

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

## **EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA ANTINEOPLÁSICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES: ESTIMULACIÓN CON FERTILIZACIÓN Y BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL**

**NOMBRE DEL SUSTENTANTE  
CLAUDIA JANETTE DE LA ROSA MERA**

**T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2017**

La presente tesis titulada: **Efectividad biológica antineoplásica de extractos de plantas medicinales: Estimulación con fertilización y bacterias promotoras del crecimiento vegetal**, 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:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR

DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR

DR. ANGEL RAMOS LIGONIO

ASESOR

DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR

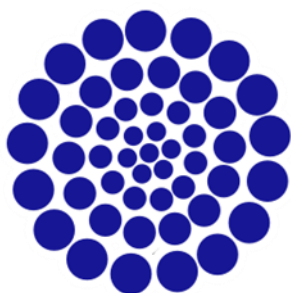
DR. OSCAR GARCÍA BARRADAS

ASESORA

DRA. MA. REMEDIOS MENDOZA LÓPEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, enero de 2017.

La presente tesis “**Efectividad biológica antineoplásica de extractos de plantas medicinales: Estimulación con fertilización y bacterias promotoras del crecimiento vegetal**” fue financiada mediante el proyecto SEP-CONACYT, número 130262.



**CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*

**EFFECTIVIDAD BIOLÓGICA ANTINEOPLÁSICA DE EXTRACTOS DE  
PLANTAS MEDICINALES: ESTIMULACIÓN CON FERTILIZACIÓN Y  
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL**

**Claudia Janette De la Rosa Mera  
Colegio de Postgraduados, 2017**

**RESUMEN**

Este estudio evaluó la efectividad biológica de extractos antineoplásicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., y *Calendula officinalis* L., sometidas a dos tipos de fertilización, y a la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV). La primera fase evaluó el efecto de la fertilización orgánica (Floramid® Master Extra, NPK 19-5-10) e inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), en el crecimiento vegetal. La elección del fertilizante nitrogenado mejora el crecimiento de las plantas; *C. roseus* respondió significativamente a la fertilización orgánica (100%), mientras que la fertilización inorgánica con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (16 Mm) favoreció a *C. officinalis*. La segunda fase valoró el efecto de cinco BPCV y su combinación, en el crecimiento de las dos plantas medicinales. Las BPCV mostraron efectos diferenciales en las plantas; destacando *Pseudomonas* sp. La tercera fase evaluó el efecto citotóxico de extractos metanólicos de las dos plantas medicinales con *Pseudomonas* sp., y fertilizadas, en tres líneas celulares (HeLa, Vero y J774A.1). El fertilizante orgánico en *C. roseus* resultó en un extracto antineoplásico con alta citotoxicidad en células cancerosas, pero sin dañar células epiteliales y macrófagos. Para *C. officinalis*, la fertilización inorgánica combinada con *Pseudomonas* sp., produjo un extracto citotóxico en células cancerosas, sin dañar células epiteliales ni macrófagos. La cuarta fase evaluó la fertilización orgánica y la inoculación bacteriana en la expresión de genes *ORCA3*, *D4H*, *STR* y *TDC* (ruta de los terpenoides indol-alcaloides) en *C. roseus*; la fertilización orgánica aumentó la expresión de los cuatro genes.

**Palabras clave:** cáncer, vinca, calendula, alcaloides, líneas celulares, *Pseudomonas*.

**ANTINEOPLASIC BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF MEDICINAL PLANT  
EXTRACTS: ESTIMULATION WITH FERTILIZATION AND PLANT GROWTH  
PROMOTING RHIZOBACTERIA**

**Claudia Janette De la Rosa Mera  
Colegio de Postgraduados, 2017**

**ABSTRACT**

This study evaluated the biological effectivity of antineoplastic extracts from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., and *Calendula officinalis* L., subjected to two types of fertilization and the inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). First stage evaluated the effects of organic (Floramid<sup>®</sup> Master Extra, NPK 19-5-10) or inorganic fertilization ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), on plant growth. The selection of nitrogen fertilizer improves plant growth; *C. roseus* significantly responds to organic fertilization (100%), whereas inorganic fertilization with  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (16 Mm) favored *C. officinalis*. Second stage evaluated the effect of five PGPR and their combination on the growth of both plants. The PGPR had differential effects on plants, highlighting *Pseudomonas* sp. Third stage evaluated the cytotoxic effect of methanolic extracts of both medicinal plants either inoculated with *Pseudomonas* sp. or fertilized, on three cell lines (HeLa, Vero, and J774A.1). Organic fertilizer in *C. roseus* resulted in an extract with high cytotoxicity on cancer cells, but without damages on epithelial cells nor macrophages. For *C. officinalis*, inorganic fertilization combined with *Pseudomonas* sp., resulted in a cytotoxic extract to cancer cells without affecting epithelial cells or macrophages. Four stage evaluated the effect of organic fertilization and bacterial inoculation on the expression of four genes (*ORCA3*, *D4H*, *STR* and *TDC*; terpenoid indole alkaloid pathway) in *C. roseus*; organic fertilization increased the expression of target genes.

**Key words:** cancer, vinca, calendula, alkaloids, cell lines, *Pseudomonas*.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento brindado para el desarrollo del proyecto de investigación.

A mi consejo particular: Dr. Alejandro Alarcón, Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Dr. Ángel Ramos Ligonio, Dr. Fernando Carlos Gómez Merino, Dr. Oscar García Barradas, y Dra. Ma. Remedios Mendoza López, por su ayuda y sugerencias para mejorar el proyecto de investigación y la redacción de la tesis.

## DEDICATORIA

A Fernanda Sofía Barcenás De la Rosa, por tolerar mis ausencias, esperarme con los brazos abiertos y regalarme tu sonrisa que alegra mis días. Gracias hija por permitirme ser madre e investigadora.

A Christian Iván Valencia De la Rosa, por permitirme seguir formando parte de tu vida y por ser el compañero inseparable de mi Sofí.

A mi mejor amiga Minerva Mera, por enseñarme a esforzarme para conseguir mis objetivos y por tu apoyo en criar a mi hija. Gracias Mami.

A Raúl Barcenás Aquino, quien no tolera escuchar decir de mis labios un “no puedo”. Gracias por hacerme cada día más fuerte.

A mis hermanos, los mejores que me pudieron haber tocado, los amo. Gracias por hacerme la vida tan divertida.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por además de ser un ejemplo como investigador, ser una guía espiritual en mi formación como persona. Gracias

A mi amigo, Alejandro Alarcón por confiar en mí, una vez más confirmo la gran persona e investigador que es usted. Gracias Alejandro.

A mi amiga Vivian Quiroz, le doy gracias a Dios por haberte conocido, gracias por escucharme y por todos tus consejos.

## CONTENIDO

<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xiii</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis general.....	5
Hipótesis específicas.....	5
<b>CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
3.1. Las plantas medicinales con propiedades antineoplásicas y la acción de los metabolitos secundarios.....	6
3.2. El cáncer.....	8
3.3. Clasificación del cáncer.....	11
3.4. Epidemiología del cáncer.....	13
3.5. Líneas celulares.....	14
3.6. Microorganismos y metabolitos secundarios en plantas.....	16
3.7. Discusión general de la revisión de literatura y justificación de la investigación.....	19
<b>CAPÍTULO IV. FERTILIZACIÓN NITROGENADA ORGÁNICA E INORGÁNICA EN EL CRECIMIENTO DE <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. Y <i>Calendula officinalis</i> L.</b>	
Resumen.....	21
Abstract.....	22
4.1. Introducción.....	23
4.2. Materiales y métodos.....	25
4.2.1. Fertilización inorgánica en el crecimiento de <i>Catharanthus roseus</i> y <i>Calendula             officinalis</i> .....	26



4.2.2. Fertilización orgánica en el crecimiento de <i>Catharanthus roseus</i> y <i>Calendula officinalis</i> .....	26
4.2.3. Variables evaluadas .....	27
4.2.4. Análisis estadístico .....	27
4.3. Resultados.....	27
4.3.1.Fertilización orgánica e inorgánica en el crecimiento de <i>Catharanthus roseus</i> ..	27
4.3.2.Fertilización orgánica e inorgánica en el crecimiento de <i>Calendula officinalis</i> ..	32
4.4. Discusión.....	36
4.5. Conclusiones.....	40
 <b>CAPÍTULO V. EFECTO DE LA INOCULACIÓN CON BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN EL CRECIMIENTO DE <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. Y <i>Calendula officinalis</i> L.</b>	
Resumen.....	41
Abstract .....	42
5.1. Introducción.....	43
5.2. Materiales y métodos.....	44
5.2.1. Elaboración de inóculos bacteriano.....	44
5.2.2. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. y <i>Calendula officinalis</i> L.....	46
5.2.3. Variables evaluadas.....	46
5.2.4. Análisis estadístico.....	47
5.3. Resultados.....	47
5.3.1. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	47
5.3.2. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de <i>Calendula officinalis</i> L.....	50
5.4. Discusión.....	53

5.5. Conclusiones.....	56
------------------------	----

**CAPÍTULO VI. INOCULACIÓN BACTERIANA Y FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE *Catharanthus roseus* Y DE FLORES DE *Calendula officinalis* EVALUADO EN TRES LÍNEAS CELULARES**

Resumen.....	58
Abstract .....	59
6.1. Introducción.....	60
6.2. Materiales y métodos.....	61
6.2.1. Elaboración del inóculo bacteriano.....	62
6.2.2. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. y <i>Calendula officinalis</i> L.....	62
6.2.3. Fertilización orgánica e inorgánica en el crecimiento de <i>Catharanthus roseus</i> y <i>Calendula officinalis</i> , respectivamente.....	63
6.2.4. Obtención del extracto de hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. y flores de <i>Calendula officinalis</i> L.....	63
6.2.5. Evaluación de extractos obtenidos de las hojas y flores de plantas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. y <i>Calendula officinalis</i> L., respectivamente.....	64
6.2.6. Efecto de extractos metanólicos liofilizados de hojas de <i>Catharanthus roseus</i> y flores de <i>Calendula officinalis</i> en tres líneas celulares.....	68
6.2.7. Análisis estadístico .....	70
6.3. Resultados.....	70
6.3.1. Fertilización orgánica e inoculación bacteriana en el crecimiento de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	70
6.3.2. Fertilización inorgánica e inoculación bacteriana en el crecimiento de <i>Calendula officinalis</i> L.....	75
6.3.3. Interacción extractos metanólicos liofilizados de hojas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don y flores de <i>Calendula officinalis</i> L., en tres líneas celulares.....	77
6.3.3.1 Actividad biológica de extractos metanólicos de hojas de <i>C. roseus</i> ....	79

6.3.3.2 Actividad biológica de extractos metanólicos de flores de <i>C officinalis</i> .	79
6.4. Discusión.....	82
6.5. Conclusiones.....	86
<b>CAPÍTULO VII. FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INOCULACIÓN CON <i>Pseudomonas</i> sp. EN LA FOTOSÍNTESIS Y EN LA EXPRESIÓN DE GENES CLAVES EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE INDOL ALCALOIDES TERPENOIDES, EN <i>Catharanthus roseus</i>.</b>	
Resumen.....	88
Abstract.....	89
7.1. Introducción.....	90
7.2. Materiales y métodos.....	92
7.2.1. Reactivación de crecimiento y preparación del inóculo bacteriano e inoculación de las plántulas <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	93
7.2.2. Aplicación de la fertilización orgánica en las plántulas de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don.....	93
7.2.3. Extracción de RNA de hojas y síntesis de cDNA para el análisis de expresión de genes TIA.....	94
7.2.4. Análisis qRT-PCR.....	95
7.3. Resultados.....	98
7.4. Discusión.....	104
7.5. Conclusiones.....	108
<b>CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>109</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 3.1.</b> Factores internos y externos involucrados en el origen y desarrollo del cáncer.....	13
<b>Cuadro 7.1.</b> Secuencias de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides indol terpenoides, en <i>Catharanthus roseus</i> . Así como de los genes de referencia utilizados .....	97
<b>Cuadro 7.2.</b> Rendimiento y pureza (260/280) del RNA extraído de hojas de <i>Catharanthus roseus</i> , de plantas sometidos a fertilización orgánica e inoculación por la bacteria <i>Pseudomona</i> sp. ....	103
<b>Cuadro 7.3.</b> Valores de estabilidad de expresión ( <i>M</i> ) de los genes de referencia <i>ORCA3</i> , <i>D4H</i> , <i>STR</i> y <i>TDC</i> en <i>Catharanthus roseus</i> .	103
<b>Cuadro 7.4.</b> Niveles de expresión de los genes <i>ORCA3</i> , <i>D4H</i> , <i>STR</i> y <i>TDC</i> implicados en la síntesis de alcaloides indol terpenoicos en las plantas de <i>Catharanthus roseus</i> , después de 70 días de crecimiento.....	104

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 4.1.</b>	Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) y orgánica (Floranid®) en la altura (A) y peso seco total (B) de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., a los 70 días. n=7. Medias ± error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, α= 0.05) entre tratamientos.....	29
<b>Figura 4.2.</b>	Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) y orgánica (Floranid®) en el número de hojas (A), peso seco de hojas (B), área foliar (C) y área foliar específica (D) de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., a los 70 días. n=7. Medias ± error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, α= 0.05) entre tratamientos.....	30
<b>Figura 4.3.</b>	Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) y orgánica (Floranid®) en el número de botones florales (A), número de flores (B) y peso seco de botones florales y flores de <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don., a los 70 días. n=7. Medias ± error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, α= 0.05) entre tratamientos.....	31
<b>Figura 4.4.</b>	Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) y orgánica (Floranid®) en la altura (A) y peso seco total (B) de <i>Calendula officinalis</i> L., a los 70 días. n=7. Medias ± error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, α= 0.05) entre tratamientos...	33
<b>Figura 4.5.</b>	Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) y orgánica (Floranid®) en el número de hojas (A), peso seco de hojas (B), área foliar (C) y área foliar específica (D) de <i>Calendula officinalis</i> L., a los 70 días. n=7. Medias ± error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, α= 0.05) entre tratamientos...	34
<b>Figura 4.6.</b>	Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ) y orgánica (Floranid®) en el número de botones florales (A), número de flores (B) y peso seco de botones florales y flores de <i>Calendula officinalis</i> L., a los 70 días. n=7. Medias ± error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, α= 0.05) entre tratamientos...	35

- Figura 5.1.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en la altura (A), y peso seco total en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas* sp.; A46: *Pseudomonas tolaasii* y BSP1.1: *Paenibacillus* sp.; Mixto: Combinación de todas las cepas..... 48
- Figura 5.2.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), eficiencia fotoquímica (C) y área foliar específica (D) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., a los 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas* sp.; A46: *Pseudomonas tolaasii* y BSP1.1: *Paenibacillus* sp.; Mixto: Combinación de todas las cepas..... 49
- Figura 5.3.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en la altura (A) y peso seco total en plantas de *Calendula officinalis* (L.) G. Don., después de 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas* sp.; A46: *Pseudomonas tolaasii*, y BSP1.1: *Paenibacillus* sp.; Mixto: Combinación de todas las cepas..... 51
- Figura 5.4.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), eficiencia fotoquímica (C) y área foliar específica (D) de *Calendula officinalis* L.), a los 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas* sp.; A46: *Pseudomonas tolaasii*, y BSP1.1: *Paenibacillus* sp.; Mixto: Combinación de todas las cepas..... 52
- Figura 6.1.** Línea celular Vero, con baja densidad celular (A) y alta densidad (B). Línea celular J774A.1, con baja densidad celular (C) y alta densidad (D). Línea celular HeLa, con baja densidad celular (E) y alta densidad (F). ([www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx](http://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx) 14/04/2015)..... 67

- Figura 6.2.** Extractos de plantas de *Catharanthus roseus* y *Calendula officinalis* de los diferentes tratamientos resuspendidos en 1000  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos (PBS)..... 68
- Figura 6.3.** Diseño del acomodo de los extractos metanólicos de hojas de *Catharanthus roseus* y flores de *Calendula officinalis*, en la placa de 96 pozos. Simbología. T: Testigos (Sin fertilizar e inocular); B: Inoculación con bacterias; FO: Fertilización orgánica; FOB: Fertilización orgánica + inoculación bacteriana; **FI**: Fertilización inorgánica; **FIB**: Fertilización inorgánica + inoculación bacteriana; **SE**: Sin estímulo; **SDS**: Dodecil sulfato sódico..... 71
- Figura 6.4.** Efecto de la inoculación y fertilización orgánica en el peso seco total y número de hojas en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: T= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); B= *Pseudomonas* sp cepa OLS-SF5 FO= Fertilización orgánica con Floranid Master Extra (NPK 19-5-10); FOB= Fertilización e inoculación bacteriana..... 73
- Figura 6.5.** Efecto de la inoculación y fertilización orgánica en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), área foliar específica (C), y eficiencia fotoquímica (fluorescencia) (D) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., a los 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: T= Testigo (Sin fertilizar sin inocular); B= *Pseudomonas* sp cepa OLS-SF5; FO= Fertilización orgánica con Floranid Master Extra (NPK 19-5-10); FOB= Fertilización e inoculación bacteriana..... 74
- Figura 6.6.** Efecto de la inoculación y fertilización inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el peso seco total, y el número de hojas, en plantas de *Calendula officinalis* L., después de 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología. **T**= Testigos (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= Inoculación con bacterias; **FI**= Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana..... 76
- Figura 6.7.** Efecto de la inoculación y fertilización inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), área foliar específica (C), y eficiencia fotoquímica (D) de *Calendula officinalis* L., a los 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre

las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: **T**= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= *Pseudomonas* sp cepa OLS-SF5; **FI**=Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana..... 78

**Figura 6.8.** Efecto de la inoculación y fertilización inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el número de flores (A), peso seco de flores (B), número de botones florales (C) y peso seco de botones florales (D) de *Calendula officinalis* L., a los 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: **T**= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= *Pseudomonas* sp. cepa OLS-SF5; **FI**= Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana..... 80

**Figura 6.9.** Efectividad citotóxica de extractos metanólicos obtenidos de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., extraídos después de 80 días. n=19. Medias + error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: **T**= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= *Pseudomonas* sp. cepa OLS-SF5; **FO**= Fertilización orgánica con Floranid Master Extra (NPK 19-5-10); **FOB**= Fertilización e inoculación bacteriana; **SE**= Sin estímulo..... 81

**Figura 6.10.** Efectividad citotóxica de extractos metanólicos obtenidos de plantas de *Calendula officinalis* L., extraídos después de 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología. **T**= Testigos (Sin fertilizar e inocular); **B**= *Pseudomonas* sp. cepa OLS-SF5; **FI**= Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana; **SE**= Sin estímulo..... 82

**Figura 7.1.** Ruta de biosíntesis de los alcaloides indolterpenoides de *Catharanthus roseus*. Los genes con cuadro se piensan que están regulados por el factor de transcripción ORCA3 (van der Fits y Memelink, 2000). Simbología: TDC= triptófano decarboxilasa; STR: estripectosidina sintasa; D4H= Deacetoxivindolina 4-hidroxisilasa..... 96



<b>Figura 7.2.</b>	Efecto de <i>Pseudomonas</i> sp (OLS-SF5-), y aplicación de fertilizante (Floranid Master Extra) en la altura (A) y número de hojas (B) de plantas de <i>Catharanthus roseus</i> , después de 70 días. n= 18. Medias $\pm$ error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos.....	100
<b>Figura 7.3.</b>	Efecto de <i>Pseudomonas</i> sp (OLS-SF5-), y aplicación de fertilizante (Floranid Master Extra) en el área foliar específica (A) y eficiencia fotoquímica del fotosistema II (B) de plantas de <i>Catharanthus roseus</i> , después de 70 días. n= 18. Medias $\pm$ error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos...	101
<b>Figura 7.4.</b>	Efecto de <i>Pseudomonas</i> sp (OLS-SF5-), y aplicación de fertilizante (Floranid Master Extra) en el peso seco total de plantas de <i>Catharanthus roseus</i> , después de 70 días. n= 18. Medias + error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos.....	102

# **CAPÍTULO I.**

## **INTRODUCCIÓN**

El cáncer es una de las cinco primeras causas de defunción, tanto en países desarrollados como en desarrollo (Cortinas, 1990). Por ejemplo, en 2008 se le atribuyen 7.7 millones de las defunciones ocurridas (13% del total) (GLOBOCAN, 2008).

