 5) puede ser perenne y soportar podas periódicas, si se desea mantener cultivos por mucho tiempo en macetas; 6) con semillas de alto porcentaje de germinación, sin necesidad de procesos de escarificación complicados; y 7) no debe ser altamente susceptible a enfermedades comunes con las plantas en las cuales se utilizará el inóculo (Salas y Blanco, 2000).

El inóculo de HMA obtenido a partir de “cultivo en maceta”, usualmente es incorporado al sustrato mediante dos métodos. En el primer método, el inóculo es mezclado uniformemente con el sustrato, previo al llenado de los recipientes o macetas. En el segundo método, el inóculo es colocado en forma de bandas, de 3 a 5 cm bajo la superficie del sustrato. Aunque este método puede ser muy laborioso, se asegura un rápido contacto

entre las raíces y el hongo, a medida que las raíces crecen hacia las bandas de inóculo (Castellano y Molina, 1989).

Un inóculo es definido como un producto biológico (puede ser líquido o sólido) que facilita la introducción de microorganismos con una gran variedad de actividades fisiológicas que auxilian al crecimiento y desarrollo de las plantas. En el caso de los HMA, el inoculante suele consistir ya sea de esporas, hifas, fragmentos de raíces colonizadas o suelo rizosférico donde se detecte una abundancia de hifas de HMA (Alarcón *et al.*, 2004).

La inoculación mediante el inóculo obtenido por el método de “cultivo en maceta” provee la mejor fuente de HMA por varias razones. Si el inóculo es producido de manera apropiada, existe mínimo riesgo de introducir plagas o enfermedades. Además el inóculo es confiable, eficiente y fácilmente puede ser incorporado en el sustrato, y lo más importante, el “cultivo en maceta” permite el uso de cepas de hongos seleccionados por su capacidad de proporcionar el máximo crecimiento y desarrollo a las plantas (Castellano y Molina, 1989).

El objetivo del presente estudio fue propagar e identificar los grupos taxonómicos de hongos micorrízicos arbusculares de consorcios obtenidos de plantas medicinales y propagados mediante cultivo trampa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó un muestreo aleatorio de la rizosfera de 13 plantas medicinales en Áreas Naturales de Bosques mixtos. Para dicho fin, se tomaron al azar, muestras representativas de las raíces de cinco plantas de una misma especie en una superficie de 12 m<sup>2</sup>. Además se colectó suelo rizosférico, que comprende la cobertura de la planta medicinal, aproximadamente 1000 gramos. Los ejemplares de cada especie vegetal fueron colocados en una prensa botánica para determinar el nombre científico de la planta colectada.

En las raíces de las plantas medicinales se evaluó la colonización micorrízica, por el método de clareo y tinción con azul tripano de Phillips y Hayman (1970) descrito por Ferrera-Cerrato *et al.* (1993), para lo cual las raíces libres de suelo se colocaron en un vaso de precipitados al que se agregó suficiente solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 %, hasta cubrirlas. Se procedió a calentar el vaso de precipitados por 10 minutos bajo 10 libras de presión. El KOH se retiró y las raíces se enjuagaron con agua destilada. Después se agregó una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 10%, en suficiente cantidad para que cubriera las raíces por diez minutos; pasado el tiempo se procedió a enjuagar con agua destilada. Posteriormente, las raíces se cubrieron con ácido clorhídrico (HCl) al 10% por diez minutos, se eliminó el HCl y sin enjuagar, se procedió a teñir con la solución colorante (azul tripano 0.05% en lactoglicerol) para lo que fue necesario calentar por 10 minutos a 10 libras de presión.

Para determinar el porcentaje de colonización fue necesario evaluar microscópicamente la morfología interna de la simbiosis. Veinte segmentos (1cm de longitud) de las raíces teñidas fueron colocados en portaobjetos con agujas de disección, paralelamente unos a otros (Figura 5.1). Sobre las raíces se adicionaron gotas de lactoglicerol, y se colocaron cubreobjetos, se eliminaron las burbujas y cada laminilla fue sellada con esmalte para uñas. Para realizar la evaluación se observó al microscopio con el aumento 20X, 40X y hasta 100X (aplicando aceite de inmersión), se efectuaron tres pasajes equidistantes por la laminilla, pára registrar los segmentos con hifas, vesículas y/o arbusculos. El porcentaje de colonización micorrízica total se calculó dividiendo el número total de segmentos colonizados entre el número de segmentos totales observados y el resultado se multiplico por cien.

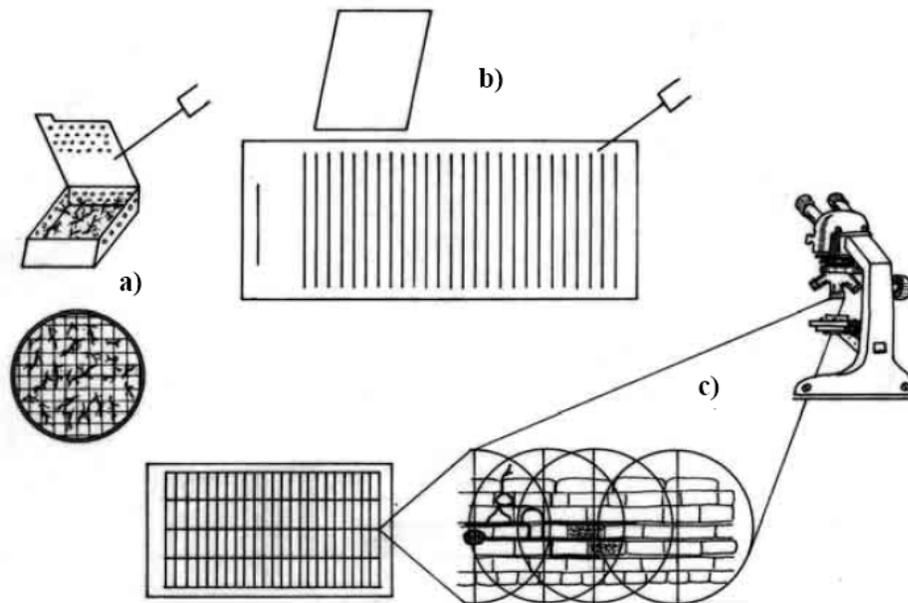


Figura 5.1. Evaluación de la colonización por hongos micorrízicos arbusculares en el sistema radical de las plantas, con base en las raíces teñidas en el portaobjetos. a) colocación de las raíces teñidas en las cajas de Petri; b) montaje de raíces en portaobjetos con lactoglicerol; c) observación de las preparaciones al microscopio (Alarcón *et al.*, 2004).

Una parte del suelo rizosférico recolectado fue utilizado para extraer y cuantificar las esporas presentes, utilizando el método de Gendermann y Nicolson (1963) descrito por Ferrera-Cerrato *et al.* (1993), para lo cual se elaboró una suspensión con 100 gramos del suelo en 2000 mL de agua corriente. Agitando por cinco minutos y dejando reposar 3 minutos, con la finalidad de eliminar partículas grandes por sedimentación. La suspensión se pasó a través de una serie de tamices de 500, 250 y 44 micras. Se agregó agua al sedimento precipitado y se repitieron los pasos anteriores dos veces más. La fracción obtenida de los tamices se filtró y se colocó en una caja Petri. El número de esporas se obtuvo al contar la cantidad de éstas en la caja Petri, con ayuda de un microscopio estereoscópico, y se reportó en número de esporas en 100 gramos de suelo seco.

La otra parte del suelo se utilizó para propagar las esporas presentes en la rizósfera de cada una de las plantas medicinales recolectadas, mediante cultivos trampa en condiciones de invernadero (Salas y Blanco, 2000). Se colocaron 100 gramos del suelo de cada planta que contuvo fragmentos de raíces colonizadas y esporas, en una maceta con sustrato (arena) estéril y se sembró la gramínea *Bracharia brizantha* Hochst. Staf., como planta trampa. A los ocho días de la germinación se les aplicó riegos (cada tercer día) con solución nutritiva de Long Ashton modificada (para adicionar  $10.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (ANEXO 1) (Hewitt, 1966). Después de diez meses, a la planta hospedante se le cortó la parte aérea y fue sometida a estrés hídrico con el objetivo de estimular la esporulación de los HMA. En la raíz de cada una de las plantas trampa se evaluó la colonización micorrízica y en el suelo de cada consorcio se contaron las esporas, por las metodologías previamente descritas.

La identificación de los distintos géneros se basó en la caracterización morfológica de las esporas, considerando tamaño, forma, ornamentación, número y grosor de capas que conforman la pared de la espora, hifa sustentora, etcétera. Para dicho fin se realizó el siguiente procedimiento (González-Chávez, 1993): Las esporas del suelo sin aparente daño mecánico, fueron examinadas al microscopio y mediante agujas de disección fueron aisladas y posteriormente, seleccionadas por tamaño, ornamentación, hifa sustentora y contenido citoplasmático. Después se elaboraron preparaciones permanentes, para lo cual se colocaron de 20 a 25 esporas intactas en un portaobjetos, y en otro portaobjetos, un número semejante de esporas sutilmente rotas, para observar su tipo de pared. Como medio de montaje se empleo polivinil-alcohol-ácido láctico (PVLG). Una vez terminadas, las preparaciones fueron observadas al microscopio de campo claro, para realizar mediciones de las esporas. Entre otras características se consideró la superficie que puede presentarse

ornamentada, lisa, rugosa, con espinas, cavidades, proyecciones de varios tipos, color, forma, composición de la pared. También se utilizó como método taxonómico el uso de reacciones químicas de la pared de las esporas con el reactivo de Melzer`s. Finalmente, la identificación se basó en las claves de Schenck y Pérez (1990) y principalmente, en los especímenes incluidos en la página web del INVAM (2008). A partir de las preparaciones, se tomaron fotografías en campo claro o Nomarski con el microscopio óptico (Olympus, Modelo BX5) para observar las estructuras.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectaron 13 plantas medicinales silvestres en Áreas Naturales de Bosques mixtos. De acuerdo a su uso medicinal, las plantas se agrupan en: 1) aquellas que se utilizan como galactógeno (producción de leche): *Pimpinella anisum* L. y *Adiantum capillus-veneris* L.; 2) aquellas cuyo uso es como cicatrizante: *Phytolacca icosandra* L.; 3) las que se utilizan como astringente: *Fragaria vesca* L., *Rubus fruticosus* L., *Rumex mexicanus* Meisn. y *Plantago major* L.; 4) aquellas que se emplean para enfermedades renales: *Erigeron karvinskianus* DC., *Castilleja tenuiflora* Benth., *Eryngium carlinae* Delar; 5) aquellas con acción purgante: *Ricinus communis* L.; 6) como agentes antimicrobianos: *Baccharis conferta* H.B.& K., y 7) combate a los parásitos en humanos: *Tagetes lucida* Cav. Todas las plantas medicinales en su condición natural, presentaron micorriza arbuscular, confirmandose la ubicuidad de los HMA (Öpik *et al.*, 2008; Giasson *et al.*, 2008). Los porcentajes de colonización micorrízica total oscilaron del 14 al 84%, presentando el valor más alto la especie *Tagetes lucida* Cav. y el más bajo *Rumex mexicanus* Meisn. (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1. Géneros de hongos micorrízicos arbusculares (HMA), porcentajes de colonización micorrízica arbuscular y número de esporas presentes en la rizósfera de plantas medicinales recolectadas en áreas naturales de bosques mixtos.

Nombre científico (Familia botánica)	Géneros de HMA	Colonización micorrízica (%)	Número de esporas 100 g de suelo
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L. (Adiantaceae)	<i>Acaulospora</i> <i>Glomus</i>	65	146
<i>Baccharis conferta</i> H.B.& K. (Compositae)	<i>Acaulospora</i> sp1 y <i>Acaulospora</i> sp2	70	34
<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth. (Asteraceae)	<i>Acaulospora</i>	19	146
<i>Erigeron karvinskianus</i> DC. (Asteraceae)	<i>Acaulospora</i> , <i>Scutellospora</i> , <i>Gigaspora</i> y <i>Glomus</i>	20	58
<i>Eryngium carlinae</i> Delar. (Apiaceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	72	34
<i>Fragaria vesca</i> L. (Rosaceae)	<i>Acaulospora</i>	42	62
<i>Phytolacca icosandra</i> L. (Phytolaccaceae)	<i>Glomus</i> sp1 <i>Glomus</i> sp2	29	186
<i>Pimpinella anisum</i> L. (Apiaceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	38	176
<i>Plantago major</i> L. (Plantaginaceae)	<i>Acaulospora</i> y <i>Glomus</i>	59	166
<i>Ricinus communis</i> L. (Euphorbiaceae)	<i>Acaulospora</i>	73	130
<i>Rubus fruticosus</i> L. (Rosaceae)	<i>Scutellospora</i> y <i>Glomus</i>	58	168
<i>Rumex mexicanus</i> Meisn. (Poligonaceae)	<i>Glomus</i>	14	30
<i>Tagetes lucida</i> Cav. (Asteraceae)	<i>Acaulospora</i> <i>Glomus</i>	85	240

El suelo proveniente de *Tagetes lucida* Cav., presentó mayor cantidad de esporas al compararse con el resto de los tratamientos, y contrariamente en el suelo de *Rumex mexicanus* Meisn., se observó el menor número de esporas (Cuadro 5.1).

Al examinar la taxonomía de los suelos recolectados se aprecia cierta diversidad, siendo los principales géneros encontrados en la rizósfera de las plantas medicinales: *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* (Figuras 5.2. y 5.3). Otros autores ya han reportado la asociación de los HMA y las plantas medicinales, entre estos autores se puede citar a Panwar y Tarafdar (2006), quienes al realizar un estudio donde se analizó la asociación del HMA con tres plantas medicinales (*Leptadenia reticulata*, *Mitragyna parvifolia*, *Withania coagulans*), observaron una alta diversidad de HMA entre las diferentes plantas, dicha diversidad consistía en cinco géneros, en donde predominaba el género de *Glomus*, con diez especies, además de *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* y *Paraglomus*.

De los trece consorcios micorrízicos provenientes de plantas trampa, se realizó una selección, en la que únicamente aquellos que presentaron porcentajes de colonización superiores a 40%, fueron considerados como inóculos. El criterio de esta selección basada en el porcentaje de colonización se justifica ya que éste es considerado como característica importante que indica el potencial de un inóculo (Salas y Blanco, 2000). Con base en lo anterior, se obtuvieron ocho inóculos procedentes de la rizosfera de las siguientes plantas medicinales: *Adiantum capillus-veneris* L. (50%), *Castilleja tenuiflora* Benth. (84%), *Erigeron karvinskianus* DC. (94%), *Pimpinella anisum* L. (85%), *Plantago major* L. (87%), *Ricinus communis* L. (44%), *Rubus fruticosus* L. (98%) y *Rumex mexicanus* Meisn. (40%).

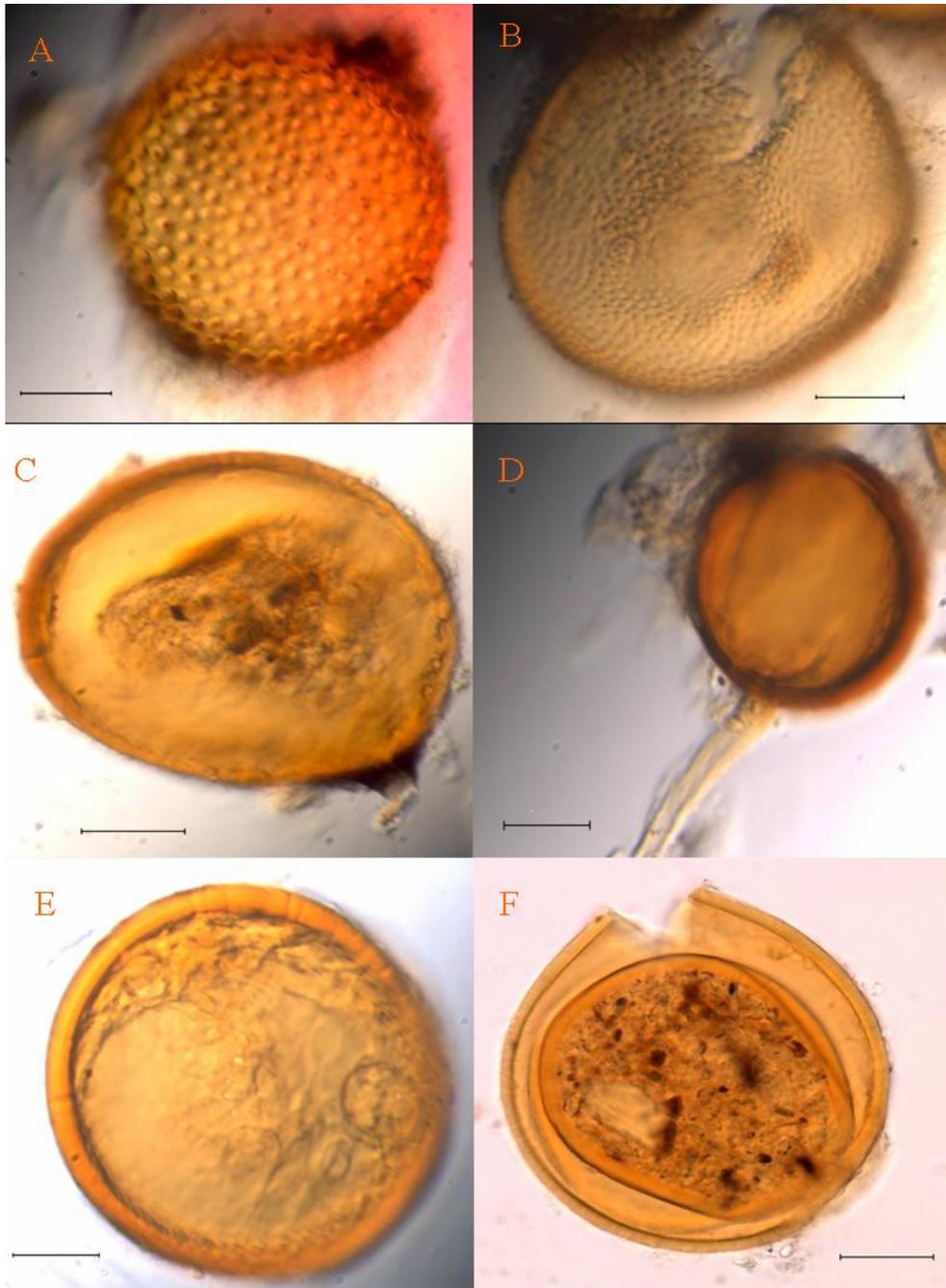


Figura 5.2. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares identificados de la rizosfera de plantas medicinales obtenidas en campo. A) *Acaulospora* presente en *Baccharis conferta* H.B.& K.; B) *Acaulospora* presente en *Phytolacca icosandra* L.; C y D) Especies del género *Glomus* presentes en *Phytolacca icosandra* L.; y E) *Acaulospora* presente en *Tagetes lucida* Cav.; y F) *Glomus* presente en *Tagetes lucida* Cav. Fotos tomadas bajo microscopio de Nomarski. Barra = 30  $\mu$ m.

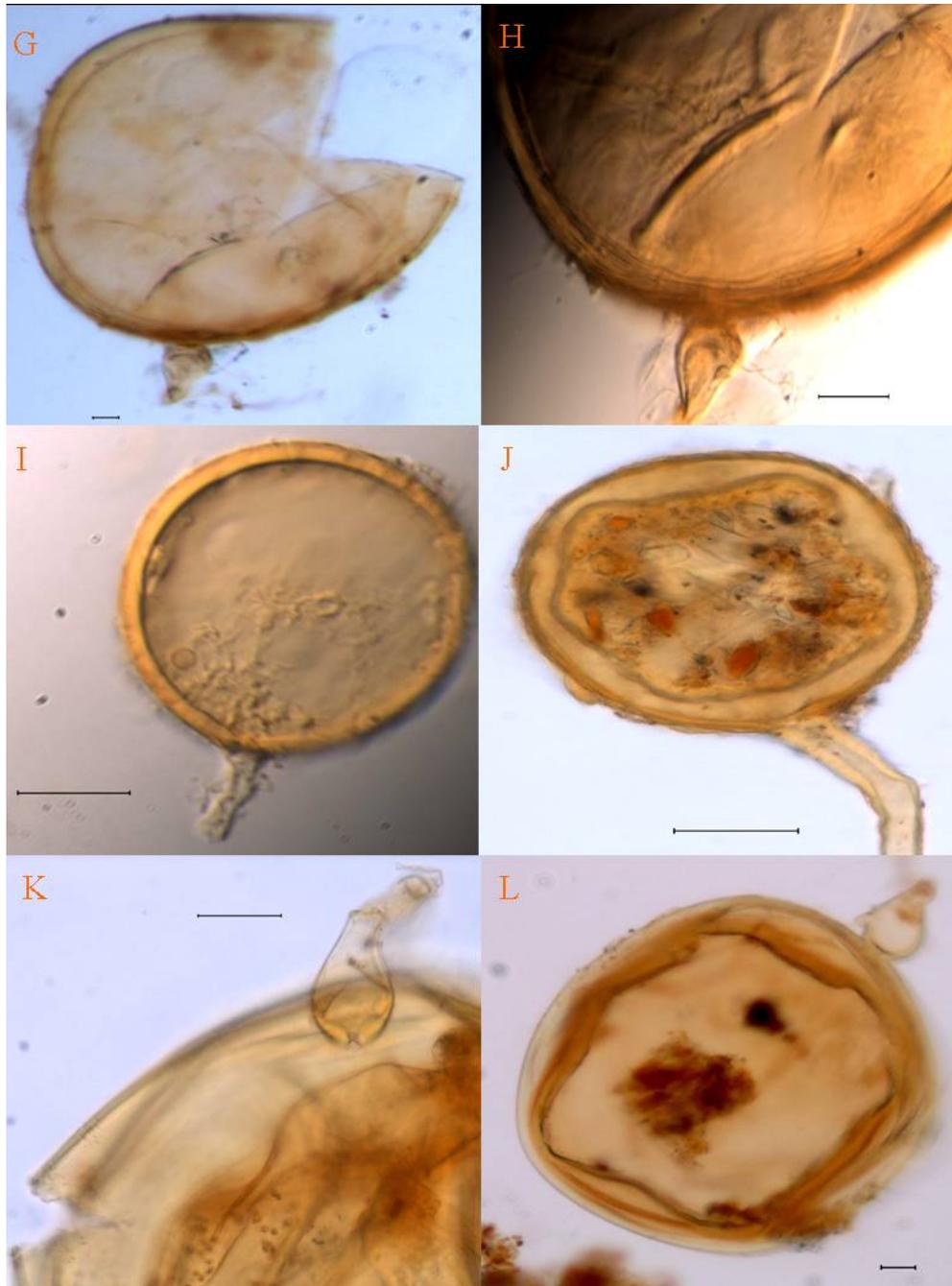


Figura 5.3. Esporas de hongos micorrízicos arbusculares identificados de la rizosfera de plantas medicinales obtenidas en campo. G y H) Especie del género *Gigaspora* presente en *Erigeron karvinskianus* DC.; I y J) Especies del género *Glomus* presente en *Rumex mexicanus* Meisn. y *Rubus fruticosus* L.; K y L) Especie del género *Scutellospora* presente en *Rubus fruticosus* L. Fotos tomadas en microscopio de campo claro (G , K y L) y Nomarski (H, I, y J) Barra= 30 µm.