Una de las principales fuentes de obtención de medicamentos antineoplásicos está representada por plantas, cuyos metabolitos secundarios tienen importancia en la quimioterapia antineoplásica (Rodríguez, 1978). El 80% de la población mundial, aproximadamente unos cuatro mil millones de personas, utilizan a las plantas como principal remedio medicinal en muchas de sus enfermedades (Martínez, 2000). A las plantas que poseen principios activos capaces de contrarrestar algún padecimiento se les ha denominado como plantas medicinales (Muñoz, 2002). Las causas del incremento del uso de plantas medicinales tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo son múltiples (Espinoza-Galván y Rodríguez-Landa, 2004), por ejemplo:

- a) Las plantas medicinales representan una alternativa para aquellos pacientes que no son tolerantes a ciertas drogas sintéticas, las cuales generan síntomas de alergia (Espinoza-Galván y Rodríguez-Landa, 2004).
- b) En algunos pacientes con cáncer, las células tumorales no responden a uno o varios agentes antineoplásicos que pueden diferir en su estructura química, blancos farmacológicos o inclusive rutas metabólicas, a lo cual se ha denominado como sistema de resistencia múltiple a los fármacos (Bredel, 2001; Huang y Freter, 2015) y,
- c) En los países de menor desarrollo el uso de plantas medicinales forma parte de una riqueza etnobotánica ancestral que se ha transmitido de generación en generación.

En las plantas medicinales no todos los principios activos que tienen valor medicinal son directamente aprovechables, ya que éstos están acompañados de otras sustancias al mismo tiempo. Casi siempre en una misma planta existen varios componentes activos, donde el componente principal, determina las aplicaciones que tendrá la especie vegetal (Pahlow 1994). Sin embargo, el grado en el que los componentes secundarios influyen sobre la acción queda manifestado al aislar el principio activo principal, donde en este caso frecuentemente su efecto disminuye o es distinto (Stevens *et al.*, 2002; Espinosa *et al.*, 2012).

A pesar de que las plantas medicinales son la fuente principal de principios activos, su desventaja radica en que su acumulación es lenta y baja, ya que constantemente la acumulación del principio activo está vinculada con una serie de factores temporales y espaciales (Trejo y Rodríguez, 2007).

Dado el incremento del uso de las plantas medicinales y de sus metabolitos secundarios, algunos estudios se han dirigido a evaluar el aumento en el crecimiento de las plantas medicinales y/o el incremento del contenido de sus metabolitos secundarios (Coppeta *et al.*, 2006; De la Rosa-Mera *et al.*, 2011; De la Rosa-Mera *et al.*, 2012; Zubek *et al.*, 2012). Algunas evaluaciones muestran que los microorganismos promotores de crecimiento vegetal del suelo pueden ser una herramienta práctica para obtener dicho beneficio. Dentro de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal, están aquellos utilizados previamente en plantas con carácter alimenticio (De la Rosa-Mera *et al.*, 2012; De la Rosa-Mera *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante analizar el efecto del extracto de la planta medicinal después de inducir el incremento en el crecimiento y/o su concentración. De igual forma, es necesario conocer si el incremento en la concentración de las sustancias acompañantes interviene en la actividad biológica del extracto.

El análisis de la efectividad biológica del extracto obtenido de una planta medicinal es necesario ya que es conocido que la presencia de metabolitos secundarios en las plantas es una característica general, la cual no es exclusiva del reino vegetal, sino que se extiende a otros dominios (Dirzo, 1985; Hartmann, 2007) y cuya producción es regulada por diversos factores bióticos y abióticos; de ahí su principal función, como mediadores de las interacciones ecológicas con otros organismos (Seigler, 2002; García, 2004). Por ejemplo, se ha documentado que la simbiosis microorganismo-planta es facilitada por un diálogo molecular, activando una cascada de señalización donde se evidencia un incremento o disminución en la concentración de metabolitos secundarios (Bouwmeester *et al.*, 2007; Badri *et al.*, 2009).

Por lo tanto, se entiende que como respuesta a un factor estresante la planta incrementa la concentración de sus metabolitos secundarios; es decir, no solo incrementará el metabolito secundario principal, sino también, posiblemente, modificará la concentración de las sustancias acompañantes. Considerando la sinergia entre los metabolitos secundarios y el cambio en su concentración se especula que el efecto probablemente se altere (Castells y Hernández, 2007).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio consistió en evaluar la efectividad biológica de los extractos de obtenidos de dos plantas medicinales con propiedades antineoplásicas, sometidas a regímenes de fertilización o a la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

## CAPÍTULO II.

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### **Objetivo general**

Evaluar el crecimiento de plantas de *Catharantus roseus* (L) G. Don y flores de *Calendula officinalis* L. por efecto de fertilización nitrogenada orgánica e inorgánica y de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, y evaluar la efectividad biológica de extractos metanólicos aplicados en líneas celulares.

#### **Objetivos específicos**

1. Seleccionar el tipo de fertilización nitrogenada orgánica e inorgánica, y la concentración más eficaz en el crecimiento de *Catharantus roseus* (L) G. Don. y *Calendula officinalis* L.
2. Seleccionar bacterias promotoras del crecimiento vegetal que estimulen el desarrollo de plantas de *Catharantus roseus* (L) G. Don. y *Calendula officinalis* L.
3. Evaluar la actividad biológica de extractos metanólicos obtenidos de hojas de *Catharantus roseus* (L) G. Don. y flores de *Calendula officinalis* L., considerando los mejores tratamientos de los objetivos 1 y 2, en las líneas celulares J774A.1, Vero y HeLa.
4. Evaluar la sobreexpresión de genes involucrados en el metabolismo de vinblastina en plantas de *Catharantus roseus* (L) G. Don., por efecto de la fertilización orgánica e inoculación con una bacteria promotora del crecimiento vegetal.

## **Hipótesis General**

El crecimiento de *Catharantus roseus* (L) G. Don y de *Calendula officinalis* L., será mayor por efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, así como la efectividad biológica de los extractos metanólicos aplicados en líneas celulares.

## **Hipótesis específicas**

1. Las plantas de *Catharantus roseus* (L) G. Don. y *Calendula officinalis* L., fertilizadas orgánicamente presentarán mayor crecimiento, que las plantas fertilizadas inorgánicamente.
2. Las plantas de *Catharantus roseus* (L) G. Don. y *Calendula officinalis* L., mostrarán mayor crecimiento al ser inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en comparación con plantas testigo sin inocular.
3. Los extractos de hojas de *Catharantus roseus* (L) G. Don. y de flores de *Calendula officinalis* L. inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal presentarán una alta efectividad biológica en las líneas celulares J774A.1, Vero y HeLa.
4. Existirá una sobreexpresión genética involucrada en el metabolismo de vinblastina en el extracto de hojas de *Catharantus roseus* (L) G. Don., por efecto de la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en comparación con plantas fertilizadas orgánicamente y plantas testigo sin inocular.

## CAPÍTULO III.

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### **3.1. Las plantas medicinales con propiedades antineoplásicas y la acción de los metabolitos secundarios.**

Las plantas medicinales se definen como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que restablecen el desequilibrio orgánico originado por una enfermedad (Muñoz, 2002). Estas sustancias son llamadas principios activos o metabolitos secundarios, por lo que las plantas que las contienen pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos, o cuyos principios activos o metabolitos secundarios pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Ocampo, 2002).

Una de las fuentes de obtención de medicamentos son las plantas, lo cual es particularmente evidente en las áreas de cáncer y enfermedades infecciosas, donde más 60% y el 75% de estos fármacos, respectivamente, son de origen natural (Newman *et al.*, 2003). Los metabolitos secundarios aislados principalmente han sido alcaloides, los cuales han alcanzado importancia en el terreno de la quimioterapia antineoplásica (Rodríguez, 1978; Vega-Ávila *et al.*, 2006). Los diferentes fármacos antineoplásicos pueden actuar sobre una o varias fases del ciclo celular o sobre los mecanismos de control de la proliferación celular. Así, la clasificación de los fármacos antineoplásicos se basa en el punto de acción del compuesto antineoplásico (Benedí y Gómez, 2006). Por ejemplo, el mecanismo de acción de la colchicina, un alcaloide obtenido del *Colchicum autumnale* L.(Liliaceae), radica en su unión reversible y selectiva con la tubulina celular, impidiendo su polimerización para la formación de microtúbulos (Cearra *et al.*, 2009).

Otros ejemplos son la vinblastina y la vincristina (Martínez *et al.*, 2002) alcaloides derivados de la planta ornamental llamada *Catharanthus roseus* (Familia Apocynaceae), que es cultivada especialmente en Filipinas y Jamaica (Rodríguez, 1978). El mecanismo de acción de ambos alcaloides antitumorales se conoce sólo en parte. Se sabe que ambos alcaloides ocasionan la detención de la célula cancerígena en la metafase; por lo que son denominados inhibidores de la mitosis. Aparentemente, la vinblastina podría actuar como un antimetabolito (Rodríguez, 1978; Vega-Ávila *et al.*, 2006), que se define, como un fármaco que tiene una estructura similar a la de los componentes del metabolismo intermediario celular, de modo que interfiere en su metabolismo y en concreto, en la síntesis de ácidos nucleicos (Benedí y Gómez, 2006; Rodríguez, 2008). La mayoría de los antimetabolitos son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división, razón por la que se pueden incorporar a las moléculas de ADN y ARN, y desde allí transmitir falsos mensajes. Otros antimetabolitos inhiben enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales. Su eficacia, en general, es máxima cuando la proliferación celular es rápida, es decir ejercen su acción principalmente sobre tumores en rápido crecimiento (Benedí y Gómez, 2006).

Los productos naturales antineoplásicos actúan de manera diferente, recibiendo los siguientes nombres (Aristil, 2013): a) **agentes antineoplásicos inhibidores mitóticos**, los cuales bloquean las células al final de la fase S, impidiendo el inicio de la fase G2, y también inhiben a la topoisomerasa II; b) **antineoplásicos alcaloides de la vinca**, quienes inhiben la mitosis, tras unirse a la tubulina, inhibiendo su formación; c) **agentes antineoplásicos antimicrotubulares**, actúan en la fase M del ciclo celular, bloquean el desacoplamiento del huso mitótico o, por el contrario, lo estabilizan haciéndolo poco funcional (taxanos); estos agentes son activos en una determinada fase del ciclo celular, provocando su cese en la



metafase (Overby *et al.*, 2014); d) **agentes inhibidores de la topoisomerasa I**, lo cual imposibilita la replicación del ADN e inhibe el ciclo celular, como ejemplo el alcaloide de la planta camptotecina y sus análogos topotecán e irinotecán, inhiben la topoisomerasa I (Navarro, 2005); y e) **agentes con acción antibiótica**, los cuales son de estructura y origen diverso, y su mecanismo de acción también puede ser diferente, puesto que se intercala entre cadenas de ADN, inhibe topoisomerasas y altera la membrana celular (Aristil, 2013).

### 3.2. El cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades, caracterizado por el crecimiento celular incontrolado, con aumento de la proliferación y disminución de la apoptosis, generando una masa anormal de tejido, la cual tiende a propagarse (González, 2000; Wiesner *et al.*, 2004; American Cancer Society, 2012; Huang y Freter, 2015; Kasala *et al.*, 2015), invadiendo localmente o a distancia otros tejidos (De la Garza y Juárez, 2014; Huang y Freter, 2015; Kasala *et al.*, 2015). Dicho crecimiento no está acoplado al crecimiento normal del organismo, y continúa progresando excesivamente (Rodríguez, 1978).

El origen del cáncer es multifactorial se puede deber a factores tanto externos (tabaquismo, organismos infecciosos, alimentación deficiente, sustancias químicas y radiación) como internos (mutaciones heredadas, hormonas, problemas inmunológicos y mutaciones debidas al metabolismo). Los factores causales pueden ejercer su acción en conjunto o en secuencia para iniciar o promover el desarrollo del cáncer (American Cancer Society, 2012).

Las pruebas más antiguas de la presencia de cáncer datan de comienzos del periodo pleistoceno, es decir, hace aproximadamente setecientos mil años (De la Garza y Juárez, 2014). La primera descripción de cáncer en humanos probablemente se encuentre en los

Papiros de Edwin Smith del año 3000 antes de Cristo, en donde se ilustra un caso de cáncer de mama (Hajdu, 2011). Otras fuentes muestran registros relacionados con el cáncer del año 1600 antes de Cristo, en Egipto. En los papiros de Ebers se describen varios tumores de piel, útero, estómago, y recto (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000; Hajdu, 2011), existiendo momias con tumores óseos (Díaz-Rubio y García-Conde, 2000).

El origen de la palabra cáncer se le adjudica a Hipócrates (Di Lonardo *et al.*, 2015), quien creía que el cuerpo tenía cuatro humores o fluidos corporales (la sangre, la flema, la bilis amarilla, y la bilis negra), y que el exceso o la deficiencia de uno de éstos podían ocasionar enfermedades entre ellas, el cáncer (Mitrus *et al.*, 2012; De la Garza y Juárez, 2014).

En el siglo XVI Paracelso, después de estudiar la proliferación de cánceres en trabajadores mineros, observó que su sangre contenía sales de azufre y arsénico, y sugirió que la aparición de los tumores era una respuesta a la acumulación de sustancias nocivas en la sangre; esta observación pudo ser la primera en relacionar la exposición de agentes químicos con la aparición de cáncer (Mitrus *et al.*, 2012; Di Lonardo *et al.*, 2015).

En 1761, Giovanni Battista Morgagni publica resultados obtenidos a través de múltiples autopsias donde revela que la aparición de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer, está vinculada con lesiones patológicas de un órgano en particular; estos hallazgos contribuyeron al abandono de la teoría humoral, percibiendo ahora a la enfermedad como una lesión en órganos (Fonseca, 2012; Mitrus *et al.*, 2012).

En la primera mitad del siglo XIX, Schleiden y Müller y Schwann observaron que los tumores neoplásicos están formados por células con morfología anormal en comparación con las células normales circundantes a las células cancerosas (Rojas-Espinoza, 2006; Mitrus *et al.*, 2012). Así, los tumores neoplásicos se caracterizan por presentar un excesivo número de

células en división, mitosis anómalas, células con núcleos de gran tamaño, células en necrosis y células que evidenciaban pérdida de la diferenciación (Bonadonna, 1983; Mitrus *et al.*, 2012).

En 1960, con ayuda del desarrollo en las investigaciones genéticas, se supo que el desarrollo del cáncer está vinculado a errores en el material genético y que estos errores son transferidos a otras células en las subsiguientes divisiones. Por lo tanto, la interpretación de la carcinogénesis se desplazó de celular (enfermedad de las células) a nivel molecular (enfermedad de genes).

Las células del organismo humano contienen información hereditaria codificada en el ADN, lo cual asegura su reproducción y el paso de esta información a la descendencia. Generalmente, las células crecen y se dividen de manera coordinada y ordenada, sin embargo, algunas veces este proceso se descontrola dañando el material genético de una célula y provocando cambios irreversibles que afectan el crecimiento y la división normal de las células. Lo anterior ocasiona que las células no mueran cuando deberían de morir, o se originen células cuando el cuerpo no las necesita (De la Garza y Juárez, 2014).

Con base en lo anterior, se establece que las células cancerosas crecen de manera anormal porque existe una lesión en el ADN (Di Lonardo *et al.*, 2015). Por lo tanto, el cáncer es el resultado de un defecto adquirido del ADN celular que provoca una desregulación en el proceso de crecimiento celular. La célula alterada benigna se transforma en maligna (proceso denominado carcinogénesis) y se hace independiente de los mecanismos reguladores normales, convirtiéndose en un clon de células malignas que al crecer, producirán un tumor (González, 2000; Wiesner *et al.*, 2004). La manifestación clínica más común del cáncer es la presencia de una “bolita”, la cual recibe el nombre de tumor sólido, sin embargo, existen cánceres que no forman tumores sólidos, como las leucemias (De la Garza y Juárez, 2014).