## CONCLUSIONES

- Se identificó a nivel de género los grupos taxonómicos de hongos micorrízicos arbusculares de los consorcios obtenidos de la rizósfera de plantas medicinales y propagados mediante cultivo trampa, siendo los géneros predominantes *Acaulospora* y *Glomus*.
- Los consorcios obtenidos de plantas medicinales, expresaron variabilidad en la riqueza taxonómica de hongos micorrízicos arbusculares, siendo el más diverso el consorcio proveniente de la planta medicinal *Erigeron karvinskianus* DC. con cuatro géneros (*Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora* y *Glomus*)
- Para realizar una clasificación completa de los HMA localizados en cada consorcio se requiere mayor tiempo.

## CAPÍTULO VI

### Selección de consorcios de hongos micorrízicos arbusculares con base en la promoción del crecimiento de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

#### RESUMEN

En este capítulo se realizó un estudio comparativo del efecto de ocho consorcios de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) aislados de plantas medicinales [Ver capítulo V], en la promoción del crecimiento (número de hojas, flores y botones, peso seco de hoja, flores y botones y área foliar) de plántulas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, bajo condiciones de invernadero. Después de 70 días, de inoculación el consorcio proveniente de la planta medicinal *Rumex mexicanus* es el que produjo más efectividad en el peso seco de hoja, tallo y raíz así como en el número de hojas y área foliar. Sin embargo para número y peso seco de flores y botones no existieron diferencias significativas entre este inoculo y el resto de los tratamientos. Además las plantas a las que se les aplico el inoculo proveniente de *Rumex mexicanus* presentaron mayor porcentaje de colonización total, que el resto de los tratatamientos.

Los resultados anteriores muestran que existen variaciones en el proceso de colonización, así como en el grado de beneficio de las diferentes especies de HMA en las plantas. Lo anterior denota la importancia de seleccionar HMA con alta efectividad en la promoción del crecimiento en las plantas de interés.

**Palabras clave:** efectividad, inóculo, planta medicinal, porcentaje de colonización

## INTRODUCCIÓN

La asociación que establecen los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) no es específica puesto que cualquiera de estos hongos puede colonizar diferentes plantas susceptibles de formar esta simbiosis. Sin embargo, algunos hongos benefician en mayor grado a un determinado hospedante en comparación con otros y, fundamentalmente, muestran un cierto grado de adaptación para establecer la micorriza y funcionar bajo determinadas condiciones edafoclimáticas. Este hecho evidencia las marcadas diferencias no solo estructurales, sino también funcionales existentes entre especies de HMA e incluso entre hongos pertenecientes a una misma especie (ecotipos). Lo anterior denota la importancia de conocer estas diferencias con vistas a seleccionar HMA o consorcios de ellos dirigidos a una planta o a una condición muy específica, con el fin de obtener resultados satisfactorios en la promoción del crecimiento en las plantas a las que será encaminada su inoculación (Rodríguez *et al.*, 2004).

Varios factores intervienen en la efectividad de la asociación micorrízica. Por ejemplo, el genotipo del HMA aislado, la especie de planta hospedante y las características químicas, físicas y biológicas del suelo (Brundrett y Abbott, 2002; Kosuta *et al.*, 2005; Baar, 2008). Por lo tanto, la investigación y la selección específica de HMA deben preceder a la inoculación a grandes escalas, además de considerar la planta hospedante y las condiciones ambientales específicas bajo las cuales crecerán las plantas inoculadas (Cavallazzi *et al.*, 2008).

La micorriza arbuscular es considerada como un microorganismo promotor del crecimiento de la planta lo cual está relacionado con la mejora en el suministro de nutrientes minerales. Dependiendo de la planta y del HMA, la colonización del sistema

radical puede incrementar la nutrición de fósforo u otro nutriente mineral. (Akhtar y Siddiqui, 2008; Vessey, 2003).

Teniendo en cuenta estos aspectos se realizó un estudio comparativo del efecto benéfico de ocho consorcios de HMA, aislados de plantas medicinales (ver capítulo V) en la promoción del crecimiento de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., con el objetivo de seleccionar el consorcio micorrízico más promisorio para esta planta medicinal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las plántulas de *C. roseus* Variedad Pacífica rojo cereza (Plántulas de Tetela S. de R. L. de C. V. Cuernavaca, Morelos) con siete semanas de germinación fueron llevadas al invernadero para ser transplantadas a macetas que contenían un kilogramo de sustrato constituido por peat moss y agrolita (1:1 v/v) previamente pasteurizado durante tres días. La temperatura y la humedad relativa fue monitoreada con dog data logger modelo 150. La humedad relativa promedio máxima y mínima fue de  $82.9 \pm 7.0$  y  $25.8 \pm 11.11$ , respectivamente, y la temperatura promedio máxima y mínima fue de  $35.44 \pm 5.4$  y  $13.7 \pm 1.6$  respectivamente.

Las plántulas fueron inoculadas al momento del transplante con 10 gramos del inoculo correspondiente aplicado directamente sobre su sistema radical (Alarcón *et al.*, 2004). Se consideraron once tratamientos, los cuales incluían al testigo, inóculos del consorcio *Glomus* Zac19 y de la cepa *Glomus intraradices* (cepas de referencia del Área de Microbiología); además de los inóculos de los ocho consorcios obtenidos, propagados y seleccionados [Ver capítulo V] que correspondieron a las siguientes plantas medicinales: *Adiantum capillus-veneris* L., *Castilleja tenuiflora* Benth., *Erigeron karvinskianus* DC., *Pimpinella anisum* L., *Plantago major* L., *Ricinus communis* L., *Rubus fruticosus* L. y

*Rumex mexicanus* Meisn. Cada tratamiento estuvo constituido con cinco repeticiones. Las plántulas fueron regadas cada tercer día con agua corriente, y cada ocho días se les aplicó un riego con solución nutritiva de Long Ashton modificada para adicionar  $10.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (ANEXO1) (Hewitt, 1966). El criterio para emplear el inoculo de *Glomus intraradices* y *Glomus Zac19* se justifica ya que ambos inoculos han sido empleados como promotores del crecimiento en diversas plantas (Godoy *et al.*, 1993; Khalil *et al.*, 1999; Manjarez-Martínez *et al.*, 1999; Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

Después de 70 días, las plantas fueron cosechadas para proceder a la evaluación del número de hojas, botones florales y flores, área foliar, biomasa seca (hojas, tallo, raíces, flores y botones) y porcentaje de colonización micorrízica. El área foliar fue determinada con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100). La biomasa seca se obtuvo al pesar por separado hojas, flores, botones florales, tallos y raíces en una balanza analítica (Sartorius, Modelo Analytic AC 210S), después de que los diferentes órganos de la planta fueron secados en un horno (FELISA, Modelo 242-A) a  $70^\circ\text{C}$  por 72 h.

El porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de las plantas de *C. roseus*, fue evaluado por el método de Phillips y Hayman (1970) descrito por Ferrera-Cerrato *et al.* (1993) y que fue mencionado con detalle en el capítulo V.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, incluyendo 11 tratamientos con cinco repeticiones cada uno. Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El comportamiento del número de hojas (Figura 6.1) en plántulas de *C. roseus* a los de 70 días, muestra que las plantas inoculadas con los consorcios provenientes de *Rumex mexicanus* y *Plantago major* presentaron el mayor número de hojas (58 y 57 hojas respectivamente), mostrando diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) con respecto al tratamiento inoculado con *Glomus intraradices* cuyo número promedio de hojas fue de 25. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas al ser comparados con el testigo (Figura 6.1). La producción de biomasa aérea depende del HMA y de la compatibilidad de estos con la planta (Zhao *et al.*, 2006). Los resultados muestran que el número de hojas estuvo en función del inoculo empleado. Resultados similares se encontraron en *Camptotheca acuminata*, cuya producción de biomasa presentó variaciones por la inoculación con tres diferentes HMA (Zhao *et al.*, 2006).

Respecto al área foliar los tratamientos inoculados con los consorcios provenientes de la rizósfera de las plantas medicinales *Rumex mexicanus*, *Plantago major*, *Castilleja tenuiflora*, *Ricinus communis*, *Adiantum capillus-veneris*, *Pimpinella anisum* y el consorcio *Glomus* ZAC-19 presentaron los valores más altos. No obstante no se observaron diferencias significativas con el testigo. El tratamiento que expresó el valor más bajo para este parámetro fue el inoculado con *Glomus intraradices*. Cabe destacar que el tratamiento con el consorcio de *Rumex mexicanus*, superó aunque no de manera significativa al resto de los tratamientos con un área foliar de 244.54 cm<sup>2</sup> (Figura 6.1).

La inoculación con HMA no tuvo efectos significativos en el número de flores y botones florales; sin embargo, los consorcios precedentes de *Plantago major* y *Adiantum capillus-veneris*., produjeron mayor respuesta. En el peso seco de ambos organos, se

observó que el testigo presentó diferencias estadísticas con el resto de los tratamientos, al producir mayor peso (Cuadro 6.1).

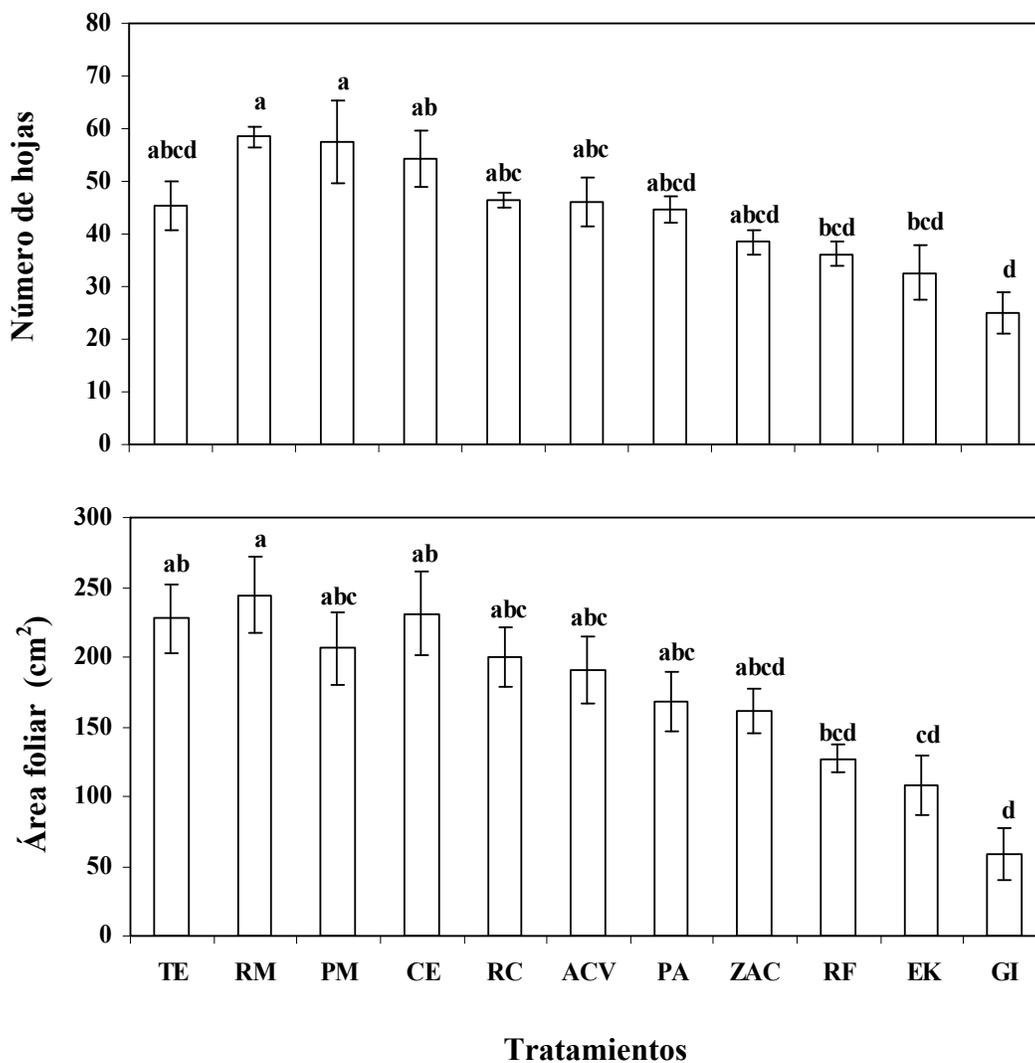


Figura 6.1. Número de hojas y área foliar en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares aislados de plantas medicinales después de 70 días. n=5. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). Simbología: TE= testigo (sin inocular), RM= *Rumex mexicanus* Meisn, PM= *Plantago major* L., CE= *Castilleja tenuiflora* Benth., RC= *Ricinus communis* L., ACV= *Adiantum capillus-veneris* L., PA= *Pimpinella anisum* L., ZAC= *Glomus* ZAC-19, RF= *Rubus fruticosus* L., EK= *Erigeron karvinskianus* DC., y GI= *Glomus intraradices*.

Cuadro 6.1. Colonización micorrízica, número y peso seco de flores y botones en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares aislados de plantas medicinales después de 70 días.

Tratamientos (se indica el nombre científico de la planta hospedante de donde se aisló el consorcio micorrízico)	Colonización micorrízica (%)	Número		Peso seco (g)
		Flores	Botones	Flores y botones
Testigo	0.0 g	2.6 a	2.4 a	0.50 a
<i>Rumex mexicanus</i> Meisn	35.0 a	2.4 a	3.2 a	0.04 b
<i>Erigeron karvinskianus</i> DC.	32.6 ab	2.2 a	3.0 a	0.05 b
<i>Castilleja tenuiflora</i> Benth.	30.0 abc	4.0 a	3.2 a	0.09 b
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	28.4 bcd	4.4 a	5.6 a	0.10 b
<i>Plantago major</i> L.	27.5 bcd	2.2 a	5.8 a	0.08 b
<i>Rubus fruticosus</i> L.	25.0 cde	2.2 a	1.8 a	0.05 b
<i>Ricinus communis</i> L.	22.6 de	2.2 a	4.6 a	0.08 b
<i>Pimpinella anisum</i> L.	20.0 e	2.8 a	3.6 a	0.06 b
<i>Glomus intraradices</i>	9.1 f	1.6 a	2.8 a	0.03 b
<i>Glomus</i> ZAC-19	5.0 fg	2.2 a	4.4 a	0.06 b
Significancia	<0.001	NS	NS	<0.001

Medias  $\pm$  error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). n=5.

La colonización micorrízica arbuscular (Cuadro 6.1) fue significativamente ( $P \leq 0.001$ ) más alta en el tratamiento inoculado con el consorcio obtenido de *R. mexicanus*, presentando 35% de colonización micorrízica, seguido por los tratamientos inoculados con los consorcios *E. karvinskianus* (32.6%) y *C. tenuiflora* (30%), entre los cuales no hubo diferencias significativas. Los tratamientos con *Glomus intraradices* y *Glomus* ZAC-19 exhibieron los valores más bajos de colonización (Cuadro 6.1). Los datos anteriores indican que la respuesta de *C. roseus* a la inoculación con HMA presentaron

variación en la compatibilidad, la cual es medida por la formación de micorriza y la colonización de los HMA en la raíz.

Las variaciones en el porcentaje de colonización en plantas micorrizadas ya han sido reportadas por otros autores (Ruíz y Azcon, 2000; Anderson, 2008; Li *et al.*, 2008). Por su parte, Gupta *et al.* (2002) al evaluar el efecto de *Glomus fasciculatum* en tres cultivares de *Mentha arvensis* Becker (cultivares Kalka, Shivalik y Gomti) observaron que el cultivar Shivalik mostró porcentajes de colonización promedio altos (68%), al ser comparado con los demás cultivares, indicando que este cultivar fue más dependiente al HMA para la adquisición de nutrimentos. Por otro lado, Zhao *et al.* (2006) al inocular plantas de *Camptotheca acuminata* con tres especies de HMA (*Acaulospora mellea*, *Glomus diaphanum* y *Sclerocystis sinuosa* actualmente reclasificada como *Glomus sinuosum*) encontraron diferencias en el grado de colonización, siendo *G. sinuosum* el HMA que presentó porcentajes de colonización más altos. Bâ *et al.* (2000) analizaron la compatibilidad funcional medida por la colonización micorrízica, la formación de micorriza y la longitud del micelio externo, entre trece árboles frutales tropicales y dos HMA (*Glomus aggregatum* y *Glomus intraradices*). Los resultados reflejaron que el grado de la colonización por los dos HMA fue dependiente de la especie del árbol frutal.

El uso de inóculos mixtos es justificable debido a que en la naturaleza, las plantas están expuestas a una mezcla de especies de HMA. Además, al utilizar inóculos mixtos se aumentan las posibilidades de que más de uno de los hongos colonice eventualmente el sistema radical y promueva el crecimiento de la planta (Cuenca *et al.*, 2003).

El peso seco de hojas de *C. roseus* fue significativamente afectado ( $P \leq 0.001$ ) por la inoculación con los consorcios micorrízicos (Figura 6.2). El tratamiento inoculado con el consorcio obtenido de *Castilleja tenuiflora*, superó al resto de los tratamientos alcanzado un

peso de 0.62 g. Sin embargo, entre este consorcio y los tratamientos inoculados con los consorcios de *R. mexicanus*, *P. major*, *R. communis*, *A. capillus-veneris*, y *P. anisum*, no se observaron diferencias significativas. Por otro lado, los testigos mostraron el valor significativamente más bajo de peso seco foliar (0.06g).

La inoculación de HMA tuvo efectos significativos ( $P \leq 0.001$ ) en el peso seco de tallo (Figura 6.2) de *C. roseus*, donde los tratamientos inoculados con los consorcios procedentes de *C. tenuiflora*, *R. communis* y *A. capillus-veneris* presentaron los valores más altos (0.30 g, 0.29 g y 0.29 g, respectivamente), al ser comparados con los tratamientos inoculados con los HMA procedentes de *E. karvinskianus* (0.10 g) y con la cepa *G.intraradices* (0.05 g). No obstante, entre los tratamientos que expresaron los valores más altos y el testigo no se obtuvieron diferencias significativas.

En lo que respecta al peso seco de raíz (PSR) (Figura 6.2), se observa que el valor más alto fue obtenido en el tratamiento inoculado con el consorcio procedente de *R. mexicanus* (0.41 g), aunque no se observaron diferencias significativas con el resto de los tratamientos (incluyendo al testigo), excepto con el tratamiento inoculado con *G.intraradices* cuyo PSR fue de 0.12 g.

El beneficio de los HMA típicamente se relaciona con la promoción del crecimiento y el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas (Abu-Zeyad *et al.*, 1999; Larsen *et al.*, 2009; Milleret *et al.*, 2009). No obstante, el grado de beneficio de los HMA puede tener variaciones por efecto de la especie de hongo que se inocula en las plantas. Lo anterior denota la importancia de seleccionar HMA con alta efectividad en la promoción del crecimiento de las plantas de interés (Bâ *et al.*, 2000; Cavallazzi *et al.*, 2008).

Las plantas expresaron diferencias en el peso seco dependiendo del HMA utilizado. Lo anterior concuerda con el trabajo realizado por Ruiz y Azcón (2000) quienes

compararon el efecto de *Glomus* sp. y *Glomus deserticola* en el peso seco del vástago (PSV) en plantas de lechuga, donde la cepa de *G. deserticola* expresó un valor mayor.

Por su parte, Chu (1999) observó la respuesta de *Eutерpe oleracea* a la inoculación con siete especies de HMA (*Scutellospora gilmorei*, *Acaulospora* sp., *Gigaspora margarita*, *Entrophospora colombiana*, *Scutellospora heterogama*, *Gigaspora* sp. y *Scutellospora* sp.), cuyo crecimiento presento variaciones de acuerdo con el HMA inoculado, donde *Scutellospora gilmorei* fue la cepa más efectiva. De manera similar, Giri *et al.*, (2005) al evaluar el efecto de dos HMA (*G. fasciculatum* y *G. macrocarpum*) sobre el peso seco del vástago y de la raíz en *Cassia siemea*, encontraron que la inoculación produjo variaciones en ambos parámetros; así, el peso seco de las plantas inoculadas con *G. macrocarpum*; fue significativamente mayor, cuyo beneficio fue correlacionado con mayor capacidad de aprovechamiento de nutrientes (Vessey, 2003).

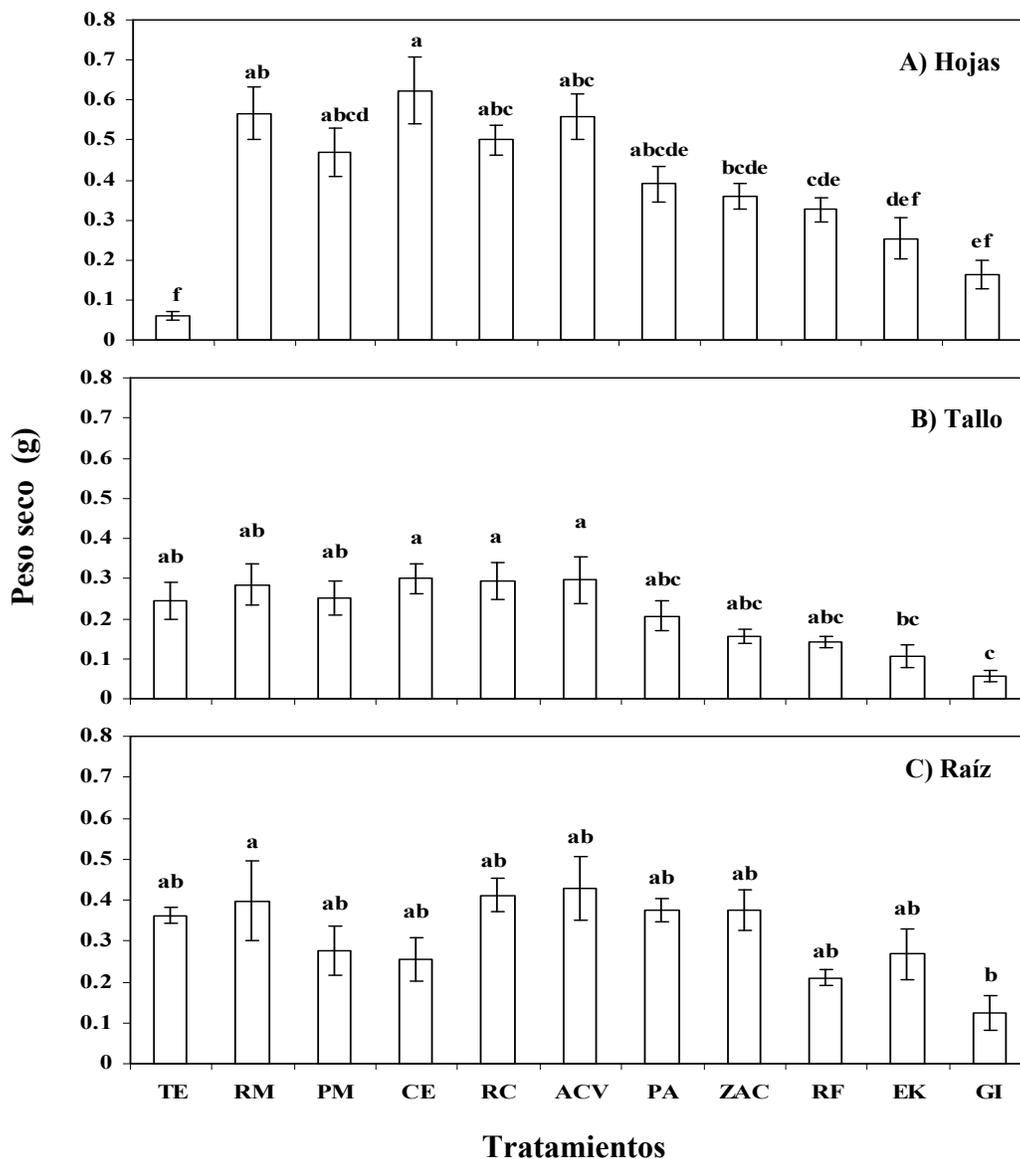


Figura 6.2. Peso seco de hojas, tallo y raíz en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la inoculación de consorcios micorrízicos arbusculares aislados de plantas medicinales después de 70 días. n=5. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ). Simbología: TE= testigo (sin inocular), RM= *Rumex mexicanus* Meisn, PM= *Plantago major* L., CE= *Castilleja tenuiflora* Benth., RC= *Ricinus communis* L., ACV= *Adiantum capillus-veneris* L., PA= *Pimpinella anisum* L., ZAC= *Glomus* ZAC-19, RF= *Rubus fruticosus* L., EK= *Erigeron karvinskianus* DC., y GI= *Glomus intraradices*.

## CONCLUSIONES

- Los resultados demuestran que existen diferencias en el proceso de colonización de los distintos consorcios de HMA, lo que se demuestra al observar el porcentaje de colonización y el valor de las variables agronómicas en los tratamientos analizados.
- Finalmente, el consorcio proveniente de *Rumex mexicanus*, fue el más efectivo en la promoción del crecimiento de *C. roseus*, en las condiciones experimentales de este estudio.

## CAPÍTULO VII

### Aplicación de bicarbonato de potasio y cloruro de sodio en plantas micorrizadas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y su efecto en el contenido de vinblastina y vincristina

#### RESUMEN

Las tensiones bióticas y abióticas inducen en las plantas una cadena de procesos cuya activación fisiológica determinan cambios metabólicos que resultan en la acumulación de metabolitos que facilitan la adaptación de la planta. La presente investigación evaluó el efecto del estrés inducido con la aplicación de dos dosis (2.5 y 7.5 mM) de bicarbonato de potasio ( $\text{KHCO}_3$ ) y cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ , 40 mM) en el crecimiento y en el contenido de vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus* inoculadas con el consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) obtenido de la planta medicinal *Rumex mexicanus* (Capítulo VI). Después de 75 días, la inoculación con HMA incrementó significativamente ( $P \leq 0.001$ ) la actividad antioxidante ( $78.60 \mu\text{M planta}^{-1}$ ) y el contenido de compuestos fenólicos ( $23.29 \mu\text{g planta}^{-1}$ ), de vinblastina ( $48.64 \mu\text{g planta}^{-1}$ ) y de vincristina ( $56.13 \mu\text{g planta}^{-1}$ ). Por otro lado, la aplicación de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  también incrementó significativamente ( $P \leq 0.001$ ) el contenido de vinblastina ( $51.17 \mu\text{g planta}^{-1}$ ), vincristina ( $59.04 \mu\text{g planta}^{-1}$ ). Por su parte, el  $\text{NaCl}$  no produjo efectos significativos en el contenido de ambos alcaloides. La adición combinada de  $\text{KHCO}_3$  y  $\text{NaCl}$  inhibió significativamente el porcentaje de colonización micorrízica. Se concluye que la aplicación de  $\text{KHCO}_3$  incrementa el contenido de ambos alcaloides en hojas de *Catharanthus roseus*, de manera similar el efecto de la sola inoculación con los HMA sin aplicación de estrés.

**Palabras clave:** abiótico, biótico, metabolismo secundario, inoculación

## INTRODUCCIÓN

El metabolismo secundario es una parte integral del desarrollo de las plantas, en el que la acumulación de metabolitos secundarios puede demarcar el inicio de etapas de desarrollo, aunque su síntesis en las plantas no parece tener ninguna relevancia en los procesos importantes en su ciclo de vida. No obstante, los productos del metabolismo secundario, tienen un papel fundamental en la interacción de la planta con su ambiente (Treutter, 2006; Neumann *et al.*, 2009).

Las plantas son fuente de una amplia variedad de metabolitos secundarios que tienen múltiples aplicaciones ya sea como fármacos, plaguicidas, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Sin embargo, la desventaja radica en su baja acumulación, ya que la producción de estos metabolitos puede estar regulada espacial o temporalmente, es decir ocurre en células, órganos y tejidos específicos, así como en fases determinadas del ciclo de la vida de la planta y bajo condiciones estacionales (Trejo y Rodríguez, 2007).

Es evidente que en numerosas plantas, los metabolitos secundarios son el producto de la evolución biológica bajo condiciones ecológicas definidas. Las tensiones (estrés) bióticas y abióticas inducen en las plantas una serie de procesos fisiológicos como el reconocimiento de señales, cambios en flujos intracelulares de iones, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , acumulación de especies reactivas de oxígeno, fosforilación de ciertas proteínas, y transcripción de los genes requeridos para la síntesis de ABA, etileno, jasmonato, ácido salicílico, y otros compuestos. La activación fisiológica de estos procesos determinan sucesivos cambios metabólicos que resultan en la acumulación de metabolitos que facilitan la adaptación de la planta al ambiente (Malenčić *et al.*, 2004; Ryabushkina, 2005).

Actualmente existen trabajos que reportan que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) al ser inoculadas en plantas medicinales producen cambios significativos en la

composición química de los tejidos de las plantas (Abu-Zeyad *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002). Por ejemplo, Kapoor *et al.* (2004) demostraron que la inoculación de dos HMA (*Glomus fasciculatum* y *Glomus macrocarpum*) incrementó significativamente la concentración de aceite esencial de *Foeniculum vulgare* Mill. Por su parte, Morone-Fortunato y Avato (2008) reportó un aumento en la producción de glándulas secretoras en plantas micropropagadas de *Oreganum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link), al ser inoculadas con *Glomus viscosum*.

Por lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de riegos con soluciones de dos dosis de bicarbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>), una de cloruro de sodio (NaCl) y su combinación, en el incremento de la capacidad atrapadora de radicales libres, el poder antioxidante mediante la reducción del ión férrico y el contenido de compuestos fenólicos, vinblastina y vincristina de plantas micorrizadas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **a) Crecimiento y evaluación de actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y alcaloides por efecto de estrés abiótico.**

Las plántulas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Plántulas de Tetela S. de R. L. de C. V. Cuernavaca, Morelos) con siete semanas de crecimiento, fueron llevadas al invernadero para ser transplantadas a macetas que contenían un kilogramo de sustrato (peat moss y agrolita, 1:1 v/v) previamente pasteurizado, durante tres días. En el invernadero la temperatura y la humedad relativa fue monitoreada con dog data logger modelo 150.

Las plántulas fueron inoculadas al momento del trasplante, con 10 gramos del inoculo el cual fue aplicado directamente sobre su sistema radical (Alarcón *et al.*, 2004).

Dicho inóculo fue obtenido de la rizósfera de la planta medicinal *Rumex mexicanus* Meisn. y propagado en invernadero. El inóculo contenía 222 esporas en 50 g y la planta hospedante tuvo un porcentaje de colonización del 40%; además el consorcio estuvo integrado por HMA pertenecientes al género *Glomus* (Ver Capítulo VI).

Los tratamientos estuvieron en función de dos dosis (2.5 y 7.5 mM) de bicarbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>, Fermont<sup>®</sup>); una de cloruro de sodio (NaCl, 40 mM), y su combinación, aplicados a plantas micorrizadas (+M) como a plantas sin micorriza (-M). Se consideraron 12 tratamientos con 10 repeticiones, producto de las combinaciones de los factores previamente mencionados. El criterio en la selección de las dosis de KHCO<sub>3</sub> y de NaCl estuvieron en función de trabajos previamente realizados donde se muestra la tolerancia de *C. roseus* a la aplicación de dichos compuestos, sin alterar significativamente su desarrollo (Cartmill *et al.*, 2008; Cartmill *et al.* [En preparación]). El suministro de las dosis de los compuestos químicos se realizó cada tercer día en aplicaciones de 200 mL por planta, en sus respectivos tratamientos.

Después de 75 días, las plantas fueron cosechadas para proceder a la evaluación del número de hojas, botones y flores, la biomasa seca total y de hojas, tallos, raíces, flores y botones florales. Además, se determinó el área foliar, el contenido de compuestos fenólicos totales, la actividad antioxidante total, el contenido de los alcaloides vinblastina y vincristina, y el porcentaje de colonización micorrízica.

El área foliar fue determinada con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100). La biomasa seca se obtuvo al pesar, por separado, hojas, flores, botones florales, tallos y raíces de las plantas, en una balanza analítica (Sartorius, Modelo Analytic AC 210S), después de que los diferentes órganos de la planta fueron secados en un horno (FELISA, Modelo 242-A) a 70°C por 72 h.

El contenido de compuestos fenólicos totales se evaluó por el ensayo con Folin-Ciocalteu, utilizando al ácido clorogénico como estándar (Singleton y Rossi, 1965; Soong y Barlow, 2004). Se tomó 0.1 g de tejido seco de hoja, el cual se maceró en un mortero con 3 mL de metanol al 80%. Después el extracto fue centrifugado por 15 minutos a 15000 rpm. Posteriormente, se tomaron 30  $\mu\text{L}$  del extracto adicionándole 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 150  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu. Transcurridos 30 minutos se tomó la lectura de absorbancia a 725 nm en espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® Instruments). Los resultados fueron expresados como microgramos de equivalentes de ácido clorogénico por gramo de tejido fresco ( $\mu\text{g}$  ácido clorogénico  $\text{g}^{-1}$ ).

La actividad antioxidante total se determinó con el ensayo de decoloración radical 1,1-difenil-2-picrildrazil (DPPH) utilizado como compuesto antioxidante Trolox (Matthäus, 2002). Para lo anterior, se tomó 0.1 g de tejido seco de hoja, el cual se maceró en un mortero con 3 mL de metanol al 80%. Posteriormente, se tomaron 75  $\mu\text{L}$  del extracto y se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de solución de DPPH. Se tomó una lectura inicial de absorbancia a 515 nm; y después, las muestras fueron incubadas por 15 minutos y se leyó la absorbancia final en espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech® Instruments). Los resultados fueron expresados como micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de tejido fresco ( $\mu\text{M}$  Trolox  $\text{g}^{-1}$ ).

Para el contenido de los alcaloides vinblastina y vincristina se utilizó el método del TPT (Nagaraja *et al.*, 2002). Se tomó 0.1 g de tejido seco de hoja, el cual se maceró en un mortero con 3 mL de metanol al 80%. Se tomaron alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido y se añadieron 46  $\mu\text{L}$  de solución de hierro III ( $0.01\text{mol}/\text{dm}^{-3}$ ) y 184  $\mu\text{L}$  de 2,4,6-tris (2-piridil)-1,3,5-triazina (0.2%) y se sumergieron en agua a 100 °C durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas y se realizó una dilución con metanol al 80%

(1:25). La absorbancia de las muestras fueron leídas a 590 nm en espectrofotómetro (Synergy 2, Biotech<sup>®</sup> Instruments).

El porcentaje de colonización micorrízica en las raíces de *Catharanthus roseus*, fue evaluado por el método de Phillips y Hayman (1970) descrito por Ferrera-Cerrato *et al.*, (1993) [Ver procedimiento detallado en capítulo V].

Se utilizó un experimento factorial 2x6 en un diseño completamente al azar, obteniendo 12 tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Los factores fueron los siguientes: dos niveles de inoculación (plantas con y sin HMA), y seis niveles de estrés (Testigo sin estrés, 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 40 mM de NaCl, 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, y 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl). Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2002), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

**b) Evaluación del poder reductor por el ensayo de FRAP, Tamizaje fitoquímico y determinación de los alcaloides vincristina y vinblastina por Resonancia magnetica nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H) en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.**

Los extractos metanólicos de las plantas testigo (sin estrés) y a las que se les aplicó 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> con y sin micorriza por haber presentado resultados más promisorios, fueron sometidos a la evaluación del poder antioxidante mediante la reducción del ión férrico a ión ferroso. Además se realizó el tamizaje fitoquímico correspondiente para la identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios presentes y la determinación de los alcaloides vincristina y vinblastina por resonancia magnetica nuclear de protón (RMN <sup>1</sup>H).

La determinación del poder reductor se evaluó mediante el ensayo FRAP (adaptado de Benzie y Strain, 1996). Se tomó 1 g de tejido seco de hoja, el cual fue macerado directamente con 20 mL de metanol (MeOH), agitando eventualmente durante 5 días. El producto obtenido fue evaporado en rotavapor hasta sequedad, obteniéndose en cada caso el rendimiento del proceso extractivo. Después se colocaron en un vial ámbar 2,700  $\mu\text{L}$  de solución FRAP (ANEXO 2), 150  $\mu\text{L}$  de muestra y 150  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Las absorbancias fueron medidas en un espectrómetro UV-Vis (Varian modelo Cary 100) 8 minutos después de mezclar las soluciones a una longitud de onda de 593 nm. Para la lectura del blanco se empleó la solución FRAP, como referencia el ácido ascórbico y como control 2,700  $\mu\text{L}$  de solución FRAP y 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Todas las lecturas se realizaron por triplicado. La capacidad de reducción férrica se calculó en base a una curva de calibración, utilizando soluciones de concentración conocida de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) en un rango de 100-1000  $\mu\text{M}$ . La ecuación generada por la curva de calibración fue la siguiente:  $\text{Abs} = 0.0019 \text{ conc.} + 0.10715$ . Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ .

El análisis fitoquímico de los extractos de las plantas fue realizado tomando como base métodos cualitativos estándar como son pruebas colorimétricas y cromatografía en capa delgada (Domínguez, 1973; Cseke *et al.*, 2006). Así, el tamizaje fitoquímico de los extractos se llevó a cabo en cromatofolios de silicagel de 4 x 7cm, usando viales conteniendo 20 mg del extracto disueltos en 1 mL de MeOH, empleando 15 aplicaciones puntuales por muestra. Los sistemas de elución empleados fueron mezclas de benceno/acetona/MeOH (9:1:0, 7:3:0 y 7:3:1).

La evaluación de los alcaloides vincristina y vinblastina por RMN<sup>1</sup>H (Kim *et al.*, 2006). Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón <sup>1</sup>H fueron obtenidos en un equipo de la marca Varian modelo Mercury Plus a 300 MHz para <sup>1</sup>H. Los desplazamientos

químicos son reportados en partes por millón (ppm), tomando como referencia interna referida a cero la señal de tetrametilsilano (TMS). Para la estandarización, identificación y determinación se utilizó metanol deuterado (MeOH-D<sub>4</sub>) usando una secuencia de pulsos estándar. Para la identificación de los alcaloides en las muestras problema se utilizó una concentración de 20 mg de extracto metanólico disueltos en 0.7 mL de MeOH-D<sub>4</sub>, usando como referencias externas 4-F-Benzaldehído (1 µL, 1.15 mg, 9.27 µmol) y 1,3,5-trimetil benceno (Mesitileno, 1 µL, 0.86 mg, 7.18 µmol ) como base para la integración.

El análisis estadístico se hizo con un ANOVA de una vía y un tratamiento posterior de Tukey.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **a) Crecimiento y evaluación de actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y alcaloides por efecto de estrés abiótico.**

Se obtuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en el número de hojas por efecto de los factores HMA, estrés y la interacción estrés x HMA (Cuadro 7.1). Con respecto al factor HMA, las plantas no micorrizadas presentaron mayor número de hojas que las micorrizadas. En lo referente al estrés, la aplicación de 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> produjo significativamente mayor número de hojas con respecto a las plantas sin estrés no micorrizadas. En contraste, la adición de NaCl redujo en 20% el número de hojas con respecto a las plantas sin estrés no micorrizadas.

En la interacción estrés x HMA, se observó que las plantas sin estrés micorrizadas tuvieron mayor número de hojas que su contraparte sin micorriza (Cuadro 7.1). En contraste, la aplicación de cualquier tipo de estrés en plantas micorrizadas, resultó en menor número de hojas con respecto a las plantas no micorrizadas (Cuadro 7.1). El tratamiento con mayor número de hojas correspondió a plantas sin micorriza con aplicación de 2.5 mM

de  $\text{KHCO}_3$ , mientras que el tratamiento con menor número de hojas correspondió a plantas micorrizadas con aplicación combinada de 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  y 40 mM de NaCl.

En el presente trabajo se observó que las plantas sin estrés micorrizadas presentaron mayor número de hojas. Al respecto, algunos autores sugieren que la inoculación con HMA promueve el crecimiento en las plantas, al incrementar la absorción nutrimental, y el número de hojas es un parámetro de crecimiento que denota el beneficio de la simbiosis (Greipsson y El-Mayas, 2002; Robertson *et al.*, 2007).

Cuadro 7.1. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y la aplicación de cloruro de sodio (NaCl), y bicarbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>), sobre el número de hojas, flores y botones florales en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días.

Tipo de Estrés	HMA	Número		
		Hojas	Flores	Botones florales
Testigo (Sin estrés)	Si	58.75 bc	4.50 a	1.75 a
	No	50.75 cde	3.75 a	1.00 a
40 mM NaCl	Si	46.00 def	4.25 a	0.50 a
	No	40.75 ef	4.50 a	1.50 a
2.5 mM KHCO <sub>3</sub>	Si	51.75 cde	4.00 a	1.75 a
	No	72.00 a	3.00 a	1.75 a
7.5 mM KHCO <sub>3</sub>	Si	57.50 bcd	3.25 a	1.75 a
	No	64.50 ab	5.50 a	2.00 a
2.5 mM KHCO <sub>3</sub> + 40 mM NaCl	Si	35.25 f	3.75 a	1.00 a
	No	58.25 bc	3.75 a	2.00 a
7.5 mM KHCO <sub>3</sub> + 40 mM NaCl	Si	43.00 ef	4.50 a	1.00 a
	No	57.75 bcd	5.50 a	2.00 a
	DMS	11.83	3.41	1.70
Significancia:				
	Estrés	0.001	NS	NS
	HMA	0.001	NS	0.05
	Estrés x HMA	0.001	NS	NS

Valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ , n=4). DMS= Diferencia mínima significativa, NS= No significativo.