Las formas predominantes de cáncer varían de un país a otro, o bien siguen una tendencia diferente. Por ejemplo, en Estados Unidos los tipos más comunes de cáncer son los de pulmón, intestino grueso y mama; en tanto que en México predominan las leucemias y linfomas, los cánceres de próstata, pulmón y estómago en los hombres, y en la mujer, el cáncer del cuello uterino y de mama. En México se registraron 102,657 casos con tumores malignos que corresponden a 101.6 casos por cada 100,000 habitantes (Cortinas, 1990). En el 2008, la incidencia nacional de defunciones por tumores fue de 66.6 por cada 1000, 000 habitantes. Se estimó que la tasa de mortalidad por tumores malignos de 1980 al 2008, tuvo un crecimiento de 263% (Secretaría de Salud, 2011).

A pesar de los avances científicos en la terapia del cáncer, éste sigue siendo una de las primeras causas de defunción, tanto en países desarrollados como en desarrollo (Cortinas, 1990; Huang y Freter, 2015). Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, y se le atribuyen 7.7 millones de las defunciones ocurridas en 2008 (GLOBOCAN, 2008; De la Garza y Juárez, 2014; Kasala *et al.*, 2015). Para el 2015, el cáncer causó más de 8 millones de muertes, estimando que el 15% de todas las defunciones derivan de esta enfermedad (Huang y Freter, 2015). Se calcula que para el 2030, el número de defunciones por enfermedades cancerígenas, superarán los 13.1 millones de personas (Bray *et al.*, 2012; De la Garza y Juárez, 2014).

### **3.3. Clasificación del cáncer**

La nomenclatura de las lesiones tumorales se divide en dos grandes apartados: a) Tumores benignos y lesiones precancerosas, y b) Cánceres malignos (carcinomas, sarcomas y tumores embrionarios) (Wiesner *et al.*, 2004). Los tumores benignos son generalmente crecimientos tumorales que suelen estar encapsulados, aunque no todos los tumores encapsulados son benignos, muchos de ellos pueden adquirir características malignas. Por su

parte, las lesiones precancerosas son lesiones muy difíciles de distinguir de los crecimientos malignos (Rodríguez, 1978).

El cáncer puede surgir en cualquier órgano del cuerpo, aunque algunos órganos, son afectados más frecuentemente que otros. De manera general, la mayoría de los cánceres malignos del hombre pueden clasificarse en tres grupos (Cortinas, 1990): 1) los carcinomas, que se originan en los estratos celulares o “epitelios” que recubren la superficie (por ejemplo, la piel, el tracto respiratorio, los intestinos); 2) los sarcomas, que se desarrollan en los múltiples tejidos de sostén del cuerpo (como las células del hueso, vasos sanguíneos, células fibrosas de los tejidos, músculos); y 3) un último grupo heterogéneo de cánceres originados en las células productoras de leucocitos (glóbulos blancos de la sangre) y el sistema inmunitario (por ejemplo, las diferentes clases de linfocitos). La clasificación del tercer grupo es complicada e incluye a los linfosarcomas, la enfermedad de Hodgkin (que afecta las glándulas linfáticas), y los diferentes tipos de leucemias.

También se distinguen grupos de cánceres con base en el órgano afectado, o en el tipo de célula involucrada (Cairns, 1981; Taylor y Kirwan, 2011), destacando el cáncer de pulmón (1.37 millones muertes), estómago (736,000 muertes), hígado (695,000 muertes), colorectal (608,000 muertes), mama (458,000 muertes), y cuello del útero (275,000 muertes) (GLOBOCAN, 2008).

### 3.4. Epidemiología del cáncer

La epidemiología del cáncer, se ocupa del estudio de la distribución de las enfermedades neoplásicas, sus etapas precursoras y los factores de riesgo, con el propósito de lograr una prevención efectiva (Albujar, 2006).

En general, el cáncer no se origina por una sola causa, sino que en su generación participan múltiples factores, por lo que Ucrós (2004) cataloga al cáncer como una enfermedad multifactorial donde participan factores internos y externos (Cuadro 3.1). Los factores internos incluyen la predisposición genética, donde se ha documentado que aproximadamente el 1% de todos los cánceres aparecen en individuos que presentan un síndrome de cáncer hereditario, al portar una mutación germinal en todas las células de su organismo (González, 2000). Como factores externos se pueden mencionar algunos como la exposición a sustancias químicas (Alavanja *et al.*, 2003; Richter, 2015) o agentes físicos o biológicos que afectan a los genes transformando las células en cancerosas (Ucrós, 2004; Udeigwe *et al.*, 2015).

**Cuadro 3.1. Factores internos y externos involucrados en el origen y desarrollo del cáncer (Ucrós, 2004).**

<b>Factor</b>	<b>Agente</b>	<b>Tipo de cáncer</b>
<b>Interno</b>	Predisposición genética	
<b>Externo</b>	Tabaco	Pulmón
	Infecciosos	Virus del papiloma humano Cuello del útero Ano-genital
	Ocupación (exposición)	Benceno Leucemia
	Alcohol	Actúa como disolvente de ciertos cancerígenos Cavidad oral laringe
	Radiación (exposición)	Rayos ultravioleta Cáncer de piel
	Medicamentos	Terapias hormonales

### 3.5. Líneas celulares

La célula es considerada como la unidad mínima de vida y es el constituyente esencial de los seres vivos (Monge-Nájera *et al.*, 2005; Mader, 2008), puesto que en su conjunto forma tejidos, órganos, sistemas y al organismo como tal. La célula es una entidad dinámica con múltiples reacciones químicas en su interior que en su conjunto se denomina metabolismo celular (De la Garza y Juárez, 2014).

Los orígenes del cultivo *in vitro* de células animales se remontan a mediados del siglo XIX, con el desarrollo de técnicas microbiológicas que permitieron el cultivo de bacterias, abriendo la posibilidad de realizar cultivos de cepas específicas de manera aislada (Tavira *et al.*, 2009).

A partir de la década de 1920 se inició el subcultivo de fibroblastos, los cuales son definidos por Acosta (2006) como células que ejercen funciones tisulares y del sistema inmune; hasta 1943, se estableció la primera línea celular continua de fibroblastos de ratón. En 1952 se generó la primera línea celular de origen humano, HeLa, abreviatura correspondiente al nombre de la mujer de quien fueron extraídas dichas células, a partir de un carcinoma cervical derivado de la presencia del virus de papiloma serotipo 18, siendo una de las líneas celulares más utilizadas con diferentes propósitos (Dosne, 2006).

Un cultivo de células o bien cultivo celular, es aquél con alta capacidad de multiplicarse *in vitro*; el cual es establecido a partir de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen (Tavira *et al.*, 2009). Este cultivo implica aislar las células de un organismo y mantenerlas en condiciones que permitan su supervivencia y crecimiento. Un cultivo de células con un periodo de vida indefinido se considera inmortal y se denomina “línea celular” (Lodish *et al.*, 2006).

A pesar de que los cultivos de células animales han sido importantes en el laboratorio en los últimos 100 años, la necesidad inicial de vacunas virales para humanos en la década de 1950 (en particular, la poliomielitis) fue el motivo que aceleró el diseño de bioprocesos a gran escala para las células de mamíferos (Kretzmer, 2002; Butler, 2005).

Otro propósito importante en los primeros intentos de cultivar células era comparar las propiedades de las células cancerosas y las células normales. Como resultado, ha sido posible iniciar cultivos en crecimiento a partir de cánceres naturales y de sus equivalentes normales no cancerosos para comparar sus propiedades. Sin embargo, se ha tenido mucho más éxito en el estudio de células normales *in vitro*, las cuales son transformadas a células cancerosas (mediante la transfección de oncogenes, por ejemplo) mismas que pueden formar tumores al ser trasplantadas de nuevo a un animal de laboratorio (Cairns, 1981).

El estudio del cáncer en humanos a partir de líneas celulares ha hecho importantes contribuciones a la biología del cáncer, siendo una herramienta que permite conocer la respuesta de diferentes tipos de cánceres a una variedad de fármacos. Por esta razón, en 1980 el Instituto Nacional del Cáncer desarrolló un programa de terapéutica, considerando un grupo de 60 líneas celulares de cáncer, ampliamente caracterizadas, las cuales derivaban de nueve diferentes tipos de tumores, denominadas el panel NCI-60, con lo cual se permitió suplantar el uso de tumores de animales (Shoemaker, 2006; Gillet *et al.*, 2011). Estas células se han empleado para evaluar la resistencia múltiple a los fármacos (Scherf *et al.*, 2000; Gillet *et al.*, 2011), por lo que son utilizadas como apoyo a la comunidad de investigación del cáncer (Shoemaker, 2006; Gillet *et al.*, 2011).

La clasificación de las líneas celulares incluye la línea celular continua que consiste de células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Estas células pueden provenir de tumores o de un proceso de transformación de



un cultivo primario por medio de una pérdida de regulación debido al subcultivo continuo, o mediante transfección con oncogenes, o el tratamiento con agentes carcinogénicos (Tavira *et al.*, 2009). También las líneas celulares continuas pueden ser transfectadas con genes específicos para la producción de proteínas de interés, y se les conoce como líneas celulares transformadas genéticamente (Tavira *et al.*, 2009).

Por otra parte, el mantenimiento a corto plazo de un cultivo celular se realiza por el subcultivo del mismo, el cual puede conducir a modificaciones genéticas que pueden repercutir en su fenotipo, sin embargo, esto no siempre sucede (Tavira *et al.*, 2009).

Para la obtención de un cultivo de células se colocan pequeños trozos de tejidos en un recipiente de cultivo, y se cubre con medio nutritivo que contenga suero (Cairns, 1981). En México las instituciones que trabajan con líneas celulares cancerígenas son el Instituto Nacional de Cancerología, el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Nacional de Medicina Genómica, y la Universidad Veracruzana, entre otras.

### **3.6. Microorganismos y metabolitos secundarios en plantas**

Las interacciones entre la planta y los microorganismos pueden ocurrir en tres partes importantes de la planta. La primera de ellas es la filósfera, la cual está relacionada con la parte aérea de la planta; la segunda es la endósfera, que comprende el sistema interno de transporte; y la tercera es la rizósfera, término que define al suelo especialmente influenciado por las raíces de las plantas o en asociación con las raíces, y el material producido por la planta (Bhattacharyya y Jha, 2012). En la rizósfera existe una alta densidad de bacterias,

hongos, protistas, y nemátodos, así como compuestos orgánicos relativamente lábiles, tales como azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos (Bringham *et al.*, 2001).

Algunos de los microorganismos del suelo poseen funciones muy particulares pues mejoran el crecimiento de las plantas, contribuyendo de diferentes maneras. Por ejemplo, de manera directa participarían en la solubilización de nutrientes, en la fijación de nitrógeno, y en la producción de reguladores de crecimiento, facilitando la absorción de agua, entre otras funciones. Indirectamente participan en la estimulación del desarrollo de la micorriza en las plantas, eliminando sustancias tóxicas, o ejerciendo exclusión competitiva de patógenos (producción de sideróforos) (Loredo-Ostí *et al.*, 2004; Bashan y Bashan 2010). En este último caso se reconoce la amenaza de los patógenos para la producción de alimentos y la estabilidad de los ecosistemas. En las últimas décadas al intensificarse la producción agrícola, también se incrementó el uso de agroquímicos como método para proteger a los cultivos (Compant *et al.*, 2005). Así mismo, al aumentar el uso de fertilizantes, se contribuye a acrecentar los problemas de contaminación del suelo y de cuerpos de agua (Loomis y Connor, 2002; Díaz y Rosenberg, 2008). Por lo anterior, el uso de microorganismos benéficos para las plantas forma parte de una tecnología que garantiza una productividad biológica, ecológica y económica más exitosa, y sin contaminar el ambiente (Aguirre *et al.*, 2009).

Los microorganismos, aprovechados por su cualidad de optimizar el crecimiento vegetal de manera general, han sido denominados como inoculantes microbianos, fertilizantes bacterianos, y en ocasiones se nombran como microorganismos promotores del crecimiento vegetal. Entre los microorganismos mencionados, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son parte de la biota localizada en la rizósfera, por lo que también son llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Las cualidades que las caracterizan son su amplia adaptabilidad a diferentes ambientes, alta tasa de crecimiento, y

la versatilidad bioquímica para metabolizar una amplia gama de compuestos naturales (Bhattacharyya y Jha, 2012). No obstante, el concepto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal se ha limitado a aquellas cepas bacterianas con mayor eficacia en la colonización y promoción del crecimiento vegetal (Weller *et al.* 2002; Vessey 2003).

Martinez-Viveros *et al.* (2010) comentan que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal de acuerdo a su grado de asociación con las células de la raíz se pueden clasificar en extracelulares donde se localizan géneros como *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Gray y Smith 2005; Bhattacharyya y Jha, 2012), e intracelulares entre las cuales se encuentran especies de *Frankia* (Gray y Smith 2005; Verma *et al.*, 2010; Bhattacharyya y Jha, 2012).

Debido a su importancia, se han desarrollado diversos trabajos de investigación donde se evalúa el efecto de diferentes cepas bacterianas en el crecimiento vegetal, entre éstas destacan *Rhizobium* (Sarabia *et al.*, 2010), y *Pseudomonas* (Cano, 2011), entre otras. Además de incrementar el crecimiento de las plantas, también participan en el incremento de metabolitos secundarios que tienen un importante papel en la industria farmacéutica (De la Rosa-Mera *et al.*, 2011).

Al tratar de dilucidar cuál es el mecanismo que induce la promoción en el incremento de metabolitos secundarios en las plantas al asociarse a un microorganismo, se han planteado diversas hipótesis, una de ellas argumenta que durante el desarrollo de la asociación se expresa un diálogo molecular entre los organismos involucrados, lo cual de manera indirecta influye en la concentración de metabolitos secundarios con aplicación médica (Pozo-Azcon-Aguilar, 2007; Frey-Klett *et al.*, 2011).

Los metabolitos secundarios son compuestos de los cuales no se conoce una función específica en el organismo, como es el caso de los metabolitos primarios; sin embargo, es reconocido su papel biológico, en particular en las interacciones entre los organismos con su ambiente, mostrando su importancia como señales y toxinas (Brader *et al.*, 2014). Es conocido que antes del diálogo molecular, la bacteria comienza la producción de una serie de compuestos que le permitirán asegurar el contacto con el organismo a asociarse; es decir, hay bacterias que pueden producir metabolitos secundarios necesarios para que se lleve a cabo la interacción con el hospedero, pero otras pueden competir por espacios con otros microorganismos de la rizósfera (Compant *et al.*, 2010). Así mismo, la producción de metabolitos secundarios, depende de los competidores con que se enfrente la bacteria en la rizósfera, (Sturz *et al.*, 2000), pues es conocido, desde la elaboración del concepto de rizósfera en 1904, que en este sitio cohabitan diversos microorganismos, en comparación con otras partes del suelo (Hiltner, 1904; Hartmann *et al.*, 2008).

### **3.7. Discusión general de la revisión de literatura y justificación de la investigación.**

La producción de metabolitos secundarios por la planta no es una característica particular en las asociaciones mutualistas, por el contrario, también se presentan en la asociación patogénica, en la que se lleva a cabo la expresión de genes importantes en la producción de metabolitos secundarios que favorezcan a contrarrestar al patógeno. Sin embargo, en la asociación simbiótica la etapa de defensa por parte de la planta es temporal (Sharma *et al.*, 2013). Por lo anterior, se ha recurrido al cultivo de tejidos infectados para la producción de metabolitos secundarios. No obstante, la problemática se presenta cuando la producción de metabolitos secundarios se reduce o está ausente en células indiferenciadas, como resultado de la ausencia de genes reguladores, que controlan la síntesis de metabolitos

secundarios debido a que se localizan en un tipo celular, tejido en particular, o en un estado específico de la planta (De Luca y Laflamme, 2001; Facchini y St-Pierre, 2005; Sharma *et al.*, 2013). Por lo cual, aún se continúa evaluando el efecto de microorganismos en plantas completas en la producción de metabolitos secundarios, así como la fertilización nitrogenada.

Considerando la información obtenida, se establece la necesidad y la importancia de buscar estrategias que apoyen la obtención de metabolitos secundarios, particularmente antineoplásicos, debido, entre otras cosas, al incremento en la incidencia de diferentes tipos de cánceres.

Por lo cual, no sólo es indispensable observar el incremento en la producción del o de los metabolitos, sino también es importante caracterizar y evaluar la efectividad del extracto obtenido de la planta, después de haber inoculado con microorganismos o fertilizado, puesto que no solo se incrementará, en teoría, el metabolito principal, sino que las sustancias acompañantes que integran el extracto y que pueden estar participando en la funcionalidad del mismo.

## CAPÍTULO IV

### Fertilización nitrogenada orgánica e inorgánica en el crecimiento de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y *Calendula officinalis* L.

#### Resumen

Este trabajo evaluó el efecto de dos tipos de fertilización en la promoción del crecimiento vegetal en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., y *Calendula officinalis* L., bajo condiciones de invernadero. Plántulas con quince días de crecimiento fueron trasplantadas y fertilizadas orgánicamente (Floranid<sup>®</sup> Master Extra, NPK 19-5-10) o inorgánicamente (16 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), aplicando cinco niveles de nitrógeno (12.2, 25, 50, 75 y 100%), durante 70 días. Las plantas de *Catharanthus roseus* fertilizadas orgánicamente a una concentración del 100% presentaron mayor número de hojas, área foliar, altura, número y peso seco de flores, peso seco total y botones florales. En contraste, las plantas de *Calendula officinalis* fertilizadas inorgánicamente al 100%, presentaron mayor altura, peso seco total, número de hojas y flores, y peso seco de botones florales y flores.

**Palabras clave:** Dosis de fertilización, vinca, crecimiento vegetativo, floración.

## CHAPTER IV

### Organic or inorganic nitrogen fertilization on the growth of *Catharanthus roseus* (L.)

#### G. Don. and *Calendula officinalis* L.

#### Abstract

This study evaluated the effect of two types of fertilization on the growth of two medicinal plants, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., and *Calendula officinalis* L., under greenhouse conditions. Fifteen days-old seedlings were transplanted and organically (Floramid<sup>®</sup> Master Extra, NPK 19-5-10) or inorganically fertilized (16 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), applied at five concentrations of nitrogen (12.2, 25, 50, 75, and 100%), during 70 days. Plants of *Catharanthus roseus* organically fertilized at 100% showed high number of leaves, leaf area, plant height, number and dry weight of flowers, and total dry weight and floral buttons. In contrast. Plants of *Calendula officinalis* inorganically fertilized at 100%, had high height, total dry weight, number of leaves and flowers, and dry weight of floral buttons and flowers.

**Key words:** fertilization doses, vinca, vegetative growth, flowering.

#### 4.1. Introducción

Un fertilizante es una sustancia que contiene elementos o compuestos químicos, en forma tal que pueden ser absorbidos por las plantas. Entre los elementos esenciales proporcionados por los fertilizantes, el más importante es el nitrógeno (Alcántar y Trejo-Téllez, 2010). El nitrógeno es un elemento necesario, forma parte del mayor porcentaje del aire que respiramos, y es un componente estructural de las proteínas, mismas que participan en diferentes procesos metabólicos. Además, el nitrógeno forma parte de las bases que componen al DNA y al RNA (Mader, 2008).

Por lo tanto, el nitrógeno tiene un papel importante en la producción agrícola, puesto que para que un suelo sea productivo, es necesario reincorporar aquellos nutrientes que son extraídos por los cultivos (Porta-Casanellas *et al.*, 2003). Al inicio, la agricultura trato de satisfacer la necesidad de producción empleando operaciones agrícolas llevadas a cabo directamente de forma manual o con la ayuda de animales, y haciendo uso de implementos rudimentarios y aplicando estiércol. En el caso del estiércol se tiene que los primeros aportes de este material al suelo datan de 4000 a. C. (De la Rosa, 2008; Andreu *et al.*, 2006). Con el aumento en la demanda de producción de plantas alimenticias existió mayor necesidad de buscar nuevos productos y métodos de producción (De la Rosa, 2008; Erisman *et al.*, 2011).

El conocimiento de la necesidad de utilizar aportes de fertilizantes al suelo inicia en 1840 con la publicación de la obra *Química en relación con la agricultura y el crecimiento de las plantas*, escrito por Justus von Liebig. En dicha obra se anuncia la Ley del Mínimo, la cual indica que, si un elemento falta o se encuentra en cantidad insuficiente, esto impedirá a los restantes producir su efecto normal o por lo menos disminuirá su acción nutritiva (Andreu *et al.*, 2006). A principios de la década de 1950, se introduce la agricultura moderna o productivista al implementar el uso intensivo de fertilizantes y productos fitosanitarios, la



mecanización, y la aplicación de biotecnología en la mejora de los cultivos (De la Rosa, 2008).

El uso de fertilizantes trajo consigo consecuencias negativas derivadas directamente de la toma de malas decisiones que se ven actualmente reflejadas en el deterioro ambiental como consecuencia, del uso irracional de fertilizantes nitrogenados (Loomis y Connor, 2002). La contaminación por fertilizantes se produce al utilizarlos de manera excesiva a lo que pueden absorber los cultivos, pues se contamina el suelo y a su vez, el exceso de nitrógeno puede ser lixiviado a las aguas subterráneas o a cuerpos de agua (Liang *et al.*, 2013). Al incrementar los nutrientes en los cuerpos de agua dulce comienza un proceso denominado eutrofización, cuyo fenómeno daña a otros ecosistemas (Mader, 2008; Díaz y Rosenberg, 2008).

La contaminación del agua al contener elevadas concentraciones de nitratos puede causar problemas de salud, sobre todo en la población infantil (Miñana, 2009). Debido a que la eliminación de nitratos del agua es un proceso costoso, el agua con este problema de contaminación no se utiliza normalmente, para el consumo humano (Bair, 2001). Además, se ha reportado que el óxido nitroso procedente de la agricultura es uno de los gases que contribuyen al calentamiento global (Velthof *et al.*, 2009; Vries *et al.*, 2011).

*Catharanthus roseus* es una planta perenne tropical, originaria de Madagascar, perteneciente a la familia *Apocynaceae* (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2013), cuya distribución ha incrementado en muchas regiones tropicales y subtropicales (Gupta 1977). Esta especie vegetal biosintetiza más de 130 alcaloides (van der Heijden *et al.* 2004; Verma *et al.*, 2012), cuyas funciones biológicas se pueden agrupar en tres tipos: diurético (vindolina, catarantina), hipotensor (ajmalicine, serpentina), y contra el cáncer (vinblastina y vincristina) (Gordon y Newman, 2005; Shakir *et al.*, 2013; Matsuura *et*

*al.*, 2013; Man *et al.*, 2012). El cultivo de *C. roseus* requiere de la aplicación de fertilizantes ricos en nitrógeno, cuya baja disponibilidad se refleja en un amarillamiento gradual de las hojas (Lata, 2007).

Por su parte *Calendula officinalis* es una planta anual originaria de Egipto, que se cultiva en todo el mundo y pertenece a la familia *Asteraceae* (Acosta *et al.*, 2001). Los extractos acuosos obtenidos a partir de flores, presentan propiedades farmacológicas relacionadas con efecto cicatrizante, antiinflamatorio, antibacteriano, anticancerígeno y tranquilizante, lo que hace a esta especie de importancia para la industria farmacéutica. Para el cultivo de esta especie vegetal se sugiere el uso de abonos orgánicos cuando se siembra en terrenos pobres en materia orgánica, o la combinación de fertilizantes orgánicos con dosis bajas de fertilizante mineral (Lastra y Piquet, 1999; Acosta *et al.*, 2001).

Investigaciones previas proponen para controlar la contaminación del suelo ocasionada por nitratos, la racionalización de la dosis de fertilización, para lo cual es necesario realizar previos análisis de suelo, mejorar el control de las dosis de agua de riego, y el uso de fertilizantes de liberación controlada adecuados para cada cultivo (Diez *et al.*, 1994). Por lo anterior, es importante elegir la concentración adecuada de fertilizante requerida por el cultivo. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el crecimiento de *Catharanthus roseus* y de *Calendula officinalis* por efecto de la aplicación de fertilización orgánica e inorgánica en diferentes dosis.

#### **4.2. Materiales y métodos**

Las plántulas de *C. roseus* y *C. officinalis* (adquiridas en la empresa Plántulas de Tetela S. de R. L. de C. V., Cuernavaca, Morelos; México) con tres semanas de crecimiento, fueron llevadas al invernadero y trasplantadas en macetas que contenían 1 kg de sustrato

constituido por vermiculita, turba y agrolita (1:1:2 v/v/v) previamente esterilizado (121 °C) durante tres días. La temperatura y la humedad relativa fueron registradas mediante una miniestación climática (data logger watchdog modelo 150, Spectrum® Technologies Inc., Illinois, USA). La humedad relativa (%) promedio máxima y mínima, fue de  $27.22 \pm 6.29$  y  $23.4 \pm 0$ , respectivamente; la temperatura (°C) promedio máxima y mínima, fue de  $33.14 \pm 4.21$  y  $15.6 \pm 1.13$ , respectivamente.

#### 4.2.1. Fertilización inorgánica en el crecimiento de *Catharanthus roseus* y *Calendula officinalis*.

Se consideraron cinco concentraciones de fertilización partiendo de 16 mM de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), concentración reportada para el cultivo de plantas ornamentales (van Iersel *et al.*, 1998). Los 16 mM correspondientes al 100%, fueron fraccionados al 75%, 50%, 25%, 12.5%. Las plantas fueron regadas cada tercer día con agua corriente, y cada ocho días con la solución nutritiva Jensen (Vincent, 1970). (APÉNDICE I), donde fue adicionado el fertilizante inorgánico en las diferentes concentraciones. Cada tratamiento tuvo siete repeticiones.

#### 4.2.2. Fertilización orgánica en el crecimiento de *Catharanthus roseus* y *Calendula officinalis*.

Como fertilizante inorgánico se utilizó Floranid Master Extra ® (NPK 19-5-10), consideraron cinco concentraciones de fertilización. La concentración del 100% fue la dosis de aplicación recomendada por el fabricante para plantas ornamentales (0.804 g por maceta). Esta dosis fue fraccionada al 75%, 50%, 25%, 12.5%. El fertilizante fue incorporado al sustrato al momento del trasplante. Las plantas fueron regadas cada tercer día con agua corriente, y cada ocho días con solución nutritiva Jensen (Vincent, 1970) (APÉNDICE I). Cada tratamiento tuvo siete repeticiones.

Las plantas control fueron también regadas cada tercer día con agua corriente, y cada ocho días con solución nutritiva Jensen (Vincent, 1970).

#### 4.2.3. Variables evaluadas.

Después de 70 días, las plantas fueron cosechadas para proceder a la evaluación de las siguientes variables. Para ambas plantas se evaluó el número de hojas, botones florales y flores, altura, área foliar, biomasa seca (hojas, tallo, raíces, flores y botones).

El área foliar fue determinada con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100; Nebraska, USA). 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, Illinois, USA), después de que los diferentes órganos de la planta fueron secados en un horno (FELISA, Modelo 242-A, México) a 70°C por 72 h.

#### 4.2.4. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, incluyendo once tratamientos con siete repeticiones cada uno, para cada especie vegetal. Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2006), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### **4.3. Resultados**

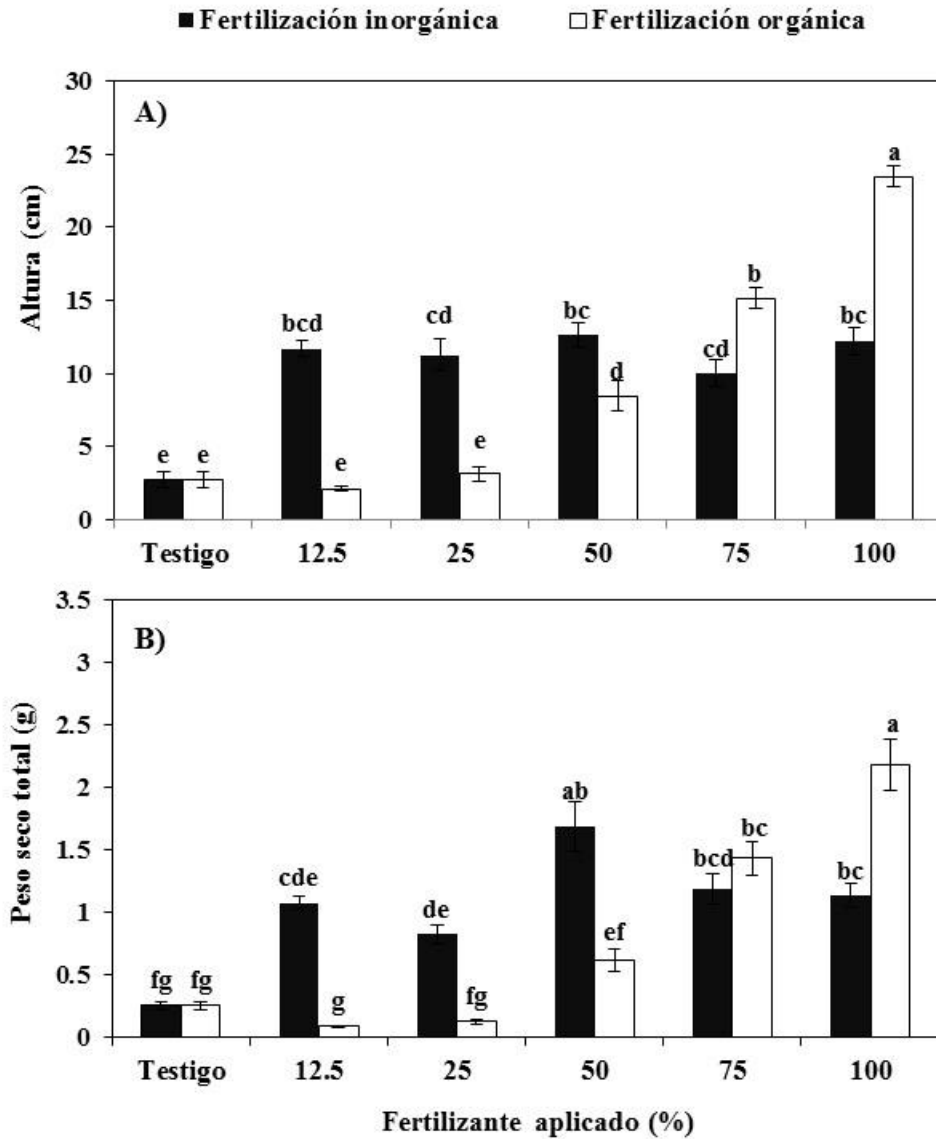
#### 4.3.1 Fertilización orgánica e inorgánica en el crecimiento de *Catharanthus roseus*

El tipo de fertilización únicamente tuvo efecto en el número y en el peso seco de botones florales y flores, observándose mayor número de hojas cuando se fertilizó con el fertilizante orgánico. En contraste, el peso seco de hojas y el peso seco total fueron mayores cuando se aplicó la fertilización inorgánica.

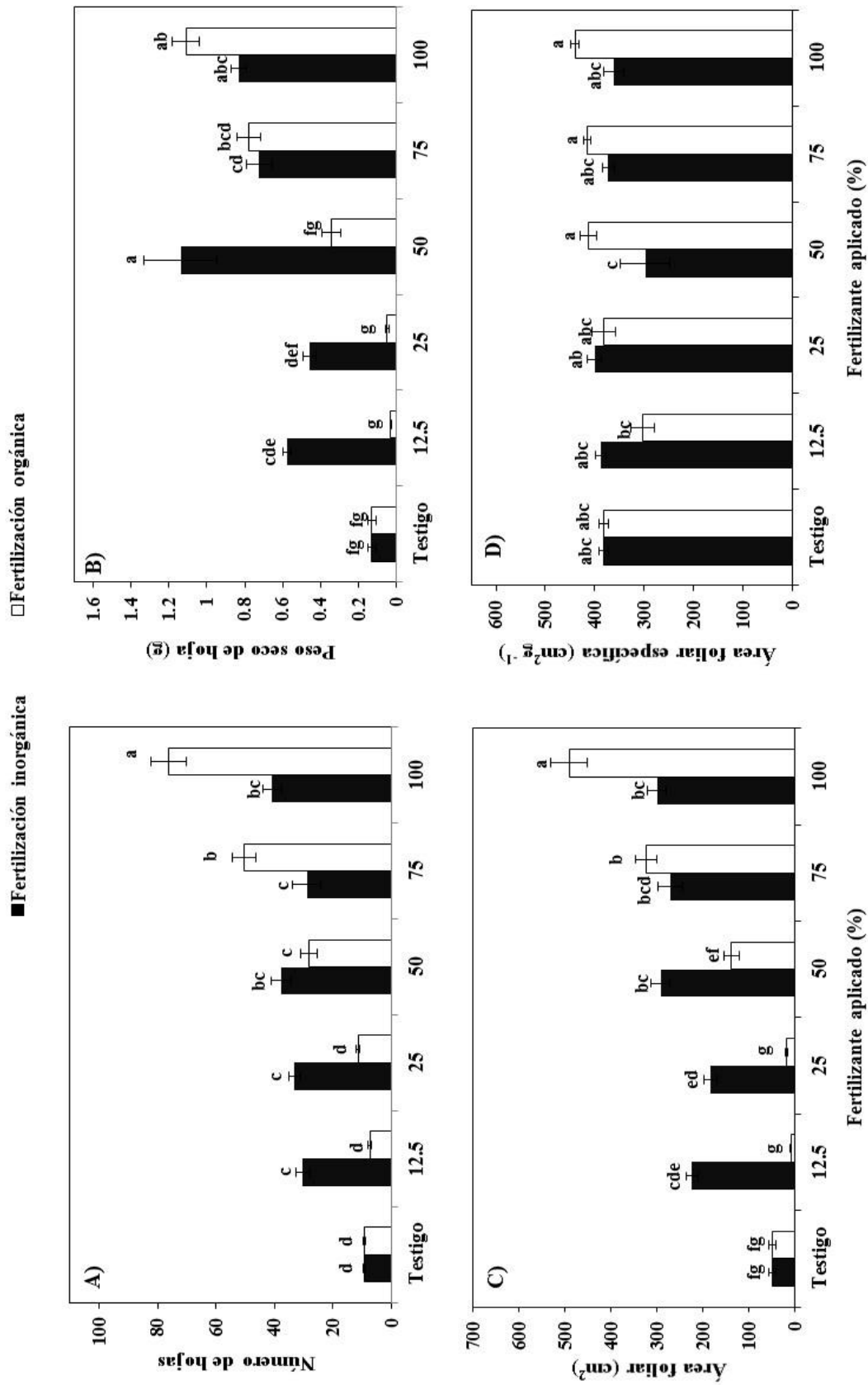
Al considerar la dosificación de ambos tipos de fertilización, las plantas fertilizadas con Floranid al 100% presentaron mayor altura (Figura 4.1A), peso seco total (Figura 4.1B), número de hojas (Figura 4.2A), y área foliar (Figura 4.2C), en comparación con las plantas sometidas a las restantes dosis de fertilizante orgánico (Figura 4.2).

Las hojas de las plantas fertilizadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  al 50%, mostraron mayor peso seco total (Figura 4.2B) en comparación con plantas testigo; sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre las plantas fertilizadas inorgánicamente al 50% con aquellas fertilizadas orgánicamente al 100%. El valor más bajo en el peso seco de hojas se observó cuando las plantas fueron sometidas a fertilización inorgánica al 12.5 y 25%, en comparación con plantas testigo (Figura 4.2B). No se observaron diferencias significativas en el área foliar específica entre las plantas sometidas a los diferentes tratamientos, observándose el mayor valor cuando se fertilizó orgánicamente al 50, 75 y 100%, cuyos valores promedio fueron 413.8, 415, 439.3  $\text{cm}^2$ , respectivamente (Figura 4.2D).