La aplicación de 40 mM de NaCl redujo el número de hojas (Cuadro 7.1). El efecto negativo ha sido reportado para otro tipo de plantas, como por ejemplo *Citrus reshni* Hort. ex Tan y *Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis* que al ser expuestas a riegos con diferentes dosis de NaCl, expresaron una reducción en el número de hojas conforme aumentaba la concentración (Anjum, 2008). De manera similar, Asaeda *et al.* (2003) observaron que el número de hojas en *Phragmites australis* fue afectado por la salinidad.

Con respecto al número de flores y botones no se apreciaron diferencias significativas en los factores HMA, estrés y la interacción estrés x HMA (Cuadro 7.1).

En el peso seco de hoja se obtuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en los tres factores estudiados. HMA, estrés y la interacción estrés x HMA. En lo que respecta al factor HMA, las plantas micorrizadas tuvieron menor peso seco de hoja que las plantas no micorrizadas. En el factor estrés, las plantas a las cuales se aplicaron 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  presentaron mayor peso seco de hojas con respecto a las plantas sin éstres no micorrizadas (Cuadro 7.2).

En la interacción estrés x HMA se observó que las plantas sin éstres micorrizadas presentaron mayor peso seco de hojas que las plantas sin éstres no micorrizadas (Cuadro 7.2). Por otra parte, las plantas sin micorriza, a las que se aplicó tanto 2.5 como 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  mostraron los valores más altos de peso seco de hoja, al ser comparados con las plantas sin éstres no micorrizadas (Cuadro 7.2). En contraste las plantas micorrizadas a las que se les aplicó de manera combinada 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  y 40 mM de NaCl mostraron el valor significativamente ( $P \leq 0.001$ ) más bajo con respecto a las plantas sin éstres micorrizadas (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.2. Efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y la aplicación de cloruro de sodio (NaCl) y bicarbonato de potasio (KHCO<sub>3</sub>), sobre el peso seco de hojas, flores y botones florales, tallo y raíz en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días.

Tipo de Estrés	HMA	Peso seco (g)			
		Hojas	Flores y botones florales	Tallo	Raíz
Testigo (Sin estrés)	Si	0.62 bc	0.05 abc	0.21 b	0.22 de
	No	0.50 cde	0.04 bc	0.16 bcde	0.19 de
40 mM NaCl	Si	0.42 def	0.04 bc	0.12 def	0.17 ef
	No	0.40 ef	0.05 abc	0.10 ef	0.18 def
25 mM KHCO <sub>3</sub>	Si	0.49 cde	0.05 abc	0.15 bcdef	0.17 ef
	No	0.83 a	0.04 abc	0.28 a	0.35 b
75 mM KHCO <sub>3</sub>	Si	0.58 cde	0.04 bc	0.19 bc	0.22 cde
	No	0.78 ab	0.08 a	0.29 a	0.47 a
25 mM KHCO <sub>3</sub> + 40 mM NaCl	Si	0.28 f	0.04 c	0.08 f	0.09 f
	No	0.61 bc	0.05 abc	0.19 bcd	0.32 bc
75 mM KHCO <sub>3</sub> + 40 mM NaCl	Si	0.42 ef	0.04 abc	0.13 cdef	0.14 ef
	No	0.61 bcd	0.08 ab	0.21 b	0.27 bcd
	DMS	0.183	0.04	0.07	0.098
Significancia:					
	Estrés	0.001	NS	0.001	0.001
	HMA	0.001	0.01	0.001	0.001
	Estrés-HMA	0.001	0.05	0.001	0.001

Valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ , n=4). DMS= Diferencia mínima significativa, NS= No significativo.

Las plantas sin estrés micorrizadas presentaron mayor peso seco de hoja al compararse con las plantas sin estrés no micorrizadas (Cuadro 7.2). La respuesta en crecimiento de las plantas que son colonizadas por uno o más hongos micorrizcos arbusculares, es a menudo resultado del incremento en nutrición de P y otros nutrientes (Velasco *et al.*, 2001). Por su parte, Elsen *et al.* (2003) explican que plantas de *Musa* spp., inoculadas con *Glomus mosseae* presentaron un incremento del 129 % en el peso seco de la parte aérea, en comparación con las plantas no micorrizadas. De igual manera Fagbola *et al.* (2001), encontraron que al inocular *Gliricidia sepium* con *Glomus deserticola*, el peso seco hojas incremento significativamente

Los resultados muestran que la aplicación combinada del NaCl y KHCO<sub>3</sub> en el peso seco de hojas en *C. roseus*, disminuyó de manera significativa, aún estando la micorriza presente. Lo anterior es contrario a lo expuesto por Hatimi (1999), quien al exponer plantas micorrizadas de *Acacia cyanophylla* Lind. a NaCl, observó que su biomasa no fue afectada.

Con respecto al peso seco de flores y botones florales, se obtuvieron diferencias significativas en los factores HMA ( $P \leq 0.001$ ) y la interacción estrés x HMA ( $P \leq 0.05$ ). Sin embargo para el factor estrés no se obtuvieron diferencias significativas (Cuadro 7.2). En el factor HMA, se observó que la mayoría de las plantas micorrizadas expresaron valores menores de peso seco de flores y botones que las plantas no micorrizadas. En lo que respecta a la interacción estrés x HMA, se observó que las plantas sin estrés micorrizadas presentaron mayor peso seco de flores y botones que las plantas sin estrés no micorrizadas (Cuadro 7.2). Además, las plantas no micorrizadas con aplicación de 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> aumentaron en un 100% el peso seco de flores y botones florales, en comparación con las plantas sin estrés no micorrizadas (Cuadro 7.2).

En el peso seco de tallo se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) para los factores HMA, estrés, y estrés x HMA (Cuadro 7.2). En lo que respecta al factor HMA se observó que las plantas no micorrizadas tuvieron valores superiores en el peso seco de tallo que las plantas micorrizadas (Cuadro 7.2). En el factor estrés se obtuvo un incremento del 81 % en el peso seco de tallo en plantas que fueron sometidas a riegos de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ ; en contraste la aplicación de 40 mM de NaCl disminuyó en un 38% el peso seco de tallo, en comparación con las plantas sin estrés no micorrizadas (Cuadro 7.2).

En el factor estrés x HMA se observó que las plantas sin estrés micorrizadas presentaron mayor peso seco de tallo aunque sin efectos significativos, que las plantas sin estrés no micorrizadas. Las plantas no micorrizadas a las cuales se les aplicó de manera independiente 2.5 ó 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  presentaron los valores más altos en el peso seco de tallo, comparado con plantas sin estrés no micorrizadas. Contrariamente la aplicación combinada de 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  y 40 mM de NaCl, disminuyó un 62% el peso seco de tallo en plantas micorrizadas al compararse con plantas sin estrés micorrizadas (Cuadro 7.2).

Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en el peso seco de raíz por efecto de factores HMA, estrés y la interacción HMA x estrés (Cuadro 7.2). Independientemente del estrés, las plantas micorrizadas presentaron los valores más bajos en el peso seco de raíz al ser comparadas con plantas no micorrizadas (Cuadro 7.2). Con respecto al factor estrés, se observó que las plantas a las que se aplicó 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  aumentaron en un 147% el peso seco de raíz, con respecto a las plantas sin estrés no micorrizadas. En contraste, las plantas con aplicación de 40 mM de NaCl presentaron una reducción del 6% en el peso seco de raíz en comparación con las plantas sin estrés no micorrizadas (Cuadro 7.2).

En la interacción de estrés x HMA se observa que las plantas sin micorriza con aplicación de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  presentaron los valores más altos de peso seco de raíz. En contraste, las plantas micorrizadas con aplicación combinada de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  y 40 mM de NaCl, tuvieron una disminución del 36% en el peso seco de raíz al compararse con plantas sin éstres micorrizadas (Cuadro 7.2).

El incremento en el peso seco de raíz en plantas inoculadas con HMA ya ha sido reportado por otros autores. Lo cual puede deberse a que la micorriza arbuscular además de emplear el micelio externo para adquirir nutrimentos, también puede promover el crecimiento radical con el objetivo de facilitar la absorción de macro y micronutrimentos (Giri *et al.*, 2005).

La alcalinidad inducida por el  $\text{KHCO}_3$  y el NaCl afectó el peso seco de la raíz de plantas de *C. roseus* colonizadas por hongos micorrízicos arbusculares. Este efecto es contrario a los reportes donde describen que la presencia de la micorriza arbuscular disminuye el efecto perjudicial a la exposición al NaCl en el peso seco de raíz en plantas de maíz y lechuga (Sheng *et al.*, 2008; Ruíz y Azcón, 2000).

En el peso seco total se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) por efecto de factores HMA, estrés, y la interacción estrés x HMA (Figura 7.1). En lo que respecta al factor HMA, se aprecia que las plantas inoculadas con HMA presentaron significativamente menor peso seco total que las plantas sin micorriza (Figura 7.1). En cuanto al factor estrés, las plantas con aplicación de 2.5 y 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  incrementaron en un 33% su peso seco total en comparación con plantas sin éstres no micorrizadas. Entre el resto de los tratamientos no existieron diferencias significativas; sin embargo, la aplicación de 40 mM de NaCl disminuyó en un 25 % el peso seco total, al compararse con plantas sin éstres no micorrizadas (Figura 7.1).

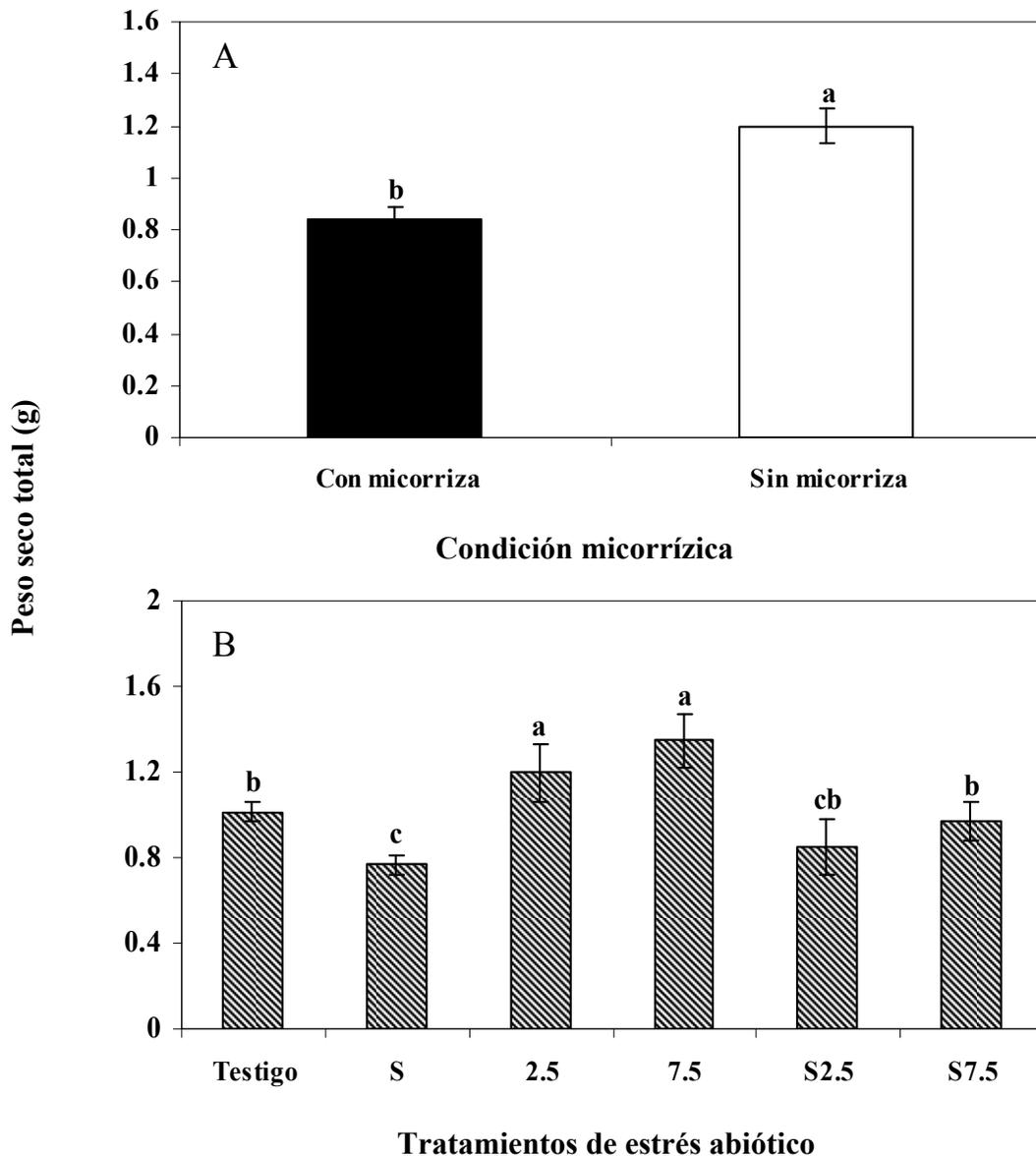
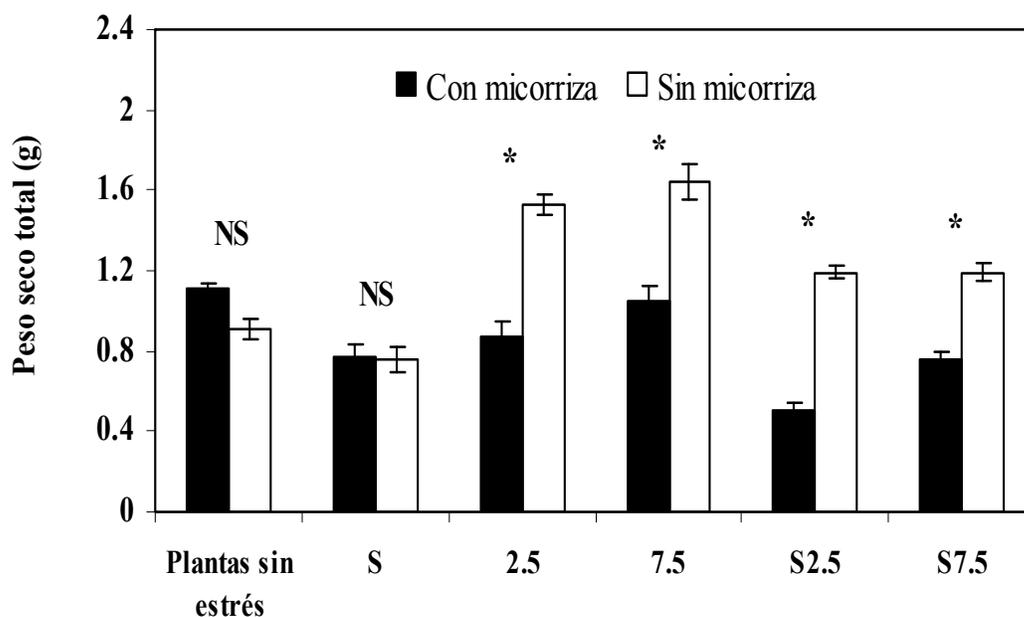


Figura 7.1. Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el peso seco total de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días. n=4. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). Simbología: Testigo=Sin estrés, S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , 7.5= estrés con 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , S2.5= estrés con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  + 40 mM de NaCl.

En la interacción estrés x HMA se observa que las plantas sin estrés micorrizadas presentaron mayor peso seco total, que las plantas sin estrés no micorrizadas (Figura 7.2). El tratamiento con mayor número de hojas correspondió a plantas no micorrizadas con aplicación de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , incrementando un 80% el peso seco total de las plantas al compararse con plantas sin estrés no micorrizadas (Figura 7.2). En contraste, las plantas micorrizadas con aplicación combinada de 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  y 40 mM de NaCl, mostraron un disminución del 55% en el peso seco total, al compararse con plantas sin estrés micorrizadas (Figura 7.2).



#### Tratamientos de estrés abiótico y biótico

Figura 7.2. Peso seco total de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la aplicación de estrés abiótico e inoculación con hongos micorrizicos arbusculares, después de 75 días. n=4. Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , 7.5= estrés con 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , S2.5= estrés con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  + 40 mM de NaCl. \* Sobre las barras indica efectos significativos (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre los tratamientos micorrizados y los no micorrizados. NS = no significativo.

En las plantas sin estrés micorrizadas se apreció un incremento en el peso seco total por efecto de la inoculación con HMA. Uno de los efectos benéficos de la micorriza arbuscular es promover el crecimiento de las plantas hospedantes, al incrementar el volumen del suelo explorado que favorece la absorción de nutrimentos por la planta contribuyendo en el aumento de su peso seco total (Eon *et al.*, 1994; Kahiluoto *et al.*, 2000; Monzón y Azcón, 2001; Giri *et al.*, 2007). De manera similar, Sharma *et al.* (2008) evaluaron el efecto benéfico de tres HMA en la producción de mayor biomasa seca de *Curculigo orchioides* Gaertn., la cual es una planta con propiedades anticarcinogénicas.

El NaCl redujo el peso seco total de *C. roseus*. Al respecto, se ha mencionado que la salinidad, reduce el peso seco de las plantas, al limitar la absorción de agua y nutrientes. Además, produce efectos tóxicos que inhiben la actividad enzimática de la fotosíntesis afectando así la producción de biomasa (Gao y Peng, 2006; Barkla *et al.*, 2007).

Con respecto al área foliar se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en los tres factores HMA evaluados (Figura 7.3). En el factor HMA se aprecia que las plantas micorrizadas mostraron menor área foliar ( $169.2 \text{ cm}^2$ ) que las plantas no micorrizadas ( $248.75 \text{ cm}^2$ ) (Figura 7.3). Por su parte, en el factor estrés las plantas con aplicación de 2.5 ó 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , presentaron incrementos del 17 y 20 % en el área foliar respectivamente, al ser comparados con plantas sin estrés no micorrizadas. En contraste, el NaCl redujo en un 17% el área foliar de las plantas (Figura 7.3).

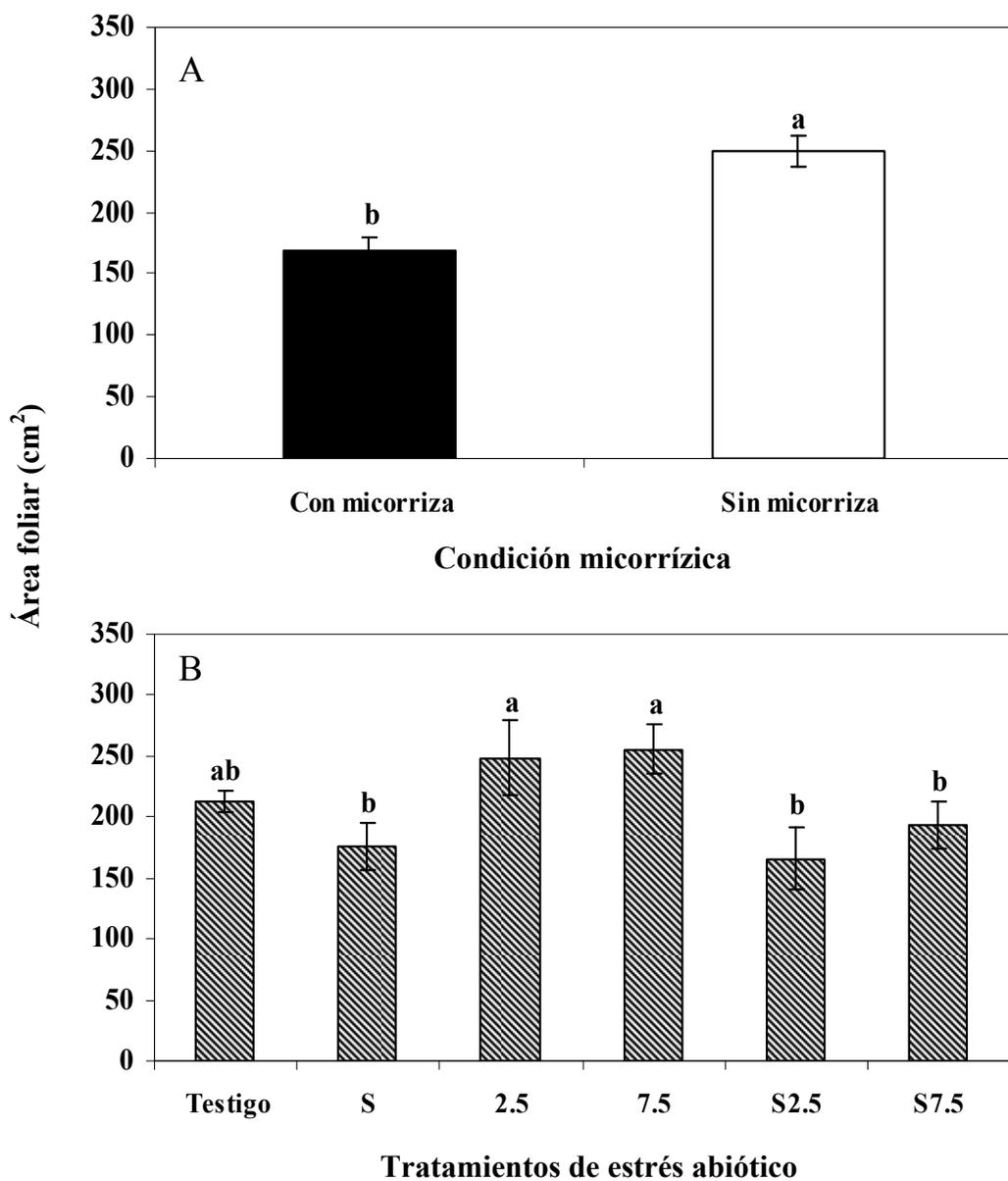


Figura 7.3. Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el área foliar de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días. n=4. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ). Simbología: Testigo= Sin estrés, S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl.

En la interacción estrés x HMA se observa que plantas no micorrizadas a las cuales se les aplicó 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , presentaron la mayor área foliar ( $322.29 \text{ cm}^2$ ) al ser comparadas con las plantas sin éstres no micorrizadas (Figura 7.4), en contraste las plantas micorrizadas con la aplicación combinada con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , y 40 mM de NaCl mostraron la menor área foliar ( $98.47 \text{ cm}^2$ ) (Figura 7.4).

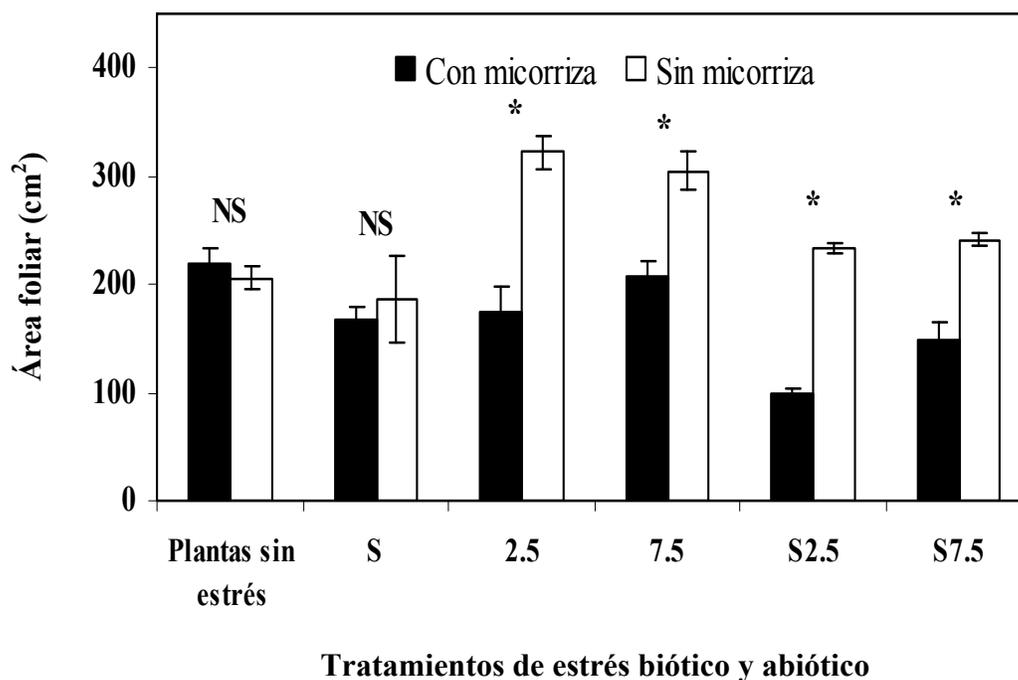


Figura 7.4. Área foliar de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto de la aplicación de estrés abiótico e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares, después de 75 días.  $n=4$ . Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , 7.5= estrés con 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , S2.5= estrés con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés con 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  + 40 mM de NaCl. \* Sobre las barras indica efecto significativo (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre los tratamientos micorrizados y los no micorrizados. NS= no significativo.

La salinidad daña el metabolismo fisiológico de las plantas, especialmente la homeostasis y provocando cambios en el modelo de absorción de los nutrientes, ya que la toma selectiva de los elementos al inducirse la acumulación de  $\text{Na}^{+1}$ , reduce la toma de  $\text{Ca}^{+2}$ , cuyo contenido al igual que el  $\text{Mg}^{+2}$  contribuye en la regulación osmótica y en el transporte de la membrana plasmática. Así, la alteración fisiológica que induce la salinidad repercute en la reducción del área foliar y del crecimiento de plantas expuestas a NaCl (Gao y Peng, 2006).

En la actividad antioxidante evaluada mediante la decoloración del radical DPPH se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en los factores HMA, estrés y estrés x HMA. En el factor HMA, las plantas no micorrizadas mostraron valores significativamente más altos en la actividad antioxidante ( $57.5 \mu\text{M planta}^{-1}$ ) que las plantas micorrizadas ( $64.0 \mu\text{M planta}^{-1}$ ) (Figura 7.5).

En cuanto al estrés, se observó que las plantas con aplicación de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  presentaron mayor actividad antioxidante ( $80.9 \mu\text{M planta}^{-1}$ ), superando a las plantas sin estrés no micorrizadas por un 35%. En contraste, las plantas expuestas a 40 mM de NaCl mostraron una reducción del 18% en la actividad antioxidante con respecto a las plantas sin estrés no micorrizadas (Figura 7.5). En la interacción de HMA x estrés, se observó que las plantas sin estrés micorrizadas tuvieron significativamente mayor actividad antioxidante ( $78.6 \mu\text{M planta}^{-1}$ ) en comparación con plantas sin estrés no micorrizadas ( $41.1 \mu\text{M planta}^{-1}$ ) (Figura 7.6). Las plantas no micorrizadas a las que se aplicó 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  presentaron un incremento de la actividad antioxidante total en un 11% ( $87.7 \mu\text{M planta}^{-1}$ ) al ser comparadas con plantas sin estrés no micorrizadas. El tratamiento con la menor actividad antioxidante fue aquel donde se aplicó la combinación de 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  y 40 mM de NaCl en plantas micorrizadas (Figura 7.6).

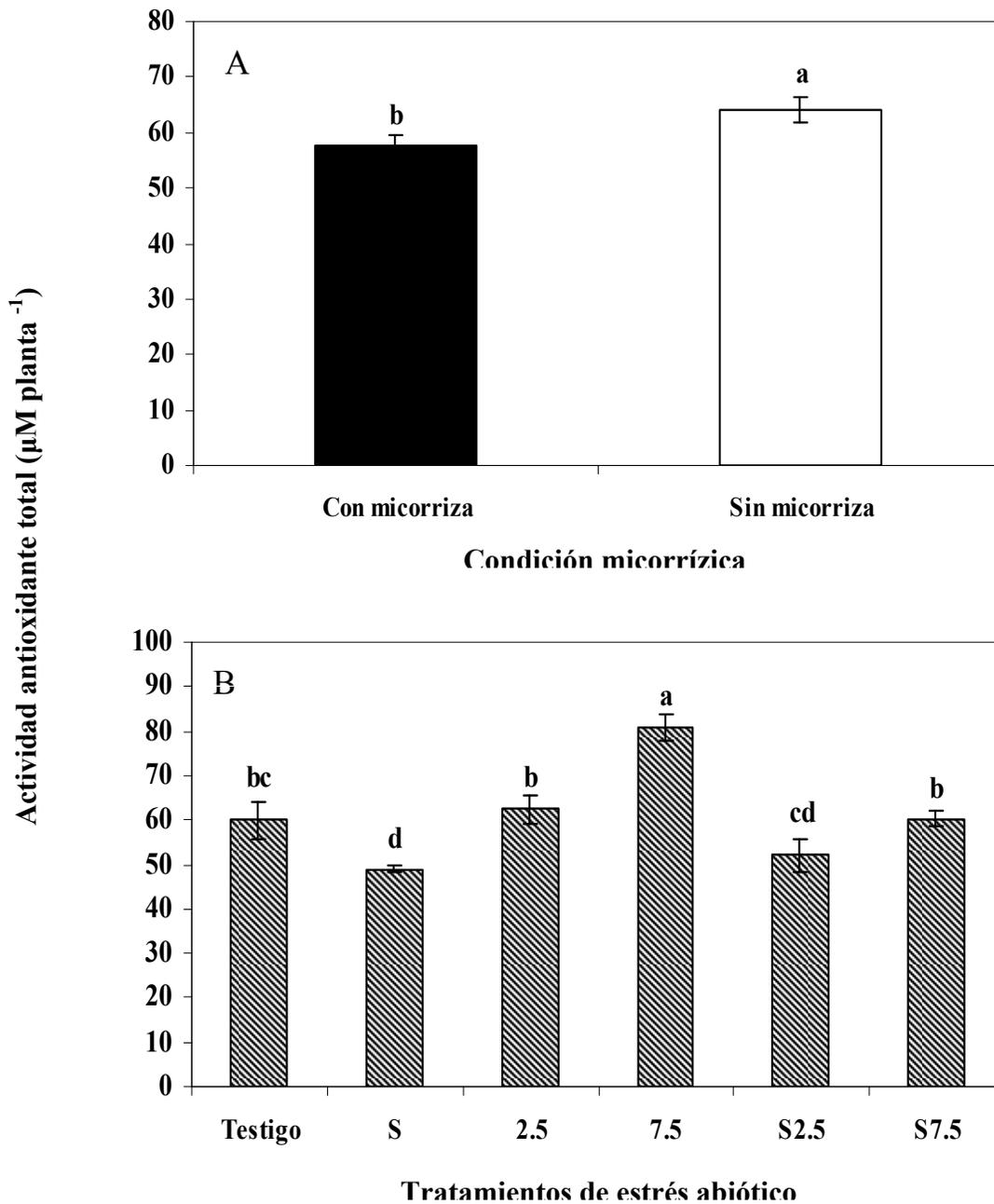
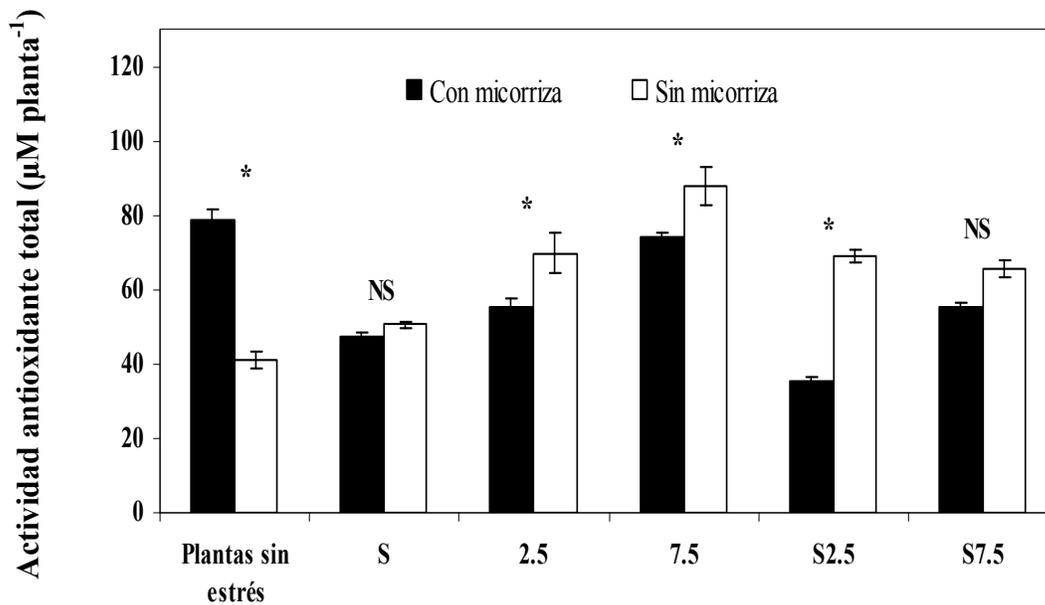


Figura 7.5. Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el actividad antioxidante de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). Simbología: Testigo= Sin estrés, S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl.



#### Tratamientos de estrés abiótico

Figura 7.6. Actividad antioxidante total en hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto del estrés abiótico e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares, después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl. \* Sobre las barras indica diferencias significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre los tratamientos micorrizados y los no micorrizados. NS= no significativo.

Las plantas sin estrés micorrizadas no presentaron diferencias significativas con las plantas expuestas a 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> en la actividad antioxidante total. Al respecto, Toussaint *et al.* (2007) mencionaron el incremento en la producción de antioxidantes (ácidos rosmarínico y cafeico) en plantas de albahaca (*Ocimum basilicum*), por efecto de la inoculación de tres HMA. Lo anterior indica que los HMA representan una manera alternativa de promover el incrementar la producción de compuestos antioxidantes.

Las plantas expuestas a NaCl, expresarán bajos contenidos en la actividad antioxidante debido en parte al efecto negativo de la salinidad al inducir la tensión iónica y la tensión osmótica, generando con ello un estrés oxidativo al acumularse especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales dañan a las células de la planta en altas concentraciones. Por lo anterior, las plantas responden al estrés oxidativo, al activar mecanismos antioxidantes que pueden incrementar la tolerancia de la planta a salinidad (Sairam *et al.*, 2005; Pang y Wang, 2008). Por su parte, Khan *et al.* (2002) sometieron a *Oryza sativa* L. a diferentes concentraciones de NaCl, lo cual indujo una serie de medidas antioxidantes, como la producción de prolina en las raíces de la planta, para reducir dicho estrés.

En el contenido de compuestos fenólicos totales se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre los factores HMA, estrés y HMA x estrés (Figura 7.7).

En el factor HMA, las plantas micorrizadas presentaron menor contenido de compuestos fenólicos ( $21.84 \text{ mg planta}^{-1}$ ) en comparación con plantas sin micorriza ( $17.25 \text{ mg planta}^{-1}$ ). En lo que respecta al factor estrés, las plantas con aplicación de  $7.5 \text{ mM}$  de  $\text{KHCO}_3$  presentaron incrementos del 79% en el contenido de compuestos fenólicos, con respecto a las plantas sin éstres no micorrizadas (Figura 7.7). En la interacción HMA x estrés, las plantas sin éstres micorrizadas tuvieron significativamente ( $P \leq 0.001$ ) mayor contenido de compuestos fenólicos ( $23.29 \text{ mg planta}^{-1}$ ) que las plantas sin éstres no micorrizadas ( $11.36 \text{ mg planta}^{-1}$ ) (Figura 7.8). Sin embargo, las plantas no micorrizadas con aplicación de  $7.5 \text{ mM}$  de  $\text{KHCO}_3$  aumentaron en un 75% el contenido de compuestos fenólicos totales ( $40.91 \text{ mg planta}^{-1}$ ), con respecto a las plantas sin éstres no micorrizadas ( $11.36 \text{ mg planta}^{-1}$ ). En contraste, el tratamiento con la aplicación combinada de  $2.5 \text{ mM}$  de  $\text{KHCO}_3$  y  $40 \text{ mM}$  de NaCl, en presencia de la micorriza arbuscular, presentó el menor contenido de compuestos fenólicos ( $9.89 \text{ mg planta}^{-1}$ ) (Figura 7.8).

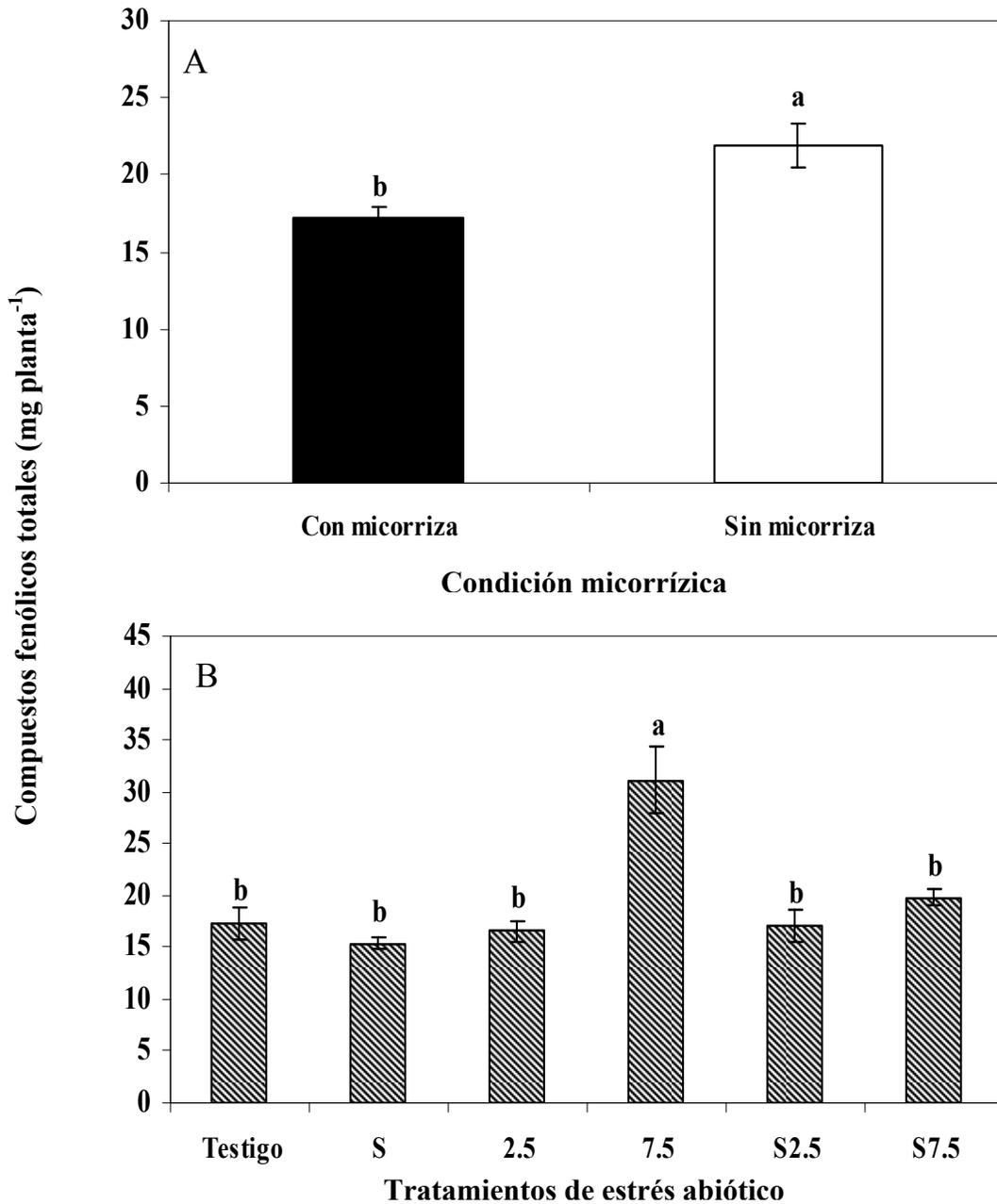
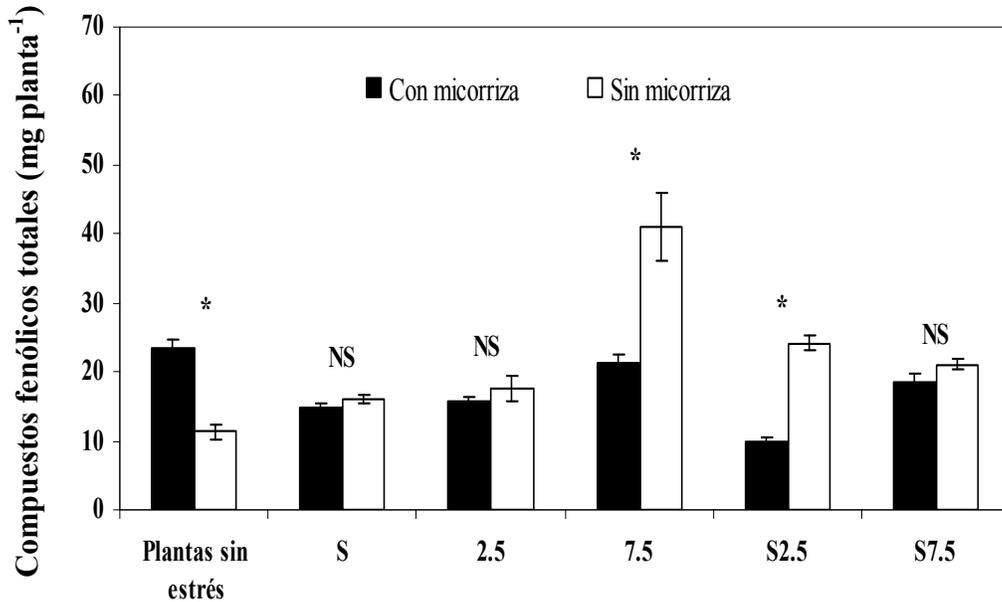


Figura 7.7. Efecto de los factores independientes, inoculación micorrízica (A) y aplicación de factor de estrés abiótico (B), en el contenido de compuestos fenólicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ). Simbología: Testigo= Sin estrés, S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl.



#### Tratamientos de estrés abiótico

Figura 7.8. Contenido de compuestos fenólicos totales en hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto del estrés abiótico e inoculación con hongos micorrízicos arbusculares, después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl. \* Sobre las barras indica diferencias significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre los tratamientos micorrizados y los no micorrizados. NS no significativo.

Los resultados muestran que bajo una condición sin estrés, las plantas sin estrés micorrizadas mostraron mayor contenido de compuestos fenólicos al compararse con plantas sin estrés no micorrizadas. Estos resultados indican que los HMA inducen la síntesis de compuestos fenólicos, como una respuesta a la colonización. Al respecto el establecimiento temprano de la simbiosis del HMA y del crecimiento vegetal depende grandemente de la concentración y compuestos fenólicos, ya que varios compuestos fenólicos son una clase importante de metabolitos secundarios, que pueden activar señales moleculares en sistemas simbióticos y actualmente esta aumentando evidencia que estos

compuestos son capaces de influir en la colonización de la raíz por los HMA (Nair *et al.*, 1991; Volpin *et al.*, 1994; Leadir *et al.*, 1997; Seddas *et al.*, 2009).