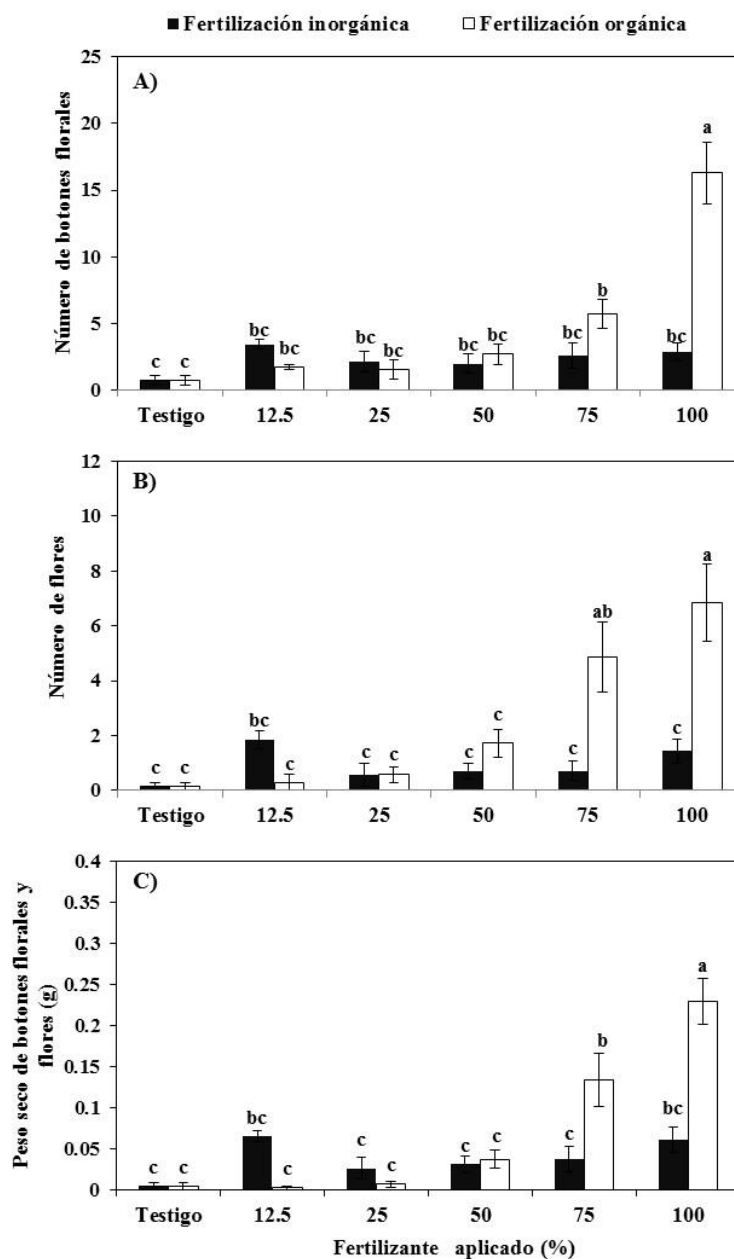
La mayor cantidad de botones florales se presentó en plantas fertilizadas orgánicamente al 100%, seguido de las plantas fertilizadas orgánicamente al 75%, sin presentar diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Figura 4.3A). El mayor número de flores se obtuvo en plantas fertilizadas orgánicamente al 100%, mientras que el menor número de flores fue obtenido en las plantas testigo (Figura 4.3B). El mayor peso seco de flores y botones florales se obtuvo en plantas fertilizadas orgánicamente al 100%, y el menor peso seco se observó en plantas testigo (Figura 4.3C).



**Figura 4.1.** Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y orgánica (Floramid®) en la altura (A) y peso seco total (B) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., a los 70 días.  $n=7$ . Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 4.2.** Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y orgánica (Floramid®) en el número de hojas (A), peso seco de hojas (B), área foliar (C) y área foliar específica (D) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., a los 70 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 4.3.** Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y orgánica (Floramid®) en el número de botones florales (A), número de flores (B) y peso seco de botones florales y flores de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., a los 70 días.  $n=7$ . Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.



#### 4.3.2 Fertilización orgánica e inorgánica en el crecimiento de *Calendula officinalis*

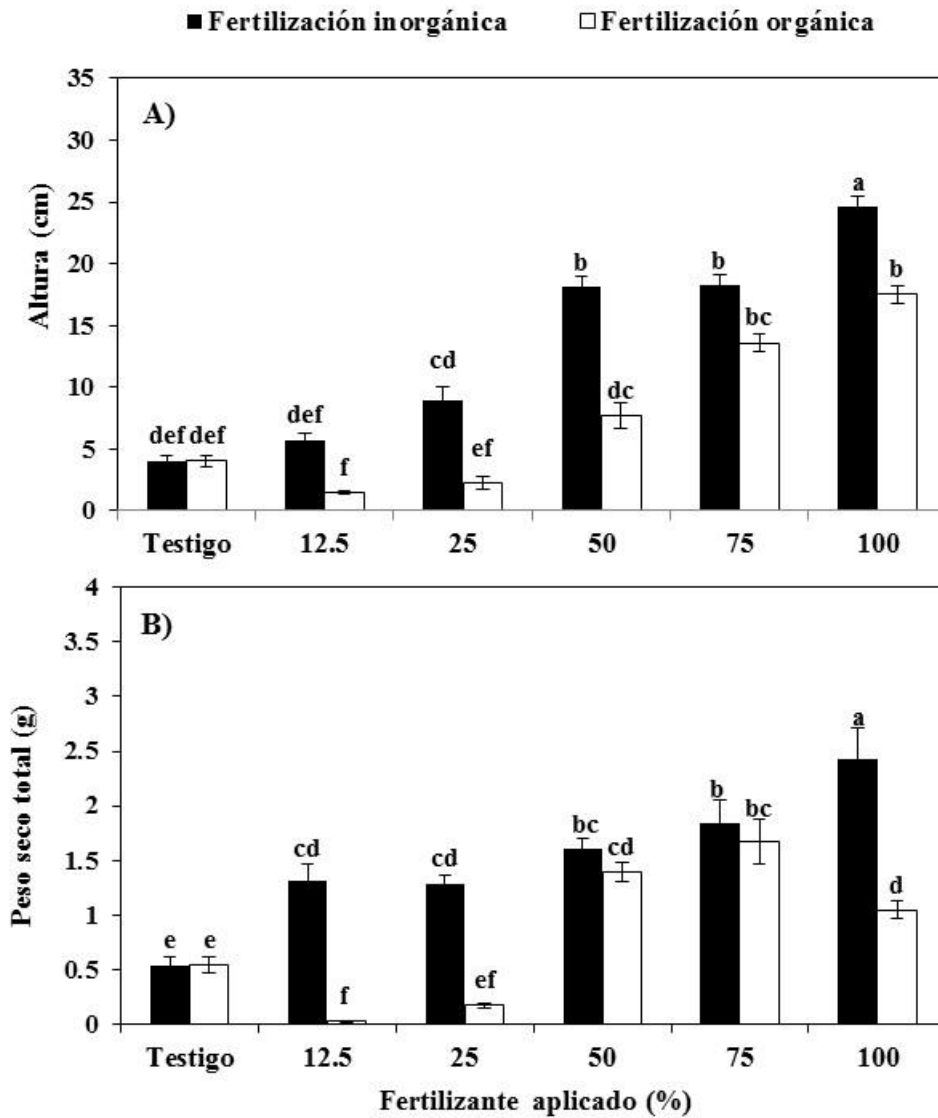
El tipo de fertilización tuvo efecto significativo exclusivamente en las variables número de hojas (29) y altura (13.25), observándose los valores más altos cuando las plantas fueron fertilizadas inorgánicamente (Figura 4.4A).

La aplicación del fertilizante inorgánico promovió el peso seco total de las plantas obteniéndose valores más altos cuando se aplicó el fertilizante al 100% (Figura 4.4B). El valor más bajo para esta variable se observó en plantas testigo. Resultados similares se registraron para el número de hojas (Figura 4.5A) y el área foliar (Figura 4.5C) cuyos valores más altos se observaron cuando las plantas fueron fertilizadas inorgánicamente al 100%.

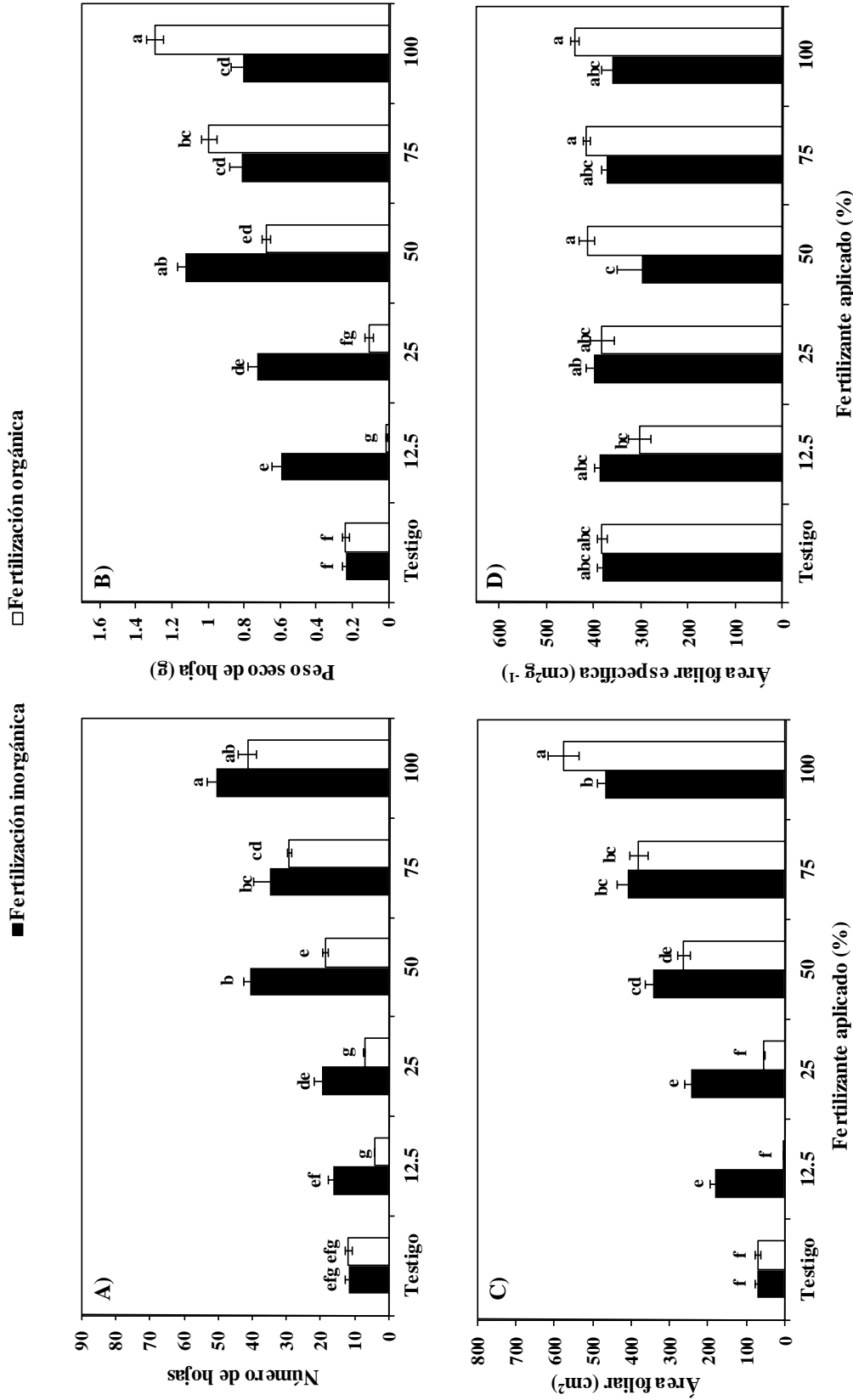
En la variable peso seco de hoja no se observaron diferencias significativas entre plantas con fertilización inorgánica al 50% y la fertilización orgánica al 100%; sin embargo, el valor más alto se presentó cuando las plantas fueron fertilizadas orgánicamente al 100% (Figura 4.5B).

Las plantas fertilizadas orgánicamente al 50, 75 y 100% presentaron el valor más alto en el área foliar específica, y no presentaron diferencia significativa entre ellas. El valor más bajo se observó en plantas fertilizadas inorgánicamente al 50% (Figura 4.5D).

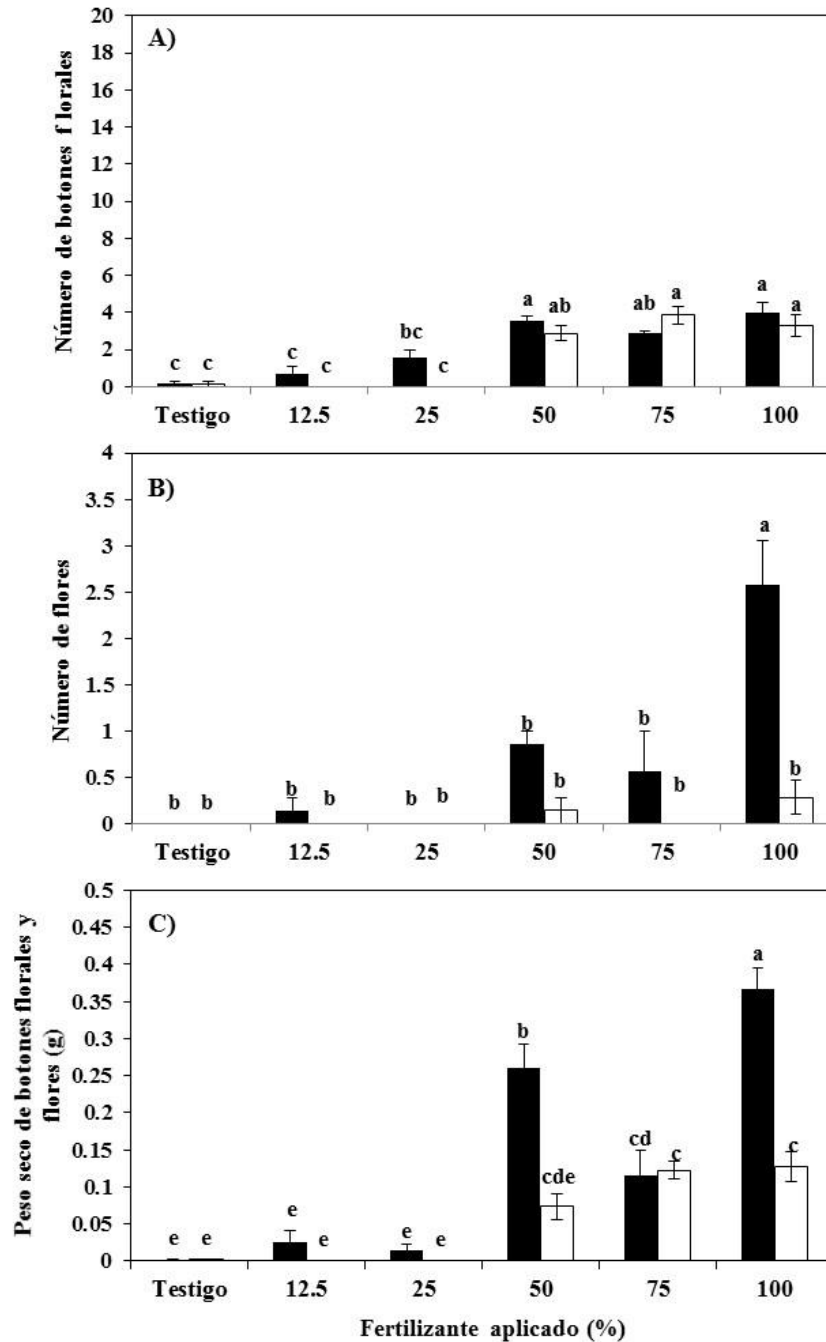
El número de botones florales no mostró diferencias significativas entre las plantas sometidas a los diferentes tratamientos (Figura 4.6A). No obstante, la fertilización inorgánica al 100% estimuló la producción de flores en las plantas (Figura 4.6B). En el peso seco de flores, las plantas que produjeron mayor número de flores también mostraron mayor peso seco (Figura 4.6C).



**Figura 4.4.** Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y orgánica (Floramid®) en la altura (A) y peso seco total (B) de *Calendula officinalis* L., a los 70 días.  $n=7$ . Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 4.5.** Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) y orgánica (Floramid®) en el número de hojas (A), peso seco de hojas (B), área foliar (C) y área foliar específica (D) de *Calendula officinalis* L., a los 70 días.  $n=7$ . Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 4.6.** Efecto de la fertilización nitrogenada inorgánica (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) y orgánica (Floramid®) en el número de botones florales (A), número de inflorescencias (B) y peso seco de botones florales e inflorescencias de *Calendula officinalis* L., a los 70 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos.

#### 4.4. Discusión

La aplicación de fertilizante orgánico produjo mayor crecimiento y biomasa en plantas de *C. roseus*, especialmente con la concentración del 100%. Lo anterior puede ser resultado de la liberación gradual de los nutrientes de la formulación orgánica, lo cual asegura la demanda de los nutrientes de *C. roseus* durante su crecimiento. Se ha documentado que al fertilizar orgánicamente la eficiencia del uso de nitrógeno es mejorada, con lo cual se reduce la pérdida de nitrógeno por lixiviación, misma que es común por la aplicación de fertilizantes de disponibilidad rápida como lo es el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Zhang *et al.*, 1998). Los beneficios de la liberación controlada de nutrientes por fertilizantes orgánicos en comparación con la fertilización inorgánica, se relaciona con: a) mayor eficiencia en el uso de los nutrientes, ya que su disponibilidad se extiende por mayor tiempo; b) disminución de los procesos de lixiviación, fijación y descomposición, lo cual permite aminorar el consumo de fertilizantes y de manera indirecta, reducir sus efectos nocivos al ambiente (Diez *et al.*, 1994); c) reducción del riesgo de fitotoxicidad por acumulación excesiva de sales o por acumulación de nitratos (Anjana y Muhammad, 2007); y d) aporte continuo de nutrientes a largo período, favoreciendo el crecimiento equilibrado y de mejor calidad en las plantas (Ballester-Olmos, 1995).