Diversos autores han observado considerables aumentos en compuestos fenólicos en el hospedero como resultado de la inoculación con HMA (Charitha y Reddy, 2002; Carlsen *et al.*, 2008). Ejemplo de esto son los flavonoides, compuestos químicos que intervienen como moléculas señal en la colonización micorrízica; así, quercetina es un flavonoide que estimula el crecimiento de las hifas en las esporas de algunos HMA (*Gigaspora rosea*, *Glomus etunicatum* y *Glomus intraradices*) (Woo *et al.*, 2005; Nagahashi y Douds, 2005) aunque para *Gi. gigantea* no tiene ningún efecto. Sin embargo, cuando las esporas germinadas de *Gi. gigantea* son expuestas a quercetina se observa un alargamiento en el micelio por lo que es posible que existan dos tipos de estimuladores hifales. Un tipo induce solamente crecimiento del alargamiento mientras que un segundo tipo induce ramificación (Nagahashi y Douds, 2005).

Por otro lado actualmente se conoce que los compuestos fenólicos exhiben actividades farmacológicas tales como antioxidantes (Hanan *et al.*, 2008). Los flavonoides, por ejemplo, están dentro del grupo más extenso de sustancias fenólicas, cuya estructura química contiene un número variable de grupos hidroxilo, y que tienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martinez-Flóres *et al.*, 2002). Por ello, al consumir las plantas que los contienen, incrementan la actividad antioxidante natural de los tejidos de los animales que los ingieren y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Martinez-Flóres *et al.*, 2002; Nikolaeva *et al.*, 2007; Makris *et al.*, 2008). De ahí que en esta investigación se

observo que el contenido de compuestos fenólicos totales es consistente con la actividad antioxidante en hojas de *C. roseus*.

Es importante mencionar que los compuestos fenólicos son constituyentes fundamentales de las plantas en general; sin embargo, su contenido varía en respuesta a condiciones restrictivas o de estrés (Juszczuk *et al.*, 2004; Ojeda, 2007). En la presente investigación se observó que la exposición de plantas de *C. roseus* al estrés alcalino inducido por 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  incrementó el contenido de compuestos fenólicos, lo cual implicaría el empleo de menor cantidad de las plantas de *C. roseus* en la extracción de estos metabolitos. Por otro lado, al poseer una capacidad antioxidante elevada, esta planta puede contribuir en sanar diferentes padecimientos como son enfermedades cardiovasculares o incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Gimeno, 2004).

En el contenido de vinblastina y vincristina se obtuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) por los tres factores, HMA, estrés y la interacción HMA x estrés (Figura 7.9). Respecto al factor HMA, se observa que plantas micorrizadas ( $33.18 \mu\text{g planta}^{-1}$  para vinblastina y  $38.29 \mu\text{g planta}^{-1}$  para vincristina) presentaron contenidos significativamente menores que plantas no micorrizadas ( $39.76 \mu\text{g planta}^{-1}$  para vinblastina y  $45.88 \mu\text{g planta}^{-1}$  para vincristina) (Figura 7.9).

En cuanto al factor estrés, las plantas expuestas a 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  presentaron los contenidos más altos para vinblastina ( $45.43 \mu\text{g planta}^{-1}$ ) y para vincristina ( $52.41 \mu\text{g planta}^{-1}$ ). En contraste, la aplicación de 40 mM de NaCl disminuyó significativamente el contenido de ambos alcaloides en hojas de *C. roseus* (Figura 7.10).

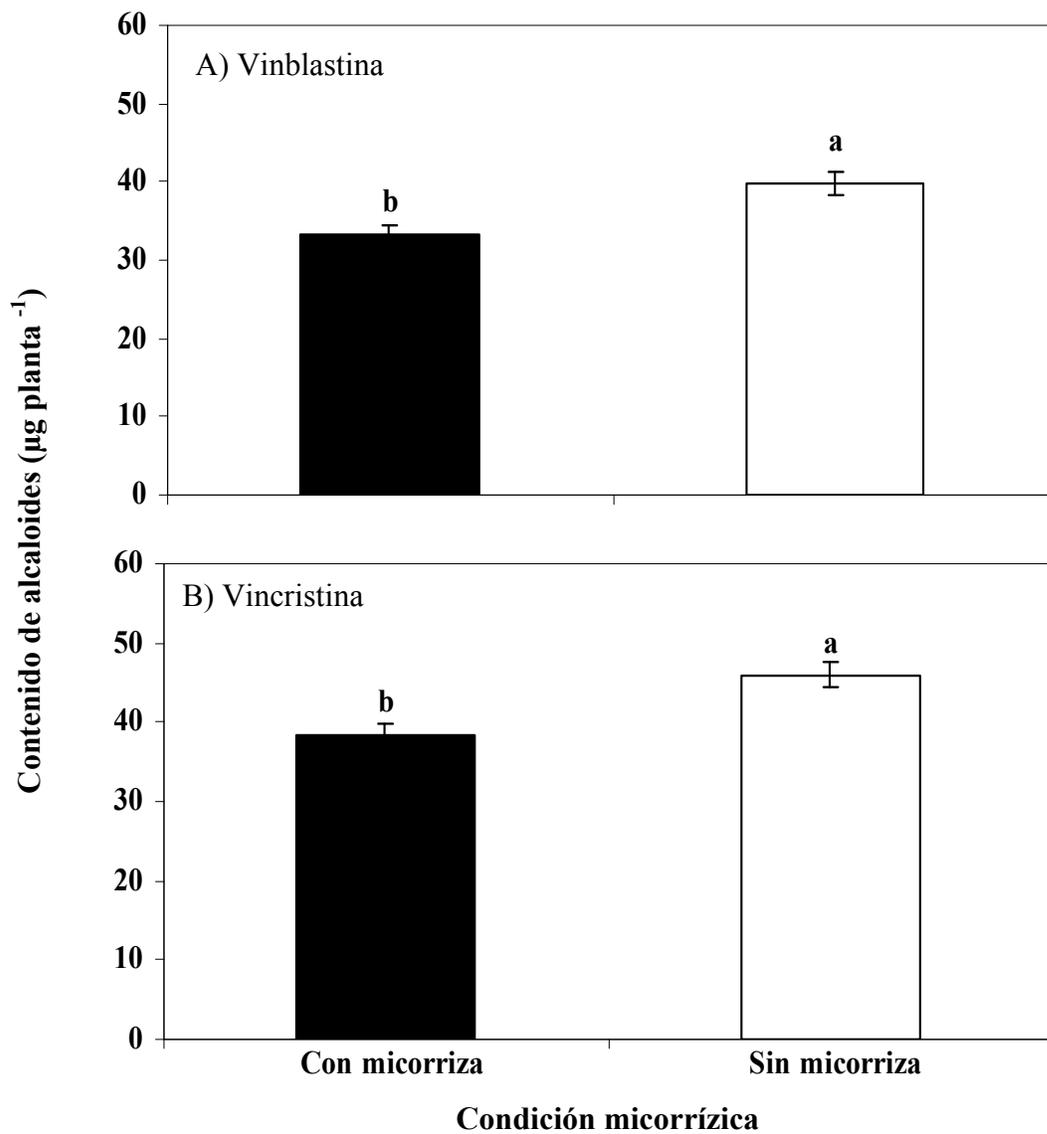
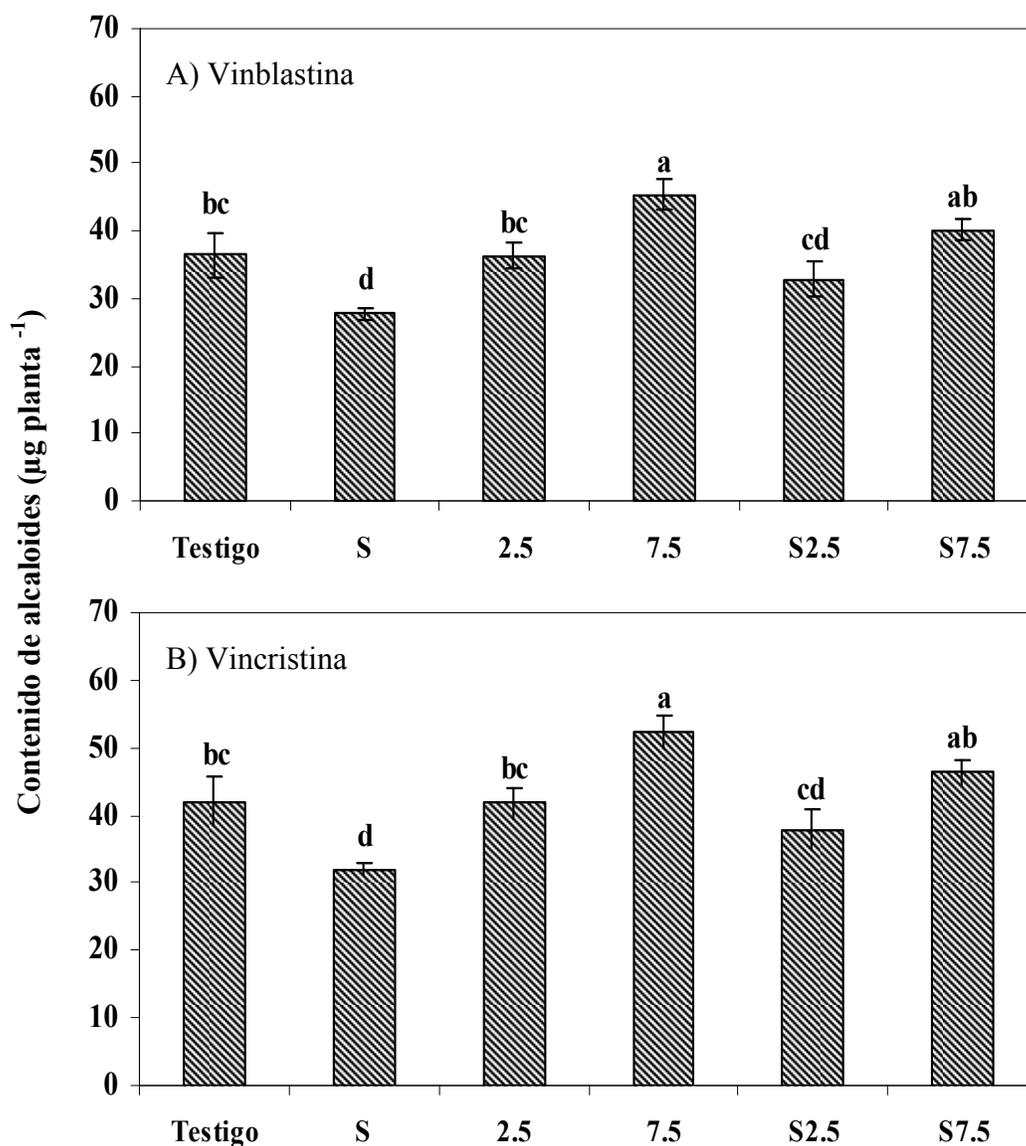


Figura 7.9. Efecto del factor inoculación con hongos micorrízicos arbusculares en el contenido los alcaloides de vinblastina y vincristina, en hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).



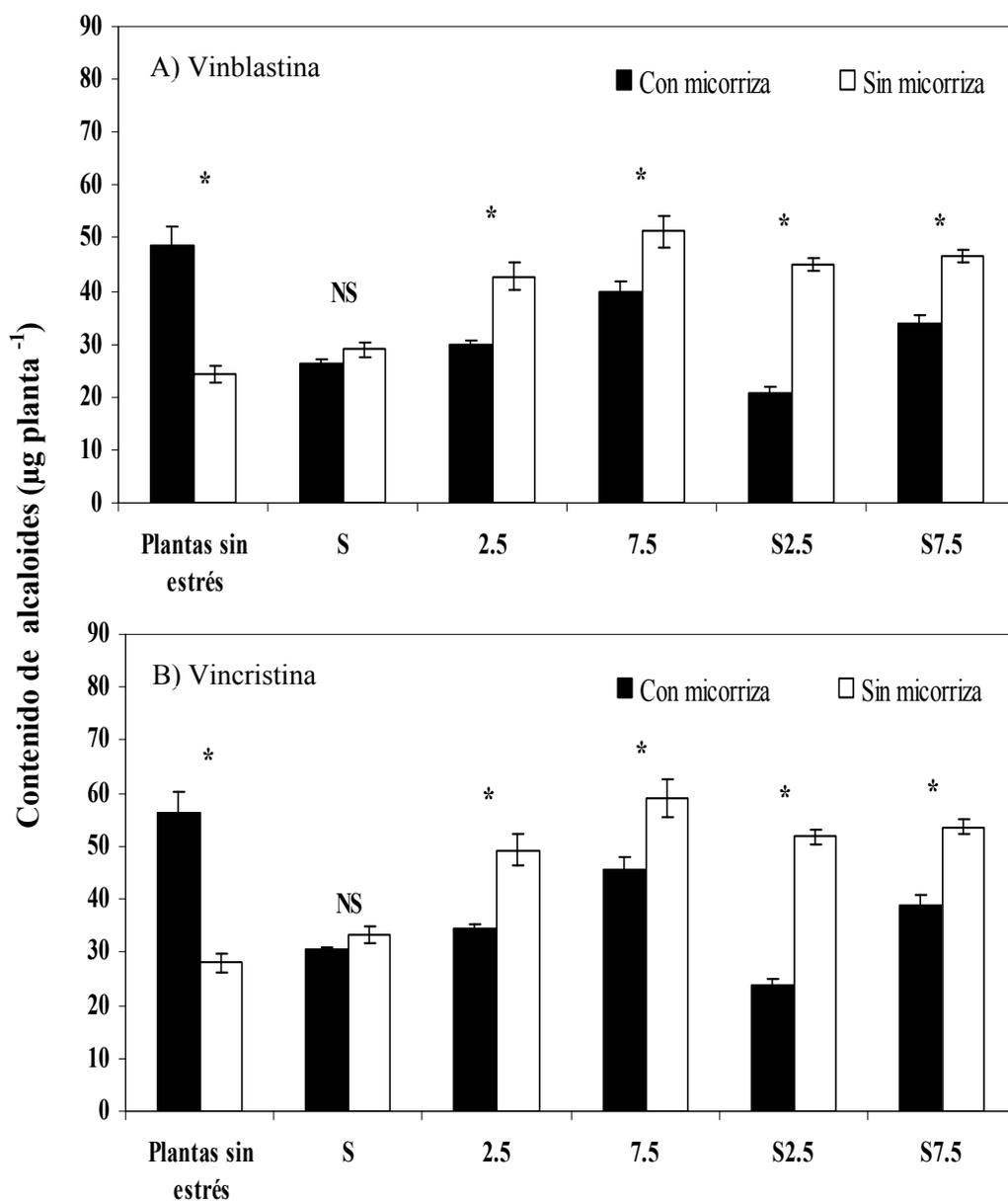
### Tratamientos con estrés abiótico

Figura 7.10. Efecto de la aplicación de factores de estrés abiótico en el contenido de los alcaloides vinblastina y vincristina, en hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). Simbología: T= Sin estrés, S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl.

En la interacción HMA x estrés, las plantas testigo micorrizadas presentaron valores significativamente superiores ( $P \leq 0.001$ ) en el contenido de vinblastina ( $48.64 \mu\text{g planta}^{-1}$ ) y vincristina ( $56.13 \mu\text{g planta}^{-1}$ ) en comparación con las plantas sin estrés no micorrizadas (Figura 7.11). Por otro lado, las plantas no micorrizadas a las cuales se aplicó 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  presentaron mayor contenido de ambos alcaloides ( $51.17 \mu\text{g planta}^{-1}$  para vinblastina y  $59.04 \mu\text{g planta}^{-1}$  para vincristina), superando en un 111% a las plantas sin estrés no micorrizadas en ambos casos (Figura 7.11).

En las plantas, los metabolitos secundarios son el producto de respuesta a tensiones bióticas y/o abióticas que inducen la síntesis de estos principios activos, mismos que pueden ser determinantes para su desarrollo (Ryabushkina, 2005; Neumann *et al.*, 2009). Dentro de los factores bióticos se reporta el inducido por los HMA en plantas medicinales, donde al evaluar el potencial de estos hongos en la síntesis de metabolitos secundarios se observa el incremento en la síntesis de estos compuestos (Toussaint *et al.*, 2007). Por ejemplo, Sailo y Bagyaraj (2005) reportaron que los HMA incrementan significativamente el contenido de forscolina (metabolito empleado en el tratamiento de enfermedades cardíacas, glaucoma, asma y ciertos tipos de cánceres) en plantas de *Coleus forskohlii*. En otro estudio, Kapoor *et al.* (2002) indicaron que la inoculación con *Glomus macrocarpum* incremento en un 90% la concentración de limoneno y carvona de *Anethum graveolens* L.

Con base en lo anterior se puede observar el posible beneficio de la inoculación con HMA en la síntesis de vinblastina y vincristina en plantas de importancia farmacéutica como lo es *C. roseus*. Además este estudio muestra por primera vez el efecto del estrés abiótico inducido por el  $\text{KHCO}_3$  y de la inoculación con HMA en el incremento en la síntesis de ambos alcaloides.



### Tratamientos con estrés abiótico

Figura 7.11. Contenido de alcaloides vinblastina y vincristina en hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., por efecto del estrés abiótico después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Simbología: S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl. \* Sobre las barras indica efecto significativo (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre los tratamientos micorrizados y los no micorrizados. NS= no significativo.

En lo que respecta al estrés abiótico se tienen reportes que muestran el efecto de la salinidad causada por el NaCl, en el incremento del contenido de aceites esenciales en plantas medicinales (Neffati y Marzouk, 2008). Sin embargo, en la presente investigación el estrés inducido por la aplicación de 40 mM de NaCl no produjo efectos significativos en la concentración de ambos alcaloides en las plantas, sino que por el contrario, su aplicación resultó en una disminución del 45% para vinblastina y del 25 % para vincristina, al compararse con en testigo sin micorriza (Figura 7.11).

En cuanto al porcentaje de colonización se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre los tratamientos (Figura 7.12). Se observó que el  $\text{KHCO}_3$  y el NaCl redujeron la colonización micorrízica en plantas de *C. roseus*. El tratamiento que mostró menor reducción de colonización micorrízica fue aquél donde las plantas fueron expuestas a 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  (30%) (Figura 7.12), mientras que el tratamiento donde se aplicó de manera combinada 40 mM de NaCl y 2.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , mostró el menor porcentaje de colonización, disminuyéndola hasta en un 69% con respecto al testigo micorrizado (Figura 7.12).

Los niveles excesivos del NaCl en el suelo inhiben la formación micorrízica y restringe la actividad de la mayoría de los HMA, aunque algunas especies son más tolerantes a estas condiciones (Brundrett y Abbott, 2002). Sin embargo, los resultados de la presente investigación apoyan la evidencia de que la salinidad inhibe el establecimiento de la micorriza arbuscular (Ruíz y Azcón, 2000; Cantrell *et al.*, 2001; Giri *et al.*, 2007; Sheng *et al.*, 2008).

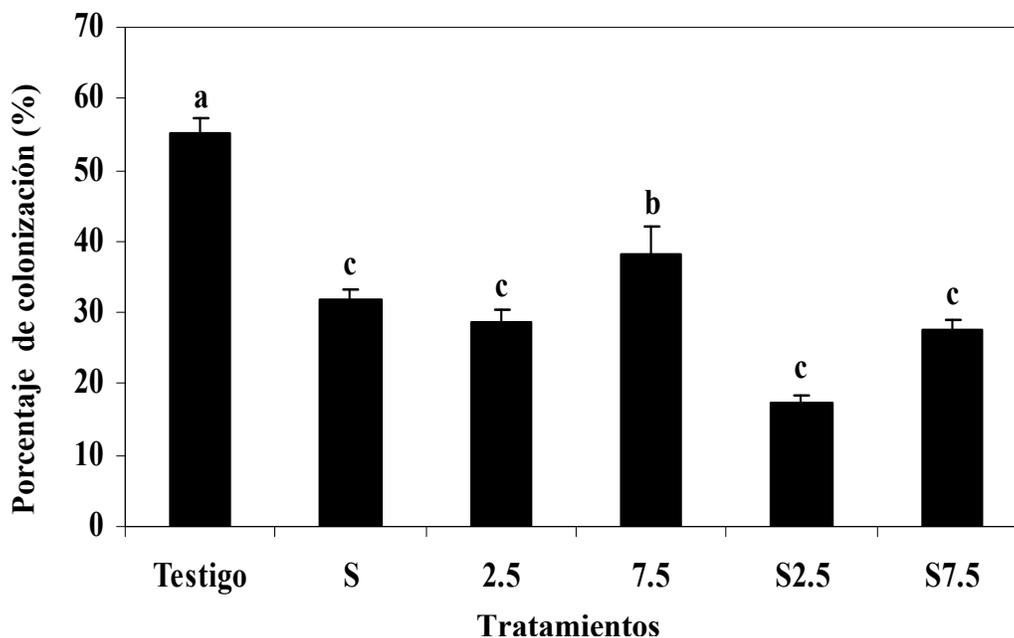


Figura 7.12. Efecto de la aplicación de factor de estrés abiótico, en el porcentaje de colonización micorrízica en raíces de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 75 días. n=6. Medias  $\pm$  error estándar. Letras idénticas sobre las barras son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ). Simbología: T= Sin estrés, S= estrés con 40 mM de NaCl, 2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, 7.5= estrés con 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub>, S2.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl, S7.5= estrés con 2.5 mM de KHCO<sub>3</sub> + 40 mM de NaCl.

**b) Evaluación del poder reductor por el ensayo de FRAP, tamizaje fitoquímico y determinación de los alcaloides vincristina y vinblastina por RMN <sup>1</sup>H en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.**

El cuadro 7.3 muestra los valores obtenidos en la determinación de la capacidad reductora de Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup> mediante el ensayo FRAP de los extractos evaluados en los cuatro tratamientos seleccionados. Se puede apreciar que las plantas sin micorriza a las que se aplico 7.5 mM de KHCO<sub>3</sub> presentaron el mayor poder reductor, seguidas del tratamiento testigo sin micorriza.