Fernández-Escobar *et al.* (2004) reportan que plantas de *Olea europaea* L., con aplicación de fertilizantes de liberación controlada (Floranid y Multicote) presentaron mayor longitud del vástago en comparación con las plantas fertilizadas con nitrato de amonio. Estos efectos son similares a los resultados obtenidos en el presente experimento, con la fertilización orgánica al 100% en plantas de *C. roseus*, pues bajo este tipo de fertilización las plantas presentaron mayor altura que el resto de los tratamientos.

El uso de fertilizantes orgánicos era limitado y recomendado exclusivamente para el mantenimiento de céspedes (Zhang *et al.*, 1998); sin embargo, la alta demanda de plantas ornamentales, ha provocado un aumento en su aplicación, generándose con ello, estrategias de fertilización factibles para la producción de estas especies vegetales, como es el caso de la fertilización orgánica (Koller *et al.*, 2014).

*Catharanthus roseus* es una planta medicinal y ornamental que presenta síntomas evidentes ante la deficiencia de nitrógeno, por ejemplo, la disminución en su crecimiento (Marschner, 1993; Logan *et al.*, 1999; Paul y Foyer, 2001), por lo que esta planta requiere de aportes importantes de fertilizante nitrogenado. La eficiencia de un fertilizante se relaciona con la limitada pérdida que puede tener por lavado o por volatilización, así como en una rápida respuesta de crecimiento de las plantas. En este sentido, la aplicación de fertilizantes de liberación lenta como Floranid y Multicote, presenta mínima pérdida de amonio (Fernández-Escobar *et al.*, 2004). El resultado de la presente investigación muestra que al aplicar un fertilizante de liberación lenta como Floranid al 100% se observa un incremento en el crecimiento en plantas de *C. roseus*, lo cual evidencia la eficiencia del uso de este fertilizante orgánico en el crecimiento de esta especie vegetal.

Las plantas con fertilización orgánica presentaron mayor número de hojas y área foliar específica, en comparación con las plantas fertilizadas con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Las plantas con mayor área foliar específica poseen menos rigidez y su calidad nutritiva es superior (Pérez *et al.*, 2004); en contraste, aquellas plantas con menor área foliar específica, generalmente poseen hojas engrosadas, pero tienden a tener mayor longevidad debido a reforzamientos estructurales que las hace menos susceptibles a condiciones adversas (Westoby *et al.*, 2000; Wright y Cannon. 2001). Con base en lo anterior, se puede asociar la disminución en el peso

seco de hoja con la reducción en el área foliar (Saidana *et al.*, 2009) y deducir que las plantas fertilizadas orgánicamente podrían tener mayor calidad nutritiva.

Las plantas de *C. roseus*, fertilizadas inorgánicamente, además de presentar valores bajos en el peso seco de hoja, también presentaron menor área foliar en comparación con las plantas fertilizadas orgánicamente. Lo anterior indica que la fertilización inorgánica produjo plantas con hojas pequeñas y con menor peso.

El nitrógeno es un elemento importante para la producción de flores en plantas ornamentales (Higaki *et al.*, 1992; Dufour y Gueirin, 2003). Para *C. roseus*, la aplicación del fertilizante orgánico garantizó un suministro adecuado de nitrógeno, produciendo mayor número de flores y botones florales en comparación con las plantas fertilizadas inorgánicamente (Figura 4.6AB).

Por otro lado, se ha reportado que la especie de *Calendula officinalis* es poco exigente con la calidad nutrimental de los suelos donde es sembrada, aunque, requiere de un aporte alto de contenido de materia orgánica para su adecuado desarrollo y producción de metabolitos secundarios (Araujo *et al.*, 2009). No obstante, Borella *et al.* (2011) reportan que plantas de *C. officinalis* ante la aplicación de fertilizante inorgánico o materia orgánica, no presentaron diferencias en el número y peso seco de las flores, así como en el peso seco total, por lo que la incorporación de materia orgánica no garantiza la estimulación del crecimiento vegetal en plantas de *C. officinalis*.

Bajo las condiciones establecidas para este experimento se tiene que la fertilización inorgánica favoreció en el incremento del número y peso seco de flores, así como el peso seco total, en comparación con las plantas a las que se les aplicó fertilizante orgánico. De ahí que independientemente de la naturaleza del fertilizante, puede ser que para esta especie el factor crucial sea el aporte de nutrientes, en especial el nitrógeno. Numerosos estudios (Golcz

*et al.*, 2006; Dzida y Jarosz, 2006; Biesiada y Kuś 2010) han demostrado que la fertilización con nitrógeno juega un papel importante en la determinación de los rendimientos en diferentes plantas medicinales y que ante la deficiencia de nitrógeno se puede evidenciar con la reducción de su crecimiento en la parte aérea. En el caso de la raíz, la ausencia de nitrógeno suele provocar mayor volumen radical y producción de raíces finas, para aumentar la zona de exploración en busca de dicho nutrimento (Zhang *et al.*,1998; Boussadia *et al.*,2010).

Para *C. officinalis*, Bielski y Szwejkowska (2013) plantean que la fertilización nitrogenada tiene un efecto significativo en esta especie vegetal al evaluar las variables altura, número y peso seco de las flores. Por su parte, Król (2011) a través de sus resultados muestra que, dependiendo de la dosis de nitrógeno, la floración y número de flores pueden variar. Además, reporta que el peso seco total aumenta significativamente al aplicar 80 kg de N por ha<sup>-1</sup>, no obstante, a 120 o 160 kg de N por ha<sup>-1</sup> no hubo un incremento en el valor promedio de la variable.

Los resultados sugieren que para el cultivo de *C. roseus* y *C. officinalis* se debe elegir el tipo de fertilización, así como una concentración adecuada. Análogamente, las plantas de *Panax quinquefolius* L. (ginseng) mostraron menor acumulación de materia seca por la aplicación de una tasa baja de fertilización nitrogenada. Lo anterior denota que los requerimientos de nitrógeno son bajos, por parte de *P. quinquefolius* (Beyaert, 2006). Al conocer la dosis de nitrógeno necesaria para el cultivo de *C. roseus* y *C. officinalis* se pueden reducir los costos de producción por parte del agricultor, pero a la vez, disminuir los impactos negativos del sobreuso de fertilizantes (Muni Ram *et al.*, 1997).



#### 4.5. Conclusiones

Para el cultivo de *C. roseus* y *C. officinalis* se debe elegir el tipo de fertilización de nitrogenada, así como una concentración conveniente. Las plantas de *C. roseus*, bajo las condiciones del presente experimento, respondieron significativamente a la fertilización orgánica aplicada al 100%, garantizando obtener plantas de mayor crecimiento y más vigorosas. La fertilización con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  en las concentraciones utilizadas para este estudio, no mostró un efecto significativo en el crecimiento de las plantas de *C. roseus*. Por el contrario, para el caso de *C. officinalis*, la fertilización inorgánica con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  favoreció su crecimiento a una concentración de 16 mM. Por lo tanto, se concluye que la respuesta en el crecimiento ante la fertilización depende de la especie vegetal y del tipo de fertilizante aplicado, puesto que para este estudio *C. roseus* respondió mejor en las variables evaluadas ante la fertilización orgánica y *C. officinalis* ante la fertilización inorgánica.

## CAPÍTULO V

### **Efecto de la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el crecimiento de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y *Calendula officinalis* L.**

#### **Resumen**

Se evaluó el efecto de cinco cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal y su combinación, en el crecimiento de dos plantas medicinales con propiedades anticancerígenas, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y *Calendula officinalis* L., bajo condiciones de invernadero. Plántulas con quince días de crecimiento fueron trasplantadas e inoculadas con 5 mL de inóculo bacteriano precedente de las siguientes cepas: P61 (*Pseudomonas tolaasii*), R-44 (*Bacillus pumilus*), OLS-SF5 (*Pseudomonas* sp.), A-46 (*Pseudomonas tolaasii*), y BSP1.1 (*Paenibacillus* sp.). Además, se incluyó un tratamiento que contenía a las cinco cepas empleadas, al cual se le denominó mixto. Después de 50 días, las plantas fueron cosechadas para evaluar el número de hojas, altura, área foliar, biomasa seca total (hojas, tallo y raíces) y la eficiencia fotoquímica en hojas. Se observó una respuesta diferencial a la inoculación bacteriana en ambas especies vegetales. Las plantas de *C. roseus* presentaron mejores resultados en los siguientes parámetros: altura, área foliar, peso seco de hoja y total al ser inoculadas con la bacteria *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5). Para *C. officinalis*, el uso del inóculo mixto produjo incrementos significativos en altura, área foliar, en el peso seco de hoja y total; no obstante, la cepa OLS.SF5 produjo mayor efecto en la altura de las plantas. Para ambas especies medicinales, la eficiencia fotoquímica no fue afectada por la inoculación bacteriana.

**Palabras clave:** *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, planta medicinal, crecimiento.

## CHAPTER V

### **Effects of plant growth promoting rhizobacteria on *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and *Calendula officinalis* L.**

#### **Abstract**

The effects of five strains of plant growth promoting rhizobacteria and their combination were evaluated on growth responses of two medicinal plants with antineoplastic properties, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and *Calendula officinalis* L., under greenhouse conditions. Fifteen-days old seedlings were transplanted and inoculated with 5 mL of bacterial inocula from the following strains: P61 (*Pseudomonas tolaasii*), R-44 (*Bacillus pumilus*), OLS-SF5 (*Pseudomonas* sp.), A-46 (*Pseudomonas tolaasii*), and BSP1.1 (*Paenibacillus* sp.). In addition, a treatment with the mix of the five strains was also included. After 50 days, plants were harvested for evaluating the number of leaves, plant height, leaf area, total dry weight (leaves, stems, and roots), and the photochemical efficiency in leaves. Differential responses were achieved due to the bacterial inoculation in both plant species. Plants of *C. roseus* had increased height, leaf area, and leaf and total dry weight when inoculated with *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5). For *C. officinalis*, the mixture of the five bacteria resulted in significant increases on plant height, leaf area, and leaf and total dry weight; nevertheless, the strain OLS.SF5 enhanced the plant height. The photochemical efficiency in both plant species, was unaffected by bacterial inoculation.

**Key words:** *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, medicinal plants, growth.

## 5.1. Introducción

El suelo concentra gran diversidad de microorganismos que cumplen funciones fundamentales en él. Así mismo, el número de interacciones planta-microorganismo es numerosa; entre estas asociaciones están las simbióticas, neutrales o parasíticas, cuyo desarrollo puede estar regulado por las condiciones del hábitat como el estado nutricional del suelo, los mecanismos de defensa de las plantas, así como las características propias del microorganismo involucrado (Parmar y Dufresne, 2011).

Un ejemplo de un estado asociativo es el que se establece entre las plantas y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales son definidas como bacterias que colonizan las raíces de las plantas y que estimulan su crecimiento (Ahemad y Saghir, 2011). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se clasifican en función de su localización en la rizósfera: aquellas que se localizan en la rizósfera, en el rizoplano o en los espacios entre las células de la corteza de la raíz se denominan bacterias promotoras del crecimiento vegetal extracelulares, y aquellas que existen en el interior de las células de la raíz, generalmente en estructuras nodulares especializadas, se clasifican como bacterias promotoras del crecimiento vegetal intracelulares (Gray y Smith, 2005).

Los mecanismos bacterianos para promover el crecimiento en las plantas con las que se asocian pueden ser directos o indirectos (Glick, 2012). Entre los mecanismos directos se pueden mencionar la fijación de nitrógeno atmosférico (Kloepper, 1997; Tilak *et al.*, 2005; Bashan y Bashan, 2005), la producción y liberación de sideróforos, la solubilización de fosfato (Kloepper, 1997; Rodriguez y Fraga, 1999; Bashan y Bashan, 2005), síntesis y liberación de fitohormonas (Frankenberger y Arshad, 1995; Kloepper, 1997; Bashan y Bashan, 2005), entre otras. La promoción indirecta está basada principalmente en la

reducción o prevención del efecto perjudicial por fitopatógenos, usualmente por hongos o nemátodos (Kloepper, 1997; Tilak *et al.*, 2005).

Aproximadamente del 2 al 5 % de las bacterias del suelo son promotoras del crecimiento vegetal (Antoun y Prevost, 2005), destacando los géneros *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* (Tilak *et al.*, 2005; Bashan y Bashan, 2005; Gómez-Merino *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de que son varias especies bacterianas las que mejoran el crecimiento vegetal y controlan los patógenos, las especies bacterianas dominantes en la comunidad de bacterias promotoras del crecimiento son *Pseudomonas* y *Bacillus*, las cuales han sido ampliamente estudiadas porque mejoran evidentemente el crecimiento de las plantas y su salud (Chen *et al.*, 2006; Velineni y Brahma Prakash, 2011; Rashid *et al.*, 2012). Ryu *et al.* (2003) registraron que algunas cepas de bacterias promotoras de crecimiento vegetal, entre ellas, *Bacillus subtilis* producen compuestos volátiles, en particular, 2,3-butanodiol y acetoina, sustancias involucradas en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Así mismo se ha reportado el aumento en el área foliar, contenido de clorofila, biomasa total, ante la inoculación bacteriana en plantas medicinales (Shrivastara *et al.*, 2015).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de cinco cepas bacterianas en el crecimiento en plantas *Catharanthus roseus* y *Calendula officinalis*, plantas utilizadas en la medicina tradicional.

## **5.2. Materiales y métodos**

### **5.2.1. Activación de las cepas bacterianas y preparación de inóculos.**

Para la elaboración de los inóculos bacterianos se procedió a la activación de las cepas P61 (*Pseudomonas tolaasii*), R44 (*Bacillus pumilus*), OLS-SF5 (*Pseudomonas* sp.), A46 (*Pseudomonas tolaasii*) y BSP1.1 (*Paenibacillus* sp.), cepas pertenecientes a la colección microbiana del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados. Las bacterias P61, R44 y A46 fueron obtenidas de la rizósfera de cultivos de *Solanum tuberosum* L., del Valle de Toluca, Estado de México, la bacteria OLS-SF5 fue aislada de carpóforos del hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor*, colectados de un bosque de Oyamel del Monte Tlaloc y la cepa bacteriana BSP1.1 fue aislada de suelo andosol localizados en Villa de Allende, Estado de México.

Las bacterias fueron sembradas por estría cruzada en cajas de Petri, que contenían medio agar nutritivo sólido. Una vez sembradas las bacterias, las cajas fueron incubadas a 28 °C, durante tres días. Posteriormente las cinco cepas bacterianas fueron sembradas en botellas de vidrio con 50 mL de caldo nutritivo (por cuadruplicado). Las botellas fueron colocadas en agitación a 180 rpm durante tres días. Transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados a las cepas bacterianas con agua destilada estéril. Para lo cual, el caldo nutritivo que contenía a cada cepa bacteriana fue eliminado colocando el inóculo en tubos tipo falcon y centrifugados a 7000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, y se resuspendió el precipitado bacteriano en agua destilada estéril utilizando un vortex; este procedimiento se repitió una vez más.

De cada uno de los inóculos se tomó una muestra, la cual fue diluida seriadamente, transfiriendo 100 µL de la muestra a 900 µL de agua destilada estéril, mezclando adecuadamente. Este procedimiento se repitió hasta obtener una dilución  $10^{-7}$ . Posteriormente se añadió 1 mL de esta dilución a la caja de Petri que contenía agar nutritivo extendiéndolo en la superficie de la placa con una varilla de vidrio (por triplicado). Las cajas

de Petri se incubaron a 28 °C durante tres días, y posteriormente se realizó el conteo de las colonias formadas.

#### 5.2.2. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y *Calendula officinalis* L.

Las plántulas de *Catharanthus roseus* y *Calendula officinalis* (adquiridas en la empresa Plántulas de Tetela S. de R. L. de C. V., Cuernavaca, Morelos) con tres y dos semanas de germinación, respectivamente, fueron llevadas al invernadero para ser trasplantadas a macetas que contenían 250 g de sustrato constituido por vermiculita, turba y agrolita (1:1:2 v/v/v) previamente esterilizado. La temperatura fue registrada con una miniestación climática (data logger watchdog modelo 100, Spectrum® Technologies Inc., Illinois, USA). La temperatura promedio máxima y mínima (°C) a fue de  $27.89 \pm 1.66$  y  $14.1 \pm 1.23$ , respectivamente.

En cada una de las unidades experimentales se colocaron, con pipetas de vidrio previamente esterilizadas, 5 mL de inóculo de las cepas bacterianas, de acuerdo al tratamiento correspondiente. Además, se incluyó un tratamiento que contenía las cinco cepas bacterianas al cual se le denominó cultivo mixto; en las unidades experimentales destinadas a este tratamiento también se aplicaron 5 mL del inóculo. Para cada tratamiento se consideraron siete repeticiones.

#### 5.2.3. Variables evaluadas

Después de 50 días, las plantas fueron cosechadas para proceder a la evaluación del número de hojas, altura, área foliar, biomasa seca total (hojas, tallo y raíces), y la eficiencia fotoquímica en hojas, la cual fue medida por fluorescencia (Opti-Sciences, Modelo OS-30p+, USA).

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

#### 5.2.4. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, incluyendo siete tratamientos con siete repeticiones cada uno. Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2006), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### 5.3. Resultados

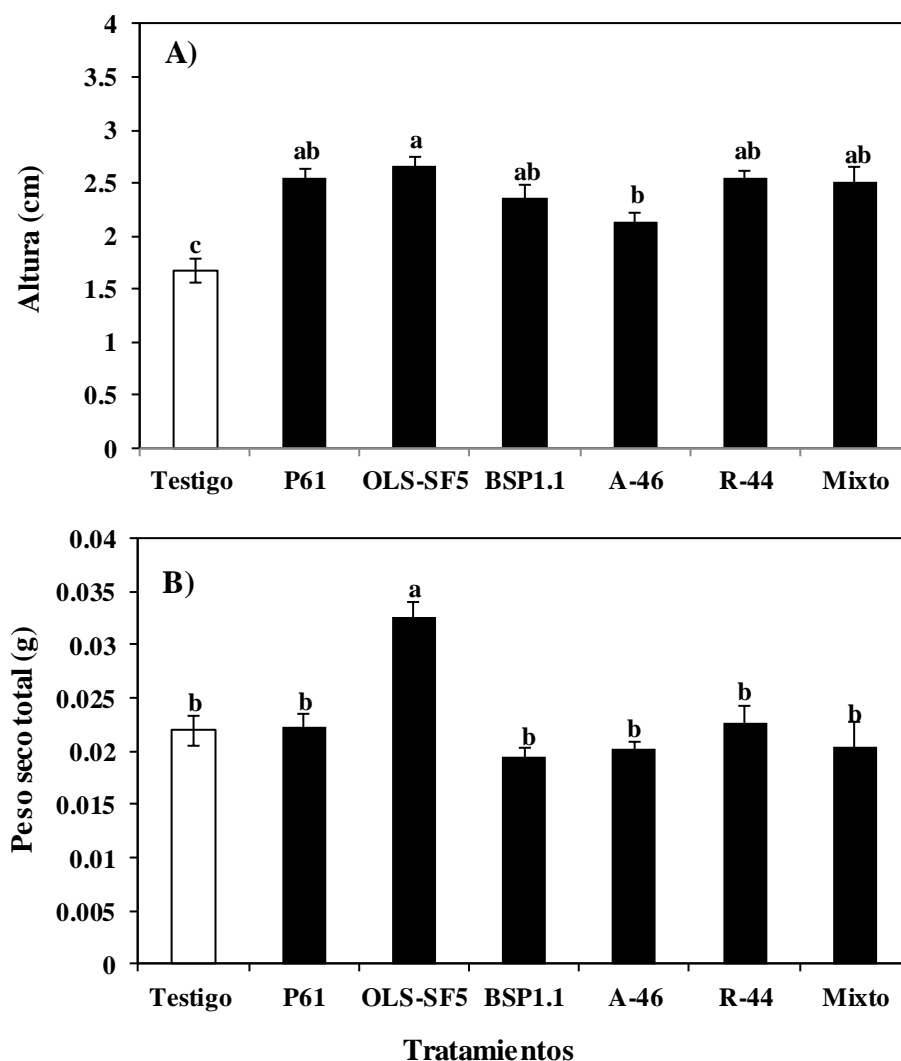
#### 5.3.1. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Las plantas de *C. roseus* inoculadas con la cepa bacteriana OLSF-SF5, presentaron el mayor valor promedio en la altura, en comparación con las plantas del resto de los tratamientos (Figura 5.1 A). Los valores más bajos fueron registrados en plantas que no fueron sometidas a la inoculación.

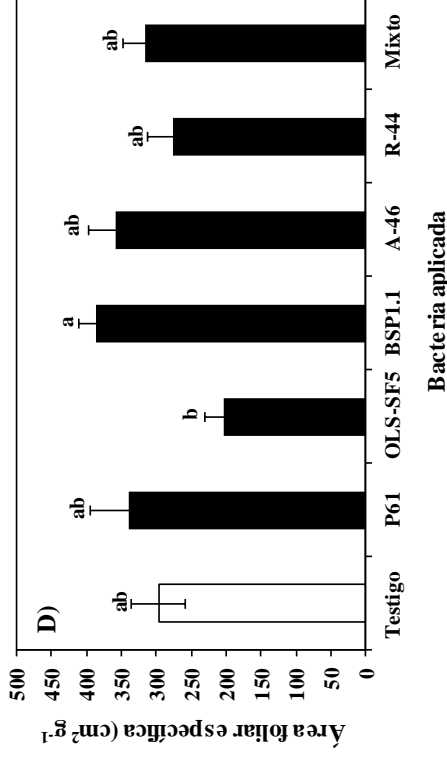
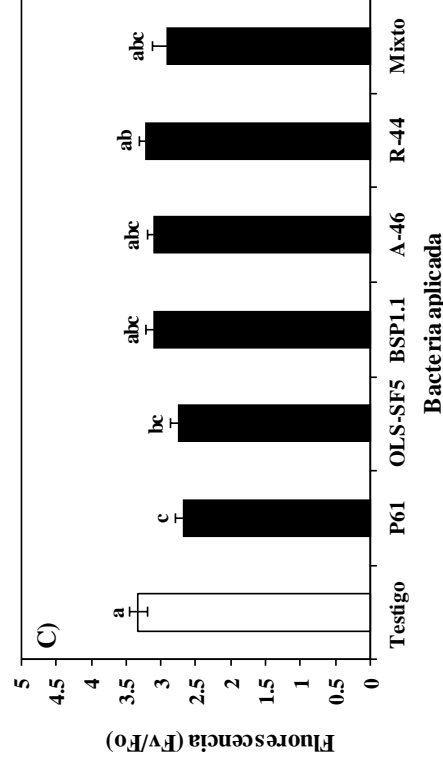
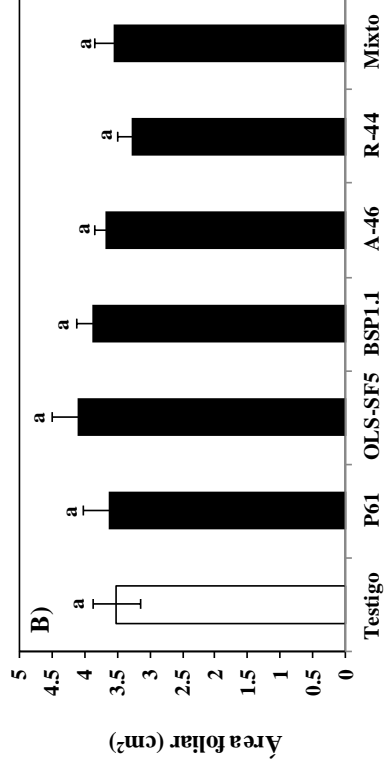
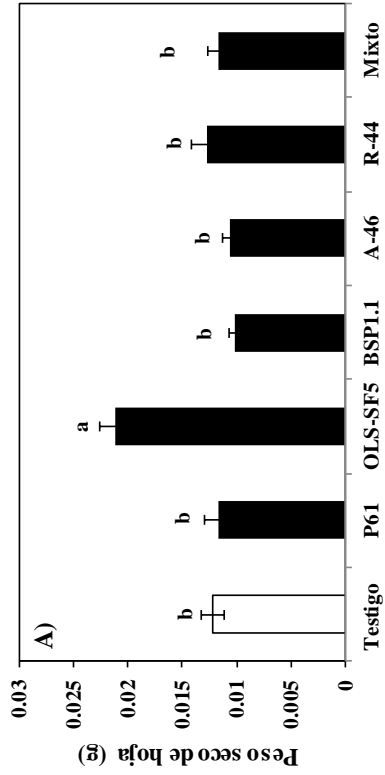
El peso seco total en plantas de *C. roseus* incrementó por efecto de la inoculación de la cepa bacteriana OLS-SF5 (Figura 5.1B). Las otras cepas bacterianas empleadas no tuvieron efecto significativo en el peso seco de total de la planta, cuyos valores fueron estadísticamente iguales a las plantas sin la inoculación bacteriana. Con respecto al peso seco foliar, se observó mayor peso en las hojas obtenidas de plantas inoculadas con la cepa OLS-SF5, en comparación con el resto de los tratamientos. Las plantas inoculadas con las cuatro



cepas restantes, así como, con el inóculo mixto no presentaron diferencias significativas en el peso seco de hojas, con respecto a plantas sin inocular (Figura 5.2A).



**Figura 5.1.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en la altura (A), y peso seco total en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R-44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas* sp.; A-46: *Pseudomonas tolaasii* y BSP1.1: *Paenibacillus* sp.; Mixto: Combinación de todas las cepas.



**Figura 5.2.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), eficiencia fotoquímica (C) y área foliar específica (D) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., a los 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R-44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas sp.*; A-46: *Pseudomonas tolaasii* y BSP1.1: *Paenibacillus sp.*; Mixto: Combinación de todas las cepas.

Las plantas de *C. roseus* inoculadas con las cepas bacterianas no presentaron diferencias significativas en el área foliar (Figura 5.2B) en comparación con plantas no inoculadas. Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa bacteriana OLS-SF5 mostraron el mayor valor de área foliar en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 5.2B).

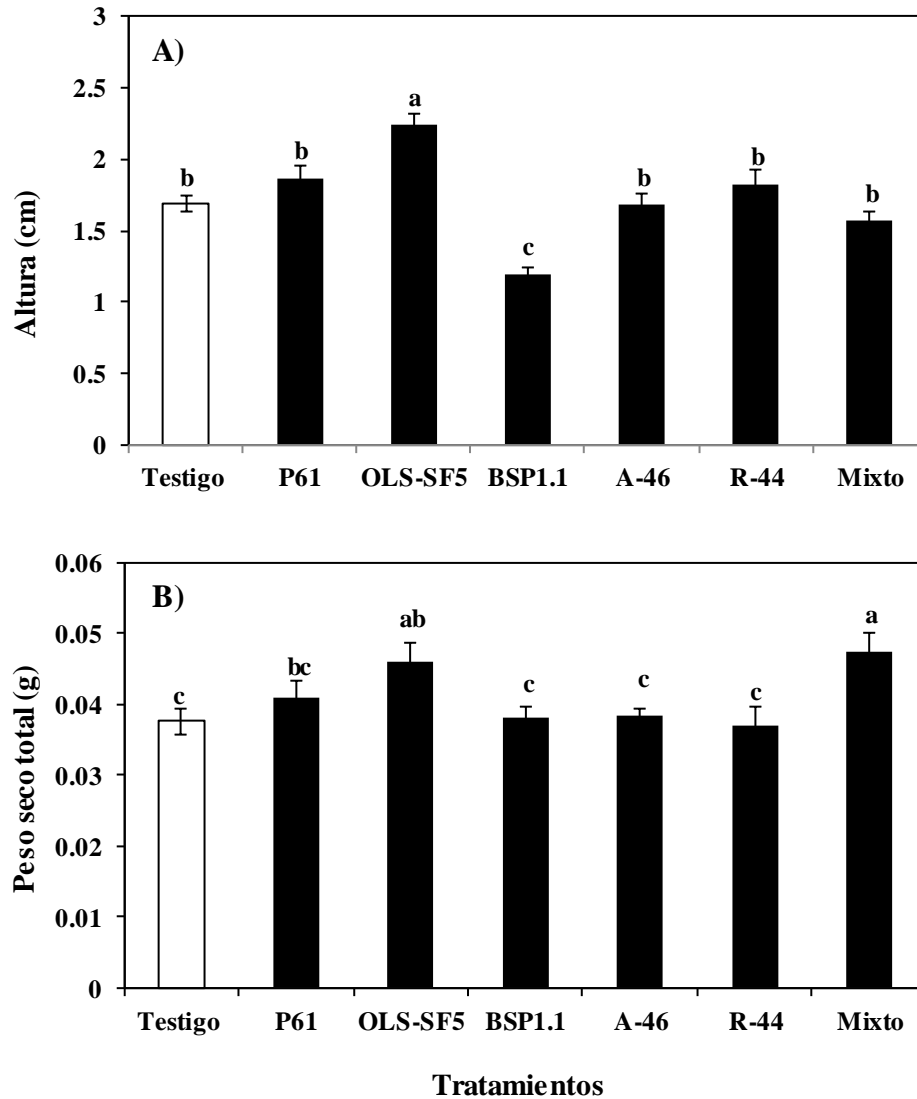
Al determinar la eficiencia fotoquímica del fotosistema II en hojas, se observó que las plantas sin inocular presentaron el mayor valor en comparación con los valores del resto de los tratamientos (Figura 5.2C). Sin embargo, estadísticamente no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos.

En la variable área foliar específica el valor más alto se registró cuando las plantas fueron inoculadas con la cepa bacteriana BSP1.1 (Figura 5.2D). Sin embargo, estadísticamente no se apreciaron diferencias significativas con los valores obtenidos de las plantas de los tratamientos P61, A46, R44, mixto y testigo. El valor más bajo para esta variable se registró en las plantas inoculadas con la cepa OLS-SF5 (Figura 5.2D).

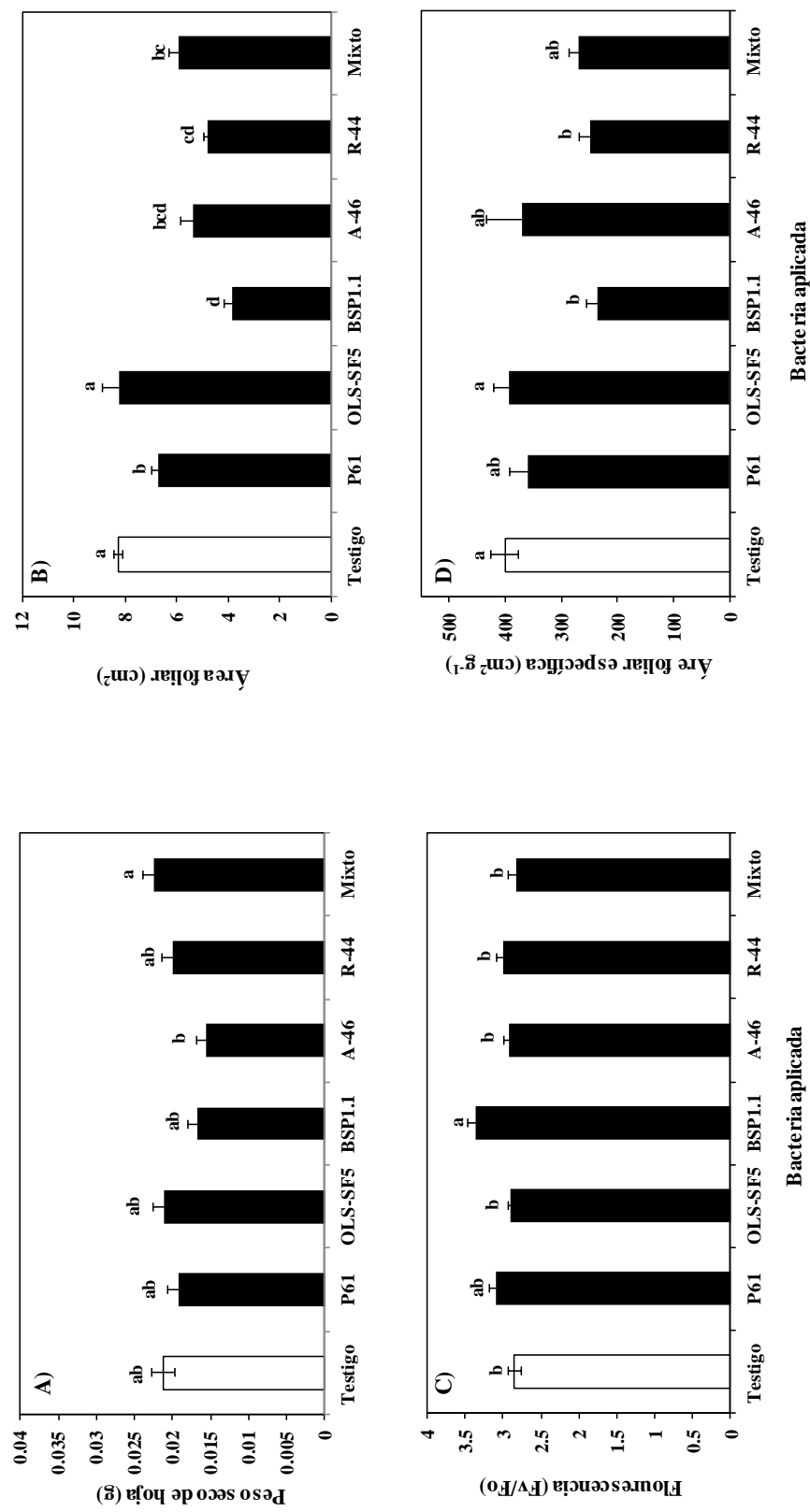
### 5.3.2. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de *Calendula officinalis* L.

Las plantas de *C. officinalis* inoculadas con la cepa bacteriana OLS-SF5 mostraron el valor promedio más alto en altura, comparando los valores obtenidos de las plantas inoculadas con las otras cepas bacterianas (Figura 5.3A). La menor altura la presentaron las plantas inoculadas con la cepa BSP1.1.

El peso seco total de las plantas incrementó con la inoculación del cultivo mixto. No obstante, entre el valor obtenido de las plantas sometidas al tratamiento mixto y al inoculado con la cepa OLS-SF5 no se aprecian diferencias significativas (Figura 5.3B). Las cepas P61, BSP1.1, A-46, R-44 inoculadas individualmente, no promovieron el peso seco de la planta



**Figura 5.3.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en la altura (A) y peso seco total en plantas de *Calendula officinalis* (L.) G. Don., después de 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R-44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas* sp.; A-46: *Pseudomonas tolaasii*, y BSP1.1: *Paenibacillus* sp.; Mixto: Combinación de todas las cepas.



**Figura 5.4.** Efecto de la inoculación de cepas bacterianas en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), eficiencia

fotofluorescencia (C) y área foliar específica (D) de *Calendula officinalis* L., a los 50 días. n=7. Medias  $\pm$  error estándar.

Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.

Simbología: P61: *Pseudomonas tolaasii*; R-44: *Bacillus pumilus*; OLS-SF5: *Pseudomonas* sp.; A-46: *Pseudomonas tolaasii*, y BSP1.1: *Paenibacillus* sp.; Mixto: Combinación de todas las cepas.

cuyo valor promedio fue de 0.04 g, el cual es estadísticamente igual al de plantas sin inocular (Figura 5.3B).

La inoculación del cultivo mixto produjo el valor promedio más alto del peso seco de hojas (Figura 5.4A). En contraste, el menor peso seco de hojas se observó en las plantas inoculadas con la cepa A-46 (Figura 5.4A).

El área foliar de las plantas no inoculadas presentaron el valor más alto (8.2 cm<sup>2</sup>), al igual que las plantas inoculadas con la cepa OLS-SF5 (Figura 5.4B). Las plantas inoculadas con la cepa BSP1.1 presentaron el valor más bajo para esta variable (Figura 5.4B).

El área foliar específica fue mayor cuando las plantas de *C. officinalis* fueron sometidas a la inoculación con la cepa OLS-SF5, y en las plantas testigo (Figura 5.4D). Por su parte, en plantas inoculadas con las cepas P61, BSPI.1, A-46 y el cultivo mixto no mostraron diferencia significativa entre sí.