Contrariamente, las plantas testigo micorrizadas mostraron menor capacidad reductora (Cuadro 7.3). Estos resultados están intrínsecamente relacionados con la presencia de compuestos de tipo flavónico y coumarinas, ya que muchos autores sostienen que la actividad antioxidante de algunos extractos es debida, al menos en parte, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, como los flavonoides, los cuales ejercen su acción al donar protones (capacidad secuestrante de radicales libre), o bien por interacción, adición o combinación de radicales o por reacciones redox (transferencia de electrones) (Martínez-Flóres *et al.*, 2002; Pyo *et al.*, 2004). En cualquier caso es importante la estructura planar y espacial del compuesto antioxidantes presente en el extracto (Murillo *et al.*, 2007).

Cuadro 7.3. Capacidad reductora de Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup> mediante el ensayo FRAP en extractos metanolicos en hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., en cuatro tratamientos seleccionados.

<b>Estrés</b>	<b>HMA</b>	<b>FRAP</b> ( $\mu\text{mol de Fe}^{2+}/\text{L}$ )
<b>Testigo (Sin estrés)</b>	Si	783.5 $\pm$ 24.75 <b>d</b>
	No	987.2 $\pm$ 34.70 <b>b</b>
<b>7.5 mM KHCO<sub>3</sub></b>	Si	900.8 $\pm$ 34.70 <b>c</b>
	No	1073.6 $\pm$ 60.82 <b>a</b>

Valores seguidos por la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

De acuerdo con el tamizaje fitoquímico, se observó mayor presencia de metabolitos de interés biológico en las plantas no micorrizadas a las que se aplicó 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , en el caso particular de compuestos de tipo alcaloides y flavonoides (Cuadro 7.4). De manera general las plantas testigo con y sin micorriza fueron los tratamientos que expresaron menor contenido de metabolitos detectados (Cuadro 7.4). De particular interés resultó la presencia de coumarinas en todos los extractos, al revelar la cromatoplaaca con luz UV de longitud de onda larga, y cuya mayor intensidad fue observada en las plantas no micorrizadas con aplicación de 7.5 mM  $\text{KHCO}_3$  (Cuadro 7.4).

Los flavonoides son productos del metabolismo secundario que poseen la capacidad de modular la actividad de algunas enzimas y de modificar el comportamiento de varios sistemas celulares, sugiriendo que pudieran ejercer de manera significativa una multitud de actividades biológicas, y en particular, propiedades antioxidantes, vasculoprotectoras, antiinflamatorias, e incluso antitumorales (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Ghedira, 2005). Posiblemente al estimular la síntesis de flavonoides en plantas de vinca con la aplicación de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , se requerirá menor cantidad de material para la extracción de mayor cantidad de dichos compuestos.

Por otro lado las coumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales. Su interés farmacológico no es muy significativo, sin embargo, estos compuestos son utilizados para tratar algunas alteraciones de la piel como por ejemplo, la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes (Carretero, 2000; García *et al.*, 2003). Lo anterior permite inferir que es posible estimular la producción de estos compuestos en las plantas de *C. roseus*, con la finalidad de utilizarlos en el abatimiento de otro tipo de enfermedades.

Cuadro 7.4. Metabolitos secundarios en extractos metanolicos en hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Estrés	HMA	Flavonoides	Esteroles	Coumarinas	Alcaloides	Terpenos
Testigo (Sin estrés)	Si	+	+	+	+	++
	No	+	+	+	+	++
7.5 mM KHCO <sub>3</sub>	Si	++	+	++	++	++
	No	+++	++	+++	+++	++

En el tamizaje fitoquímico para valorar los contenidos, se utilizó el sistema de cruces (Pizzani *et al.*, 2008) como sigue: la presencia cuantiosa se denotó con (+++); notable (++) , leve (+) y ausencia (-).

El análisis por resonancia magnética nuclear de protón se llevó a cabo mediante la comparación de los espectros de protón de cada uno de los estándares vinblastina y vincristina (2 mg/0.7mL MeOH-D<sub>4</sub>) respectivamente, con los extractos metanólicos de los tratamientos correspondientes. Los espectros de los estándares obtenidos muestran que en ambos casos (vinblastina y vincristina) la zona comprendida entre 5 y 6 ppm es una zona de fácil asignación, en ella se pueden apreciar dos juegos de señales, un doble de dobles en 5.8 ppm y una señal doble que integran para un 1H cada una y que fueron asignados a los protones vinílicos (Figura 7.13). Para el caso de vinblastina la señal doble se encuentra en 5.6 ppm y para la vincristina ligeramente desplazada a campo bajo 5.65 ppm (Figura 7.14).

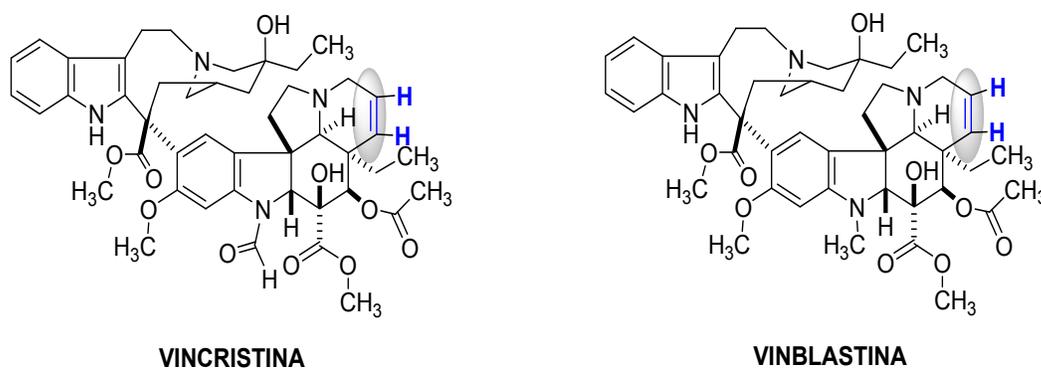
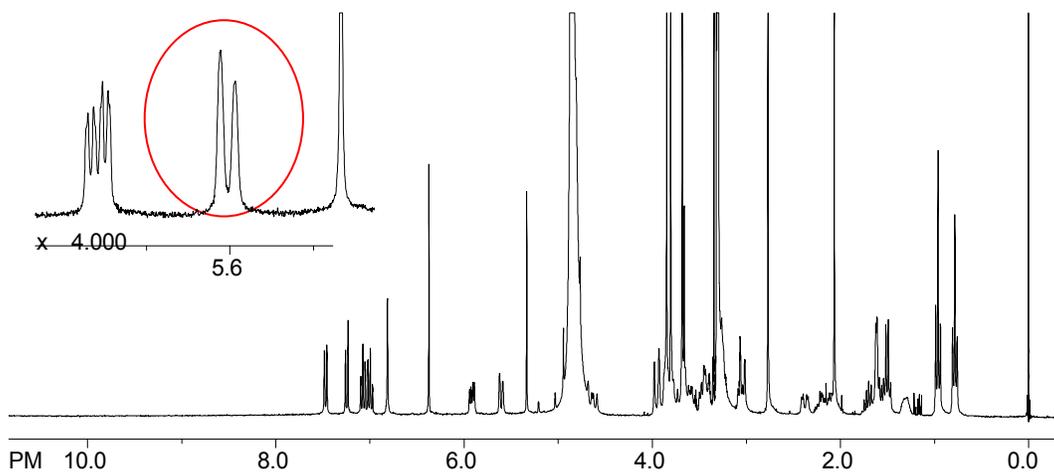


Figura 7.13. Protones utilizados en RMN <sup>1</sup>H para la comparación entre los estándares y los tratamientos empleados.

### Vinblastina



### Vincristina

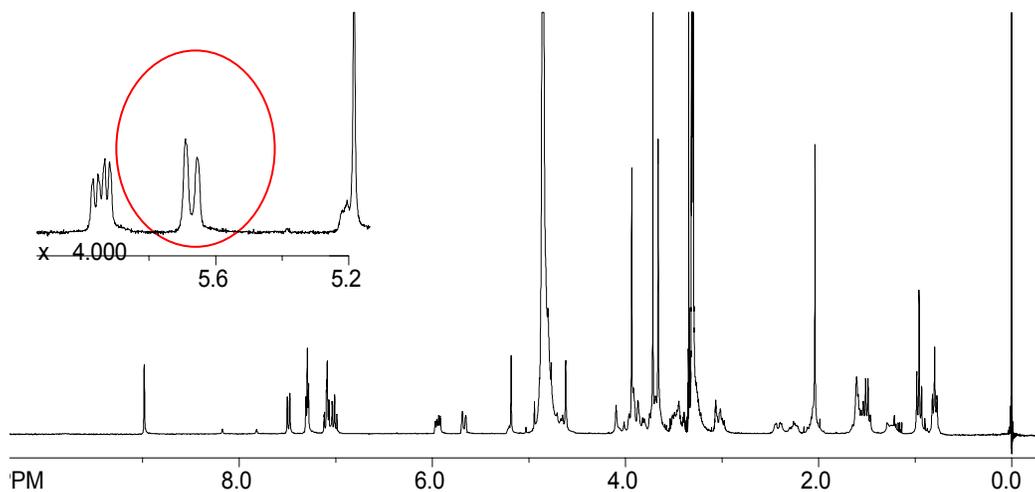


Figura 7.14. Espectros de RMN de los estándares vinblastina y vincristina. En las ampliaciones se pueden apreciar las señales correspondientes a los protones vinílicos (circulo).

A pesar de que en ambos estándares fue posible observar cada conjunto de señales, cuando las muestras correspondientes a los tratamientos fueron analizadas, la cercanía del conjunto de señales complicó la integración para cada compuesto, por lo que en el mejor de los casos solo se pudo obtener la integral total de ambos alcaloides. Además, debido a que la sensibilidad del método fue muy baja y la cantidad de alcaloide presente en las muestras fue muy poca, las señales observadas pueden estar enmascaradas con el ruido, y los valores obtenidos en la integración se encuentran dentro del límite de detección del equipo, por lo que no son confiables.

## CONCLUSIONES

- La inoculación del consorcio de HMA en plantas sin aplicación de factor estrés abiótico, incrementó en un 100% la síntesis de vinblastina y vincristina en plantas de *Catharanthus roseus*.
- La aplicación de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  incrementó en un 111% la concentración de vinblastina y vincristina en plantas de *Catharanthus roseus*.
- La aplicación de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$  incrementó significativamente el contenido de antioxidantes y compuestos fenólicos en plantas de *Catharanthus roseus*.
- La aplicación de 40 mM de NaCl no produjo efectos significativos en la síntesis de los alcaloides vincristina y vinblastina.
- La aplicación combinada de  $\text{KHCO}_3$  y NaCl inhibió el porcentaje de colonización y como consecuencia el efecto de la micorriza arbuscular en la síntesis de los alcaloides en hojas de *Catharanthus roseus*.
- Se detectó un alto poder antioxidante en plantas no micorrizadas a las cuales se les aplicó de 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , esto posiblemente a la abundancia de los flavonoides y coumarinas.

## CAPÍTULO VIII

### CONCLUSIONES GENERALES

- A partir de las 13 plantas medicinales recolectadas en Áreas Naturales de Bosques Mixtos, se lograron identificar cuatro géneros predominante de hongos micorrízicos arbusculares, *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora*.
- De los trece consorcios aislados se obtuvieron ocho consorcios altamente infectivos (*Adiantum capillus-veneris* L., *Castilleja tenuiflora* Benth., *Erigeron karvinskianus* DC., *Pimpinella anisum* L., *Plantago major* L., *Ricinus communis* L., *Rubus fruticosus* L. y *Rumex mexicanus* Meisn.).
- El consorcio proveniente de la planta medicinal *Rumex mexicanus* destacó del resto de los consorcios, al incrementar significativamente el crecimiento de *C. roseus*, además de presentar porcentajes de colonización del 55%.
- La inoculación con HMA sin la aplicación del factor estrés abiótico produjo efectos significativos en el crecimiento, en la actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y en los contenidos de los alcaloides vinblastina y vincristina en *C. roseus*.
- Las plantas de *C. roseus* expuestas a riegos de 7.5 Mm de  $\text{KHCO}_3$  presentaron mayor actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y contenido de vinblastina y vincristina.

- La aplicación de  $\text{KHCO}_3$  y  $\text{NaCl}$  disminuyeron los porcentajes de colonización micorrízica hasta en un 50%.
- Se observó mayor presencia de metabolitos de interés biológico en las plantas no micorrizadas a las que se aplicó 7.5 mM de  $\text{KHCO}_3$ , en el caso particular de compuestos de tipo alcaloides y flavonoides.
- Los datos obtenidos mediante la RMN  $^1\text{H}$  sugieren que el tratamiento testigo sin micorriza produce mayor cantidad de los alcaloides.

## LITERATURA CITADA

- Abu-Zeyad, R., A. G. Khan y C. Khoo. 1999. Occurrence of arbuscular mycorrhiza in *Castanospermum australe* A. Cunn. & C. Fraser and effects on growth and production of castanospermine. *Mycorrhiza*. 9 :111–117.
- Acosta, De la Luz. L. y C. Rodríguez-Ferrada. 2002. Instructivo técnico para el cultivo de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Vicaria. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 7:96-99.
- Akhtar, M. S. y Z. A. Siddiqui. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungie as potential bioprotectants against plant pathogens. pp 61-97. *In: Siddiqui, Z. A., M. S. Akhtar y K. Futai* (eds). *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Science y Business Media B. V.
- Alarcón, A. 2007. Micorriza arbuscular. *In: Ferrera-Cerrato R., Alarcón A.* (eds.). *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Trillas. México. pp 90-119.
- Alarcón, A. y R. Ferrera Cerrato. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana* 17: 179-191.
- Alarcón, A., J. J. Almaraz S., R. Ferrera-Cerrato, M. C. A. González-Chávez, M. E. Lara-H., M. J. Manjaraz M., R. Quintero L. y S. Santamaría R. 2004. Manual: Tecnología de hongos micorrízicos en la producción de especies forestales en vivero. R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón y M. E. Lara H. (eds). Colegio de Postgraduados, Montecillo. SEMARNAT-PRONARE. México. 98p.
- Álvarez, J. M. 2007. Tanino. La revolución enológica mito o realidad. *Revista Enología*. 2: 1-15.
- Anderson, R. C., 2008. Growth and Arbuscular Mycorrhizal Fungal Colonization of Two Prairie Grasses Grown in Soil from Restorations of Three Ages. *Restoration Ecology*. 16:650–656.
- Anjum, M. A. 2008. Effect of NaCl concentrations in irrigation water on growth and polyamine metabolism in two citrus rootstocks with different levels of salinity tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*. 30: 43-52.

- Arroyo, J., P. Bonilla, E. Ráez, S. Suárez, R. Palomino, S. Terán, A. Villareal, M. Marin, J. Chenguavén y H. Justil. 2007. Compuestos fenólicos de la fracción metanólica de *Bidens pilosa*, sobre la neoplasia gástrica, inducida en ratas. *Anales de la Facultad de Medicina Lima*. 68: 105-112.
- Asaeda, T., J. Manatunge, T. Fujino y D. Sovira. 2003. Effects of salinity and cutting on the development of *Phragmites australis*. *Wetlands Ecology and Management*. 11: 127–140.
- Azcón-Aguilar, C., J. Pozo M., N. Ferrol y J. M. Barea. 2004. Papel de las micorrizas arbusculares en la protección de la planta frente a patógenos del suelo: posibles mecanismos implicados. *In: Frías-Hernández, J.T., Olalde-Portugal V. y Ferrera-Cerrato R. (eds). Avance en el conocimiento de la biología de las micorrizas, Universidad de Guanajuato, pp 50-65.*
- Bâ, A. M., C. Plenchette, P. Danthu, R. Duponnois y T. Guissou. 2000. Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit trees in Senegal. *Agroforestry Systems*. 50: 95–105.
- Baar, J. 2008. From production to application of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural systems: Requirements and needs. pp 361-373. *In: A. Varma (ed.). Mycorrhiza, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Bago, B. C. Azcón-Aguilar, Y. Shachar-Hill y P. E. Pfeffer. 2000. El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. *In: Alarcón A. y Ferrera-Cerrato R (eds.). Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular, Mundi Prensa, México. pp 78-92.*
- Balestrini, R. y L. Lanfranco. 2006. Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 16: 509-524.
- Barkla, B. J., R. Vera-Estrella, E. Balderas y O. Pantoja. 2007. Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. *Biotecnología*. 14: 263-272.
- Benzie, I. F. F. y J. J. Strain. 1996. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
- Blanco, F. A. y E. A. Salas. 1997. Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 21: 55-67.

- Brundrett, M. C. y L. K. Abbott. 2002. Arbuscular mycorrhizas in plant communities. pp. 151-193. *In*: K. Sivasithamparam, K. W. Dixon y R. L. Barrett (eds). Microorganisms in plant conservation and biodiversity. © Kluwer Academic Publishers.
- Bucher, M. 2006. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173: 11-26.
- Cantrell, I. C. y R. G. Linderman. 2001. Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil* 233: 269–281.
- Carlsen, S. C. K., A. Understrup, I. S. Fomsgaard, A. G. Mortensen y S. Ravnskov. 2008. Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and a pathogenic fungus. *Plant Soil*. 302:33–43.
- Carreón, Y., L. Ballesteros, R. Salgado y A. Alarcón. 2000. Inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de zarzamora (*Rubus* sp) micropropagadas. *In*: Alarcón A. y Ferrera-Cerrato R (eds.). Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular. Mundi Prensa, México. pp 141-148.
- Carretero, A. M. E. 2000. Compuestos fenólicos: Sikimatos (II). *Panorama Actual del Medicamento*. 24:432-435.
- Carretero, A. M. E. 2001. Alcaloides: Aspectos generales (I). *Panorama del Medicamento* 25:222-227.
- Cartmill, A. D., L. A. Valdez-Aguilar, D. L. Bryan y A. Alarcón. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance tolerance of vinca to high alkalinity in irrigation water. *Scientia Horticulturae* 115: 275–284.
- Castellano, M. A. y R. Molina. 1989. Mycorrhizae. *In*: Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. McDonald y J. P. Barnett. *The Container Tree Nursey Manual*, Volume 5. *Agric. Handbk.* 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 101-167.
- Cavallazzi, J. R. P., O. K. Filho, S. L. Sturmer, P. T. Rygielwicz y M. M. de Mendonça. 2008. Screening and selecting arbuscular mycorrhizal fungi for inoculating micropropagated apple rootstocks in acid soils. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 90:117–129.

- Charitha, D. M. y M. N. Reddy. 2002. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and *Rhizobium*. *Plant Growth Regulation*. 37: 151–156.
- Chen, S. H. y J. Hong. 2006. Novel tubulin-interacting agents: a tale of *Taxus brevifolia* and *Catharanthus roseus*-based drug discovery. *Drugs of the Future*. 31: 123-150.
- Chu, E. Y. 1999. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on *Euterpe oleracea* Mart. seedlings. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasil. 34:1019-1024.
- Código Florentino. El gobierno de la republica edita en facsímil el manuscrito 218-20 de la colección palatina de la biblioteca Medicea Laurenciana para mayor conocimiento de la historia del pueblo de México.
- Cordeiro, M. A .S., M. A.C. Carneiro, H. B. Paulino, y O. J. S. Junior. 2005. Colonização e densidade de esporos de fungos micorrízicos em dois solos do cerrado. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 35: 147-153.
- Cortez-Gallardo, V., J. P. Macedo-Ceja, M. Hernández-Arroyo, G. Arteaga-Aureoles, D. Espinosa-Galván y J. F. Rodríguez-Landa. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 15: 123-136.
- Cseke, L. J., A. Kirakosyan, P. B. Kaufman, S. L. Warber, J. A. Duke, H. L. Brielmann. 2006. *Natural Products from Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Cuenca, G., A. Cáceres, Z. Hasmy y C. Urdaneta. 2007. Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*. 32: 23-29.
- Cuenca, G., Z. De Andrade, M. Lovera, L. Fajardo, E. Meneses, M. Márques y R. Machuca. 2003. Pre-selección de plantas nativas y producción de inóculos de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) de relevancia en la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela. *Ecotropicos* 16:27-40.
- Da Silva, G. A., E. Lumini, L. C. Maia, P. Bofante, y V. Bianciotto. 2006. Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16: 183-189.
- De la Cruz, M. 1964. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, Instituto Mexicano del Seguro Social. México.

- De la Cruz, M. 1996. *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social. México.
- Dickson, S. 2004. The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* 163: 187-200.
- Domínguez, X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa, México.
- Douds, D. D. y N. C. Schenck. 1990. Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytologist*. 116: 621-627.
- Elsen, A., H. Baimery, R. Swennen y D. De Wale. 2003. Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa* spp.) differing in nematode susceptibility. *Plant and Soil*. 256: 303–313.
- Eon, A. H., S. S. Lee, T. K. Ahn y M. W. Lee. 1994. Ecological roles of arbuscular mycorrhizal fungi in two wild legume plants. *Mycoscience*. 35: 69-75.
- Escalona, A. M., A. D. Trejo R. J. Díaz, C. L. Lara y F. A. Rivera. 2000. Efecto de la endomicorriza arbuscular y diferentes fechas de fertilización sobre el crecimiento de papaya en campo. *In: Alarcón A. y Ferrera-Cerrato R (eds.). Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular*. Mundi Prensa, México. pp 194-205.
- Estrada, L. E. 1990. Códice Florentino: su información etnobotánica. pp. 197-209. *In: Estrada L. E. Plantas Medicinales de México*. 2<sup>da</sup> ed. Departamento de Fitotecnia. Unidad de estudios etnobotánicos. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Estrada, L. E. 2002a. Cultivo de plantas medicinales, una urgencia Latinoamericana. pp. 437-440, *In: Lecturas para el diplomado internacional plantas medicinales de México*. 2<sup>da</sup> reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Estrada, L. E. I. J. 2002b. Fuentes Históricas del siglo XVI: su información etnobotánica. pp. 41-55, *In: Lecturas para el diplomado internacional plantas medicinales de México*. 2<sup>da</sup> reimpresión. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Fagbola, O., O. Osonubi, K. Mulongoy y S. A. Odunfa. 2001. Effects of drought stress and arbuscular mycorrhiza on the growth of *Gliricidia sepium* (Jacq). Walp, and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in simulated eroded soil conditions. *Mycorrhiza*. 11: 215-223.