La eficiencia fotoquímica en plantas de *C. officinalis* fue mayor en plantas inoculadas con la cepa BSP1.1; sin embargo, no se observaron diferencias significativas con las plantas inoculadas con la cepa P61, ni con el tratamiento sin inocular (Figura 5.4C).

#### **5.4. Discusión**

La respuesta a la inoculación en plantas de *C. roseus* y *C. officinalis* con las cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal fue diferencial. Los mejores resultados en altura, área foliar, se presentaron en plantas inoculadas con la cepa bacteriana OLS-SF5.

Las cepas OLS-SF5, P61 y A-46 son bacterias que pertenecen al mismo género. No obstante, su efecto en ambas plantas fue diferente, por lo que la cualidad de una bacteria para favorecer en el crecimiento vegetal puede posiblemente estar relacionado con la afinidad de la bacteria con la planta a la que se asociará (Berg y Smalla, 2009; Drogue *et al.*, 2012). Sin

embargo, esta posible inferencia se ha discutido principalmente en el caso de bacterias cuyos mecanismos empleados son indirectos, es decir, relacionados con el control biológico o para aquellas bacterias que auxilian en el establecimiento de la simbiosis micorrízica, pero no, cuando se consideran por su cualidad en la estimulación del crecimiento vegetal (Berg y Smalla, 2009; Frey-Klett *et al.*, 2007; Drogue *et al.*, 2012). No obstante, actualmente se reconoce que los exudados de las raíces tienen un papel importante en la selección y enriquecimiento de las bacterias localizadas en la rizósfera; así mismo, el desarrollo de la comunidad bacteriana depende de la naturaleza y las concentraciones de los exudados orgánicos, y de la correspondiente capacidad de las bacterias para utilizar estos compuestos como fuentes de energía (Curl y Truelove, 1986; Tilak *et al.*, 2005; Saharan y Nehra, 2011). Entre los mecanismos implicados en el reconocimiento entre planta-bacteria se tiene la quimiotaxis, un factor que posiblemente contribuyó en gran medida en la afinidad de asociarse con la raíz de ambas plantas (Lugtenberg *et al.*, 2001; Hardoin *et al.*, 2001). En este sentido, se ha reportado que la quimiotaxis tiene una respuesta diferencial entre las especies bacterianas (Hardoin *et al.*, 2001; Drogue *et al.*, 2012). Por ejemplo, en la interacción tomate-*Pseudomonas fluorescens*, los ácidos orgánicos exudados por la raíz son importantes quimioatrayentes, mientras que los carbohidratos y aminoácidos para el caso de *Bacillus pumilus*-arroz (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2003).

Hardoin *et al.* (2001) reportan que la aparente especificidad en la interacción planta-microorganismo probablemente está relacionada con los requerimientos nutricionales tanto de las plantas como de las bacterias; en cada uno de estos casos, la quimiotaxis estaría dirigida probablemente hacia un recurso en particular, determinando entonces, la especificidad de la interacción.

Por otro lado, el género *Pseudomonas*, ha sido ampliamente estudiado por promover el crecimiento de las plantas. La producción de sideróforos se ha asociado con diversas bacterias de vida libre, en especial del grupo de las *Pseudomonas* (Zdor y Anderson, 1992; Loredó-Osti *et al.*, 2004). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular secretados por las raíces y por las bacterias que actúan capturando elementos como el hierro, en la rizósfera. En un estudio realizado con *Pseudomonas*, se observó un incremento en el rendimiento de cebada, maíz y trigo; los mecanismos que explican este aumento en rendimiento se atribuyeron a su capacidad para producir pioverdina, un sideróforo fluorescente que es producido por la bacteria en condiciones de deficiencia de hierro como agente inhibidor de varios hongos fitopatógenos. Por lo anterior, se propuso que la producción de pioverdina puede ser estratégica en la rizósfera, no sólo para el abastecimiento de hierro, sino también, como una defensa contra otros microorganismos (Höfte *et al.*, 1991; Loredó-Osti *et al.*, 2004).

Las plantas de *C. roseus* presentaron incrementos en sus variables al ser inoculadas con la cepa bacteriana OLS-SF5. Lo anterior concuerda con lo expuesto por Carrillo-Castañeda *et al.* (2002) quienes, al inocular independientemente 18 cepas bacterianas en plantas de *Medicago sativa*, observaron un incremento en las variables de crecimiento. Así mismo, otros reportes describen que la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal incrementa hasta 40% la biomasa de la planta en comparación con plantas no inoculadas (Marasco *et al.*, 2013; Zaefarian *et al.*, 2012).

Para *C. officinalis*, la inoculación bacteriana individual sólo estimuló su altura y área foliar; no obstante, el uso del inóculo mixto provocó un incremento en el peso seco total y de las hojas, así como en el área foliar específica. La ventaja de utilizar inóculos mixtos, ya ha sido reportada, dicha ventaja se atribuye a que en un inóculo mixto existe mayor variedad de



microorganismos con diferentes estrategias de colonización, lo cual asegura la asociación (De la Rosa-Mera *et al.*, 2012). La composición de los inóculos mixtos no solamente va dirigida a organismos de la misma especie, lo cual influye en el uso eficiente de fertilizantes, permitiendo, en algunas ocasiones, que la aplicación del fertilizante se reduzca (Saharan y Nehra, 2011). Por ejemplo, plantas de *Solanum lycopersicum* al ser inoculadas con una mezcla de inoculantes microbianos que contenían las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumilus*, disminuyeron en su cultivo la aplicación de fertilizante inorgánico del 100 al 75% (Adesemoye *et al.*, 2009).

Por otro lado, las plantas se adaptan al establecimiento de la asociación bacteriana no afectando la eficiencia del fotosistema II y la disipación térmica de la energía absorbida (Maxwell y Johnson, 2000; González *et al.*, 2008). Resultados similares fueron obtenidos por del Amor y Porras (2009), quienes, al evaluar la influencia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, *Azospirillum brasilense* y *Pantoea dispersa* en plantas de *Capsicum annuum* L. bajo suministro limitado de nitrógeno, las plantas no evidenciaron afección en el fotosistema II por la presencia de dichas bacterias. En contraste plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *Pseudomonas thivervalensis* (cepa MLG45) mostraron además de la reducción en su crecimiento, la disminución en la tasa de fotosíntesis (Cartieux *et al.*, 2003; van Loon, 2007).

## **5.5. Conclusiones**

La respuesta de plantas de *C. roseus* y *C. officinalis* a la inoculación con diferentes cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal fue diferencial, respondiendo posiblemente a la afinidad a colonizar, y por consiguiente a estimular el crecimiento de un tipo en particular de planta. Las plantas de *C. roseus* evidenciaron mejor respuesta en su

desarrollo vegetal en las variables altura, peso seco total, peso seco de hoja y área foliar ante la inoculación con la cepa OLS-SF5. En plantas de *C. officinalis* inoculadas con la cepa OLS-SF5 mostraron mayor altura y área foliar. Sin embargo, en las variables peso seco total, peso seco de hoja y área foliar específica el valor más alto se obtuvo al aplicar el inóculo mixto. Para ambas plantas la inoculación con las cepas utilizadas en este experimento no refleja afección en la eficiencia fotoquímica en el fotosistema II.

## CAPÍTULO VI.

### **Inoculación bacteriana y fertilización orgánica e inorgánica en la actividad biológica del extracto metanólico de hojas de *Catharanthus roseus* y de flores de *Calendula officinalis* evaluado en tres líneas celulares**

#### **Resumen**

Se evaluó el efecto citotóxico de extractos metanólicos de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y *Calendula officinalis* L. en tres líneas celulares (HeLa, Vero y J774A.1). Las plántulas de *C. roseus* y *C. officinalis*, fueron inoculadas con *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5) e independientemente fertilizadas. A las plantas de *C. roseus* se aplicó al momento del transplante, el fertilizante orgánico Floranid Master Extra® (NPK 19-5-10). Las plantas de *C. officinalis* fueron fertilizadas inorgánicamente con 16 mM de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) aplicado en solución nutritiva. Así mismo, se incluyeron tratamientos que consistían en la combinación de la fertilización y de la inoculación. Después de 80 días, se evaluó el número de hojas, altura, área foliar, biomasa seca (hojas, tallo, raíces, y total) y la eficiencia fotoquímica. El extracto metanólico se obtuvo a partir de hojas o flores (*C. roseus* y *C. officinalis*, respectivamente), se hizo por maceración con una solución de metanol-agua (1:1 v/v), para evaluar su citotoxicidad. Las variables de crecimiento incrementaron en ambas plantas al ser inoculadas y fertilizadas simultáneamente, así como el número y peso seco de flores y botones florales de *C. officinalis*. El extracto de plantas de *C. roseus* con fertilización orgánica, fue citotóxico para células HeLa, pero sin dañar células epiteliales y macrófagos. El extracto de plantas de *C. officinalis* fertilizadas e inoculadas mostró alta citotoxicidad en células cancerosas, pero no produjo daños en células epiteliales y macrófagos.

**Palabras clave:** *Pseudomonas*, línea celular, cáncer, extractos vegetales, citotoxicidad.

## CHAPTER VI

### **Bacterial inoculation and organic or inorganic fertilization on the biological activity of methanolic extracts from leaves of *Catharanthus roseus* and flowers of *Calendula officinalis* evaluated on three cell lines**

#### **Abstract**

The cytotoxic effects of methanolic extracts from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. and *Calendula officinalis* L. were evaluated on three cell lines (HeLa, Vero, and J774A.1). Seedlings of *C. roseus* and *C. officinalis* were inoculated with *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5) or independently fertilized. Plants of *C. roseus* were fertilized at the transplanting time, with the organic fertilizer Floranid Master Extra® (NPK 19-5-10). For *C. officinalis*, plants were inorganically fertilized with 16 mM of ammonium nitrate (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) applied in a nutrient solution. Treatments consisted on the combination of bacterial inoculation with organic or inorganic fertilization were also included. After 80 days, the number of leaves, plant height, leaf area, dry weight (leaves, stems, root, and total), and the photochemical efficiency were evaluated. The methanolic extracts obtained from either leaves or flowers (*C. roseus* or *C. officinalis*, respectively), were prepared by macerating plant tissues in a methanol-water solution (1:1 v/v), for further cytotoxicity evaluation. Plant growth parameters for both plants species increased when the combination of bacterium and fertilization, as well as the number and the dry weight of *C. officinalis* flowers and floral buttons. The *C. roseus* extracts from organically fertilized plants resulted in cytotoxicity for HeLa cells, without damaging epithelial cells or macrophages. The extract of *C. officinalis* plants fertilized and inoculated had high cytotoxicity for cancer cells, without affecting epithelial cells nor macrophages.

**Key words:** *Pseudomonas*, cell line, cancer, plant extract, cytotoxicity.

## 6.1. Introducción

El cáncer es un grupo de enfermedades, por lo menos cien, caracterizado por el crecimiento celular incontrolado, con aumento de la proliferación y disminución de la apoptosis, generando una masa anormal de tejido, la cual tiende a propagarse (González, 2000; Wiesner *et al.*, 2004; American Cancer Society, 2012; Huang y Freter, 2015; Kasala *et al.*, 2015), invadiendo localmente o a distancia, otros tejidos (De la Garza y Juárez, 2014; Huang y Freter, 2015; Kasala *et al.*, 2015). Las plantas medicinales en el tratamiento de varias enfermedades es una práctica que data de millones de años (Hill, 1989; Ying-Ying *et al.*, 2014), que puede deberse a varias razones entre las cuales se encuentran: mayor disponibilidad del material, accesibilidad y bajo costo. La Organización Mundial de la Salud apoya el uso de la medicina tradicional siempre y cuando se verifique su eficacia y no toxicidad en el paciente (Engel *et al.*, 2011).

*Catharanthus roseus* es una planta endémica de Madagascar, caracterizada por contener diversos alcaloides, como vinblastina y vincristina, descubiertos a finales de 1950 por el grupo de investigación, Toronto, Canada, y la compañía farmacéutica Eli Lilly en Indianápolis, EE UU. Desde entonces, *C. roseus* se ha mantenido como la única fuente de estos fármacos importantes en el tratamiento del cáncer (Duffin, 2000).

*Calendula officinalis* es una planta originaria de Egipto, cuyas flores liguladas son ampliamente utilizadas por su propiedad antiinflamatoria, espasmódica, emenagoga, colagoga, sedativa, sudorífica, vulneraria, y bactericida. En Francia se reporta también, la actividad antitumoral y citotóxica de los extractos de esta especie vegetal (Acosta *et al.*, 2001).

La cantidad de metabolitos secundarios presentes en las plantas está determinada por diferentes factores; por ejemplo, el estado fenológico de la planta, la hora de colecta, los

instrumentos empleados durante su manipulación, los niveles de humedad, entre otros. (OMS, 2003). Por tal razón, se han buscado alternativas para incrementar el crecimiento de la planta, para obtener mayor cantidad del metabolito en cuestión. Una alternativa se refiere al uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal o bien, el uso de fertilizantes. Sin embargo, se ha reportado que las aplicaciones de ciertos microorganismos promotores del crecimiento vegetal inducen incrementos en la síntesis de metabolitos secundarios (Copetta *et al.*, 2006; De la Rosa-Mera *et al.*, 2011). No obstante, no solo se incrementa, en teoría, el metabolito principal, sino también sustancias acompañantes que integran a un extracto vegetal, y que pueden estar participando en su efectividad biológica. Por ello es necesario valorar la calidad del extracto. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la citotoxicidad de extractos de hojas de *C. roseus*, o de flores de *C. officinalis* en tres líneas celulares.

## **6.2. Materiales y métodos**

Las plántulas de *C. roseus* y *C. officinalis* (Plántulas de Tetela S. de R. L. de C. V. Cuernavaca, Morelos) con tres y dos semanas de germinación, respectivamente, fueron trasplantadas a macetas con 1000 g de sustrato constituido por turba y agrolita (1:1 v/v) previamente esterilizado (121 °C, 3 días). La temperatura fue registrada con una miniestación climática (Data Logger Watchdog modelo 100, Spectrum® Technologies Inc., Illinois, USA). La temperatura promedio máxima y mínima (°C), fue de 27.8 $\pm$ 1.6 y 14.1 $\pm$ 1.2 respectivamente.

Para las plantas de *C. roseus* se consideraron los siguientes tratamientos: 1) plantas inoculadas con la bacteria *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5), 2) plantas fertilizadas orgánicamente al 100%, 3) plantas fertilizadas e inoculadas, y 4) plantas testigo. En el caso

de *C. officinalis*, se consideraron los siguientes tratamientos: 1) plantas inoculadas con la cepa bacteriana OLS-SF5, 2) plantas fertilizadas inorgánicamente al 100%, 3) plantas fertilizadas inorgánicamente e inoculadas, y 4) plantas testigo.

#### 6.2.1. Elaboración del inóculo bacteriano

La cepa bacteriana OLS-SF5 (*Pseudomonas* sp.) aislada de carpóforos del hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor*, fueron activadas por estría cruzada en cajas de Petri, con agar nutritivo sólido (Merck KGaA), e incubadas a 28 °C, durante tres días. Transcurrido el tiempo, la cepa bacteriana fue sembrada en botellas de vidrio con 50 mL de caldo nutritivo (por cuadruplicado) y colocadas en agitación a 180 rpm durante tres días a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos lavados a las cepas bacterianas con agua destilada estéril. Para lo cual, el caldo nutritivo que contenía cada cepa bacteriana fue colocado en tubos tipo falcón, centrifugados a 7000 rpm durante 15 minutos. Después se retiró el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en agua destilada estéril utilizando un vortex.

El recuento del inóculo bacteriano se determinó mediante cámara de Neubauer, para lo cual, se utilizaron 10 µL del inóculo. La carga bacteriana del inóculo fue de  $2.3 \times 10^7$ .

#### 6.2.2. Inoculación de cepas bacterianas en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y *Calendula officinalis* L.

Para ambas especies vegetales fueron colocados, con pipetas de vidrio previamente esterilizadas, 5 mL de inóculo de *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5), tres semanas y dos semanas después de la germinación en plantas de *C. roseus* y *C. officinalis*, respectivamente.

### 6.2.3. Fertilización orgánica e inorgánica en el crecimiento de *Catharanthus roseus* y *Calendula officinalis*, respectivamente.

La fertilización orgánica (Floranid Master Extra (NPK 19-5-10) en plantas de *C. roseus* consideró la concentración del 100% de acuerdo con la dosis de aplicación que favorece su crecimiento (Véase Capítulo IV). Para lo cual, el fertilizante fue incorporado al sustrato al momento del trasplante.

Las plantas de *C. officinalis* se fertilizaron inorgánicamente con 16 mM de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), debido a que esta concentración fue óptima para el crecimiento de esta especie (Véase Capítulo IV). El fertilizante inorgánico fue aplicado en dilución con la solución Jensen (Vincent, 1970).

Ambas plantas fueron regadas cada tercer día con agua corriente, y cada ocho días con solución nutritiva Jensen (Vincent, 1970), libre de nitrógeno. Para cada experimento de cada especie medicinal, se consideraron 19 repeticiones en cada tratamiento.

Después de 80 días, las plantas fueron cosechadas para evaluar el número de hojas, altura, área foliar, biomasa seca total (hojas, tallo y raíces), y la eficiencia fotoquímica en hojas, la cual fue medida por fluorescencia (Opti-Sciences, Modelo OS-30p+, EE. UU.).

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

### 6.2.4. Obtención del extracto de hojas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. y flores de *Calendula officinalis* L.



Para la obtención del extracto, la biomasa total de hojas o de flores de *C. roseus* o *C. officinalis*, respectivamente, fueron secadas a 50 °C, hasta peso constante. En ambos casos, el material seco se cortó para que su tamaño permitiera una buena extracción y se dejó en maceración continua por 20 días utilizando como mezcla extractora una solución de metanol-agua (1:1 v/v). Posteriormente, la tintura se filtró y depositó en frascos ámbar. Más tarde, de la tintura se eliminó el metanol utilizando un rotavapor (Rotavapor® marca Buchi Waterbath modelo B-480) (Machado, 2000).

Para eliminar el agua presente en la tintura, las muestras fueron liofilizadas. Para dicho proceso se colocaron 10 mL de la tintura en viales de vidrio, la cual fue hipercongelada en un Shell Freezer