- Ferrera-cerrato, R. CH. M. C. González, y M. M. N. Rodríguez 1993. Manual de Agromicrobiología. Trillas México.
- Frank, B. 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A. B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15: 267-275.
- Gao, J y Z.-H. Peng. 2006. Response of *Populus x canescens* (*Populus tremula x alba*) to high concentration of NaCl stress. *Journal of Forestry Research*. 17: 269-272.
- García, A. A. N., N. M González L., C. Márquez y M. Martínez V. 2003. Cumarinas presentes en especies del género casimiroa. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 47:151-154.
- Gardezi, A. K., V. M. Cetina A., D. Talavera M., R. Ferrera-Cerrato, F. Rodríguez N. y M. Larqué S. 2000. Efecto de inoculación con endomicorriza arbuscular y dosis crecientes de fertilización fosfatada en el crecimiento de Chapulixtle (*Dodonaea viscosa*). *Terra* 18: 153-159.
- Gerdemann, J. W. y Nicolson T. H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*. 46: 235-244.
- Ghedira, K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 4: 162-169.
- Giasson, P., A. Karam y A. Jaouich. 2008. Arbuscular mycorrhizae and alleviation of soil stresses on plant growth. pp 99-134. *In*: Siddiqui, Z. A., M. S. Akhtar y K. Futai (eds). *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Science Business Media B.V.
- Gimeno, C. E. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito Farmacéutico Nutrición*. 23: 80-84.
- Giri, B., R. Kapoor y K. G. Mukerji. 2005. Effect of the arbuscular mycorrhizae *Glomus fasciculatum* and *G. macrocarpum* on the growth and nutrient content of *Cassia siamea* in a semi-arid Indian wasteland soil. *New Forests*. 29: 63-73.
- Giri, B., R. Kapoor y K. G. Mukerji. 2007. Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *glomus fasciculatum* may be partly related to elevated k/na ratios in root and shoot tissues. *Microbial Ecology*. 54: 753-760.

- Godoy, R., R. Carrillo, H. Peredo. 1993. Compatibilidad y eficiencia *in Vitro* de *Glomus intraradices* en coníferas nativas del sur de Chile. *Bosque* 14: 57-63.
- González-Chávez, M. C. A. 1993, La endomicorriza vesículo-arbuscular. pp. 53-91. *In*: Ferrera-Cerrato (eds). Manual de agromicrobiología. Trillas. México.
- González-Chávez, M. del C. 2004. tolerancia a arsénico en hongos micorrízicos y sus implicaciones ecológicas. pp 96-105 *In*: Frías-Hernández, J.T., Olalde-Portugal V. y Ferrera-Cerrato R. (eds). Avance en el conocimiento de la biología de las micorrizas, Universidad de Guanajuato.
- González-Chávez, M. del C., R. Ferrera-Cerrato y J. Pérez-Moreno. 1998. Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura. Universidad Autónoma de Tlaxcala y Colegio de Posgraduados.
- Gordon, M. C. y D. J. Newman. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 72-79.
- Greipsson, S. y H. El-Mayas. 2002. Synergistic effect of soil pathogenic fungi and nematodes reducing bioprotection of arbuscular mycorrhizal fungi on the grass *Leymus arenarius*. *BioControl*. 47: 715–727.
- Guadarrama, Ch.P., I. Sánchez-Gallén, J. Álvarez Sánchez y J. R. Zapata. 2004. Hongos y plantas, beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. *Ciencias* 73: 38-45.
- Guerra, S. B. E. 2008. Micorriza arbuscular. recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología en Marcha*. 21:191-201.
- Gupta, M. L., A. Prasad, M. Ram y S. Kumar. 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology*. 81: 77-79.
- Hanen, F., R. Ksouri, W. Megdiche, N. Trabelsi, M. Boulaaba y C. Abdelly. 2 Effect of salinity on growth, leaf-phenolic content and antioxidant scavenging activity in *Cynara cardunculus* L. 2008. pp 335-343. *In*: C. Abdelly, M. Öztürk, M. Ashraf y C. Grignon (eds.). Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance. Birkhäuser Verlag/Switzerland.

- Harrison, M. J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual. Review of Microbiology.* 59:19-42.
- Hatimi, A. 1999. Effect of salinity on the association between root symbionts and *Acacia cyanophylla* Lind.: growth and nutrition. *Plant and Soil.* 216: 93–101.
- Herrera-Medina, M.J., S. Steinkellner, H. Vierheilig, J. A. Ocampo-Bote y J.M. García-Garrido. 2007. Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* 175: 554-564.
- Hewitt, E. J. 1966. The composition of the nutrient solution. pp 187-246. *In:* Hewitt E. J. (ed). *In Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition.* Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham. United Kingdom. pp 187-246.
- Hodge, A. 2000. Microbial ecology of the arbuscular mycorrhiza. *Microbiology Ecology.* 32: 91-96.
- Hounsome, N., B. Hounsome, D. Tomos, y G. Edwards-Jones. 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science* 73: 48-65.
- Juszczuk, I. M., A. Wiktorowska, E. Malusá y A. M. Rychter. 2004. Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil.* 267: 41–49.
- Kahiluoto, H., E. Ketoja y M. Vestberg. 2000. Promotion of utilization of arbuscular mycorrhiza through reduced P fertilization 1. Bioassays in a growth chamber. *Plant and Soil.* 227: 191-206.
- Kapoor, R., B. Giri Y K. G. Mukerji. 2002. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculant to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 18: 459–463.
- Kapoor, R., B. Giri, K. G. Mukerji. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. *Bioresource Technology* 93: 307–311.
- Kapoor, R., V. Chaudhary y A. K. Bhatnagar. 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. *Mycorrhiza.* 17: 581-587.

- Khalil, G. A., R. Ferrera-Cerrato, J. L. Aguilar-Acuña, M. Larque-Saavedra. 1999. Crecimiento de *Sesbania emerus* (Aubl) Urban inoculada con *Glomus* sp. en presencia de vermicomposta. *TERRA Latinoamerica* 17: 109-114.
- Khan, M. H., K. L. B. Singha y S. K. Panda. 2002. Changes in antioxidant levels in *Oryza sativa* L. roots subjected to NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 24:145-148.
- Khaosaad, T., H. Vierheilig, M. Nell, K. Zitterl-Eglsser y J. Novak. 2006. Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza* 16:443-446.
- Kim, H. K., Y.H. Choi y R. Verpoorte. 2006. Metabolomic Analysis of *Catharanthus roseus* Using NMR and Principal Component Analysis. pp 261-276. *In*: Saito K., R.A.Dixon, y L. Willmitzer (eds). *Plant Metabolomics. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kosuta, S., T. Winzer y M. Parniske. 2005. Arbuscular micorriza. pp. 87-95. *In*: A. J. Márquez (ed). *Lotus japonicus Handbook*. Springer. Netherlands.
- Kruczynski, A y B. T. Hill. 2001. Vinflunine, the latest *Vinca* alkaloid in clinical development a review of its preclinical anticancer properties. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 40:159-173.
- Kuklinski, C. 2003. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, 1<sup>ra</sup> ed. Omega. España.
- Kula, A. A. R., D. C. Hartnett y W. T. W. Gail. 2005. Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant-herbivore interactions. *Ecology Letters* 8: 61-69.
- Larsen, J., P. Cornejo y J. M. Barea. 2009. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. *Soil Biology and Biochemistry*. 41: 286–292.
- Lata, B. 2007. Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. *Phytochemistry Reviews* 6:403–41
- Leadir, L. M. Fries, S. Raymond y S. Pacovsky. 1997. Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *Journal of Chemical Ecology*. 23: 1755-1767.

- Levêque, D. y F. Jehl. 2007. Molecular pharmacokinetics of *Catharanthus* (Vinca) alkaloids. *Journal of Clinical Pharmacology*. 47:579-588.
- Levêque, D., J. Wihlm y F. Jehl. 1996. Pharmacologie des *Catharanthus roseus* alcaloïdes. *Bulletin du Cancer*. 83:176-186.
- Li, H., F. A. Smith, S. Dickson, R. E. Holloway y S. E. Smith. 2008. Plant growth depressions in arbuscular mycorrhizal symbioses: not just caused by carbon drain?. *New Phytologist*. 178: 852–862.
- Maia, L. C., A. M. Yano-Melo. 2001. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:281-285.
- Makris, D. P., G. Boskou, N. k. Andrikopoulos y P. Kefalas. 2008. Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. Roditis) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*. 226: 1075-1079.
- Malenčić D. J., D. Vasić, M. Popović and D. Dević. 2004. Antioxidant systems in sunflower as affected by oxalic acid. *Biologia Plantarum* 48: 243-247.
- Manjarez-Martínez, M. J., R. Ferrera-Cerrato, M. C. González-Chávez. 1999. Efecto de la vermicomposta y la micorriza arbuscular en el desarrollo y tasa fotosintética del chile serrano. *Terra Latinoamericana* 17: 9-15.
- Martínez, P.I. 2000. Las plantas medicinales. *Revista Cubana de Oncología*.16:66.
- Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, J. M. Culebras y M.<sup>a</sup> J. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. 6:271-278.
- Matthäus, M. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:3444-3452.
- Milleret, R., R.C. Le Bayon y J. M. Gobat. 2009. Root, mycorrhiza and earthworm interactions: their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. *Plant Soil*. 316:1–12.
- Monzón, A. y R. Azcón. 2001. Growth responses and N and P use efficiency of three *Alnus* species as affected by arbuscular-mycorrhizal colonization. *Plant Growth Regulation*. 35: 97-104

- Morone-Fortunato, I. y P. Avato. 2008. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 93:139-149.
- Muñoz, F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Cuarta reimpresión. Mundi-prensa. España.
- Murillo, E., O. Lombo, M. Tique y J. J. Méndez. 2007. Potencial antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (Fabaceae). *Información Tecnológica*. 18:65-74.
- Nagahashi, G. y D. D. Douds. 2005. Environmental factors that affect presymbiotic hyphal growth and branching of arbuscular mycorrhizal fungi. pp 95-110. *In: S. Declerck, D.-G. Strullu, y A. Fortin (eds). Soil Biology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Nagaraja, P., R.A. Vasantha y H. S. Yathirajan. 2002. Métodos sensitivos para la determinación espectrofotométrica de los compuestos antineoplásicos. *ARS Pharmaceutica*. 43:121-133.
- Nair, M. G., G. R. Safir y J. O. Siqueira. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) Roots *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 434-439.
- Neffati, M. y B. Marzouk. 2008. Changes in essential oil and fatty acid composition in coriander (*Coriandrum sativum* L.) leaves under saline conditions. *Industrial Crops and Products*. 28: 137–142.
- Neumann K. H., J. Imani y A. Kumar. 2009. Principles and Practice, Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology. Principles and Practice, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Nikolaeva, I. G., L. D. Dymshcheva, S. M. Nikolaev y G. G. Nikolaeva. 2007. Medicinal plants, antioxidant activity and flavonoid composition of the new nootropic preparation polyoophyt. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 41:532-535.
- Ojeda, H. 2007. Los compuestos fenólicos de la uva. *Enología*. 4:1-11.
- Öpik, M., U. Saks, J. Kenned y T. Daniell. 2008. Global diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi–community composition and links with functionality. pp 89-111. *In: A. Varma (ed.) Mycorrhiza, Berlin Heidelberg.*
- Pahlow, M. 1994. El gran libro de las plantas medicinales. Salud a través de las fuerzas curativas de las plantas. 7<sup>ma</sup> ed. Everest. España.

- Pang, C.-H. y B.-S. Wang. 2008. Oxidative stress and salt tolerance in plants. pp 232-241. *In: U. Lüttge et al. (eds.). Progress in Botany 69. Berlin Heidelberg.*
- Panwar, J. y J. C. Tarafdar. 2006. Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environments*.65: 337–350.
- Panwar, J., R. S. Yadav, B. K. Yadav y J. C. Tarafdar. 2008. Arbuscular mycorrhizae: a dynamic microsymbiont for sustainable agriculture. pp 159-176. *In: Siddiqui, Z. A., M. S. Akhtar y K. Futai (eds). Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry. Springer Science y Business Media B. V.*
- Paszkowski, U. 2006. Mutualism and parasitism: the yin and yang of plant symbioses. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 364-370.
- Phillips, J. M., D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 158-161.
- Pizzani, P., M. Blanco, T. Malaver, S. Godoy, I. Matute, J. Palma y N. E. Obispo. 2008. Composición fitoquímica y nutricional de harina de pijiguao (*Bactris gassipaes* Kunth en H.B.K). *Zootecnia Tropical*., 26: 235-238.
- Pozo, M. J. y Azcón-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 393-398.
- Pyo, Y. H., T. Ch. Lee, L. Logendra, R. T. Rose. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*) extracts. *Food Chemistry*. 85: 19–26
- Ratera, L.E. y M. O. Ratera. 1980. Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular, 1<sup>ra</sup> ed. Hemisferio Popular, Argentina.
- Redecker, D. 2002. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 244: 67-73.
- Reinhardt, D. 2007. Programming good relations-development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 10:98-105.
- Requena, N., E. Serrano, A. Ocón y M. Breuninger. 2007. Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry*. 68:33-40.

- Rizk, A. F. M. 1987. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 94: 293-326.
- Robertson, S. J., W. B. McGill, H. B. Massicote y P. M. Rutherford. 2007. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews* 82: 213–240.
- Rodríguez, Y. Y., B. Dela Noval P., F. Fernández M. y P. Rodríguez H. 2004. Estudio comparativo del comportamiento de seis cepas de hongos micorrízicos arbusculares en su interacción con el tomate (*Lycopersicon esculentum* M. var “Amalia”). *Ecología Aplicada*. 3:162-171.
- Rosendahl, S. 2007. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 178: 253-266.
- Ruíz, L. J. M., y R. Azcón. 2000. Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza*. 10: 137-143.
- Ryabushkina, N. A. 2005. Synergism of metabolite action in plant responses to stresses. *Russian Journal of Plant Physiology*. 52: 614-621.
- Sailo, G. y D. J. Bagyaraj. 2005. Influence of different AM-fungi on the growth, nutrition and forskolin content of *Coleus forskohlii*. *Mycological Research*. 109: 795–798.
- Sairam, R. K., G. C. Srivastava, S. Agarwal y R. C. Meena. 2005. Differences in antioxidante activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biología Plantarum*. 9:85-91.
- Salas, E. y F. Blanco. 2000. Selección de plantas hospederas y efectos del fósforo para la producción de inóculo de hongos formadores de micorrizas arbusculares por el método de cultivo en macetas. *Agronomía Costarricense*. 24: 19-28.
- Sánchez, C. Ma. de J. 2005. Micorrizas. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- SAS Institute Inc. 2002. The SAS system for windows, ver. 9.0. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina. USA.
- Schenck, N. C. y I. Pérez. 1990. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. Published by Synergistic Publications Gainesville. USA.

- Seddas, P., V. Gianinazzi-Pearson, B. Schoefs, H. Kuster y D. Wipf. 2009. Communication and signaling in the plant–fungus symbiosis: The Mycorrhiza. pp 45-71. *In*: P. Seddas, H. Kuster, y F. Baluška. Plant-Environment Interactions. Berlin.
- Sekhara, R.D. M. R., M. Schorderet, U. Feller y D. Reinhardt. 2007. A petunia mutant affected in intracellular accommodation and morphogenesis of arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Journal* 51: 739-750.
- Sharma, D., R. Kapoor y Bhatnagar. 2008. Arbuscular mycorrhizal (AM) technology for the conservation of *Curculigo orchioides* Gaertn.: an endangered medicinal herb. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 24:395–400.
- Shasany, A. K., A. K. Shukla y S. P. S. Khanuja. 2007. Medicinal and aromatic plants. pp. 175-196. *In*: C. Kole (ed.). Genome mapping and molecular breeding in plants. technical crops. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Sheng, M., M. Tang, H. Chen, B. Yang, F. Zhang y Y. Huang. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*. 18:287-296.
- Singleton, V.L. y Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology Viticulture* 16:144-147.
- Smith, B. A. y S. E. Smith. 1997. Structural diversity in (vesicular) arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*. 137:373-388.
- Soong, Y-Y.y, P. J. Barlow. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*. 88:411-417.
- Strack, D., T. Fester, B. Hause, W. Schliemann y M. H. Walter. 2003. Arbuscular mycorrhiza: Biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology*. 29: 1955-1979.
- Strasburger, E., N. Fritz, S. Heinrich y M. A. F. Wilhem. 2004. *Tratado de botánica*. 35<sup>a</sup> ed. Omega. Barcelona.
- Toljander, J. F., B. D. Lindahl, L. R. Paul, M. Elfstrand y R. D. Finlay. 2007. Influence of arbuscular mycorrhizal micelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *Federation of European Microbiological Societies Microbial Ecology* 61: 295-304.

- Toussaint J. P., A. Smith y E. Smith. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi can induce the production of phytochemicals in sweet basil irrespective of phosphorus nutrition. *Mycorrhiza*. 17: 291-297.
- Trejo, T. G. y M. M. Rodríguez. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia* 32:669-674.
- Treutter, D. 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* 4:147–157.
- Uehlein, N., K. Fileschi, M. Eckert, G. P. Bienert, A. Bertl y R. Kaldenhoff. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry*. 68: 122-129.
- Velasco, J. V., R. Ferrera-Cerrato y J. J. A. Suárez. 2001. Vermicomposta, Micorriza Arbuscular y *Azospirillum brasilense* en tomate de cáscara. *Terra*. 19: 241-248.
- Verma, A., I. Laakso, T. Seppänen-Laakso, A. Huhtikangas y M. L. Riekkola. 2007. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. *Molecules*. 12:1307-1315.
- Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Vidal, C.M.C. 2003. El desarrollo de la legislación sobre plantas medicinales en la comunidad europea y su incorporación en el ordenamiento jurídico español. Su problemática. *Derecho y Salud*. 11: 65-108.
- Villarino, V.T. 1999. Las plantas de extractos bases para un plan de desarrollo del sector, 1<sup>ra</sup> ed. Ed Mundi-prensa, Fundación Alfonso Martín Escudero. España.
- Villaseñor, R. J. L. y F. J. Espinosa García. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- Volpin, H., Y. Elkind, Y. Okon y Y. Kapulnik. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiology*. 104: 683-689.
- Woo, H. H., B. R. Jeong y M. C. Hawes. 2005. Flavonoids: from cell cycle regulation to biotechnology. *Biotechnology Letters* 27: 365–374.

Zhao, X., T. Yu, Y. Wang y Yan X. 2006. Effect of arbuscular mycorrhiza on the growth of *Camptotheca acuminata* seedlings. Journal of Forestry Research. 17: 121–123.

**Direcciones electrónicas citadas**

(<http://www.lrz-muenchen.de/~schuessler/amphylo/> 07/12/2008).

INVAM (International Culture Collection of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2008. <http://invam.caf.wvu.edu/>.

## ANEXO

Cuadro A-1. Composición de la Solución Long Ashton modificada (Capítulo V y VI)

Solución stock	Cantidad de reactivo en peso (g L <sup>-1</sup> )	Cantidad de solución stock para preparar 1 L (1000 mL)
KNO <sub>3</sub>	80.8	5.0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	73.6	5.0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	188.8	5.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	36.8	1.25 para 10.25 µg mL <sup>-1</sup> 2.50 para 20.50 µg mL <sup>-1</sup> 5.00 para 41.00 µg mL <sup>-1</sup>
Elementos traza		1.0
Solución de citratos (adicionar antes de la fertilización)		5.0

**Solución stock de elementos traza: Aforar a 1000 mL con agua destilada**

MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	1.69
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0.29
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.10
NaCl	5.90
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0.088

**Solución stock de citratos**

Citrato férrico (FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)                      4.9

Ácido cítrico(H<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)                              4.9

\*Aforar a 1000 mL con agua desionizada destilada

\*Agitar por unos minutos y autoclavear para la completa disolución

\*Almacenar en refrigeración

Hewitt, 1966

Cuadro A-2. Elaboración de reactivo FRAP.

---

<b>Preparación de los buffers:</b>	
A) Buffer de acetato:	Se prepara mediante disolución de 3.1 g de acetato de sodio trihidratado y 16 mL de ácido acético por litro de solución buffer, pH = 3.6.
B) Solución de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)	La concentración de la solución será 10 mmol/L de TPTZ en ácido clorhídrico diluido (40 mM).
C) Solución de Cloruro férrico	La solución se prepara a partir de cloruro férrico hexahidratado en una concentración de 20 mM.

---

<b>Reactivo FRAP:</b>	
	Para preparar el reactivo FRAP se requiere mezclar 25 mL de buffer de acetato (A), 2.5 ml de solución TPTZ (B) y 2.5 mL de solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (C) y se incuba a 37 °C durante 10 minutos.

---

Adaptado de Benzie & Strain (1996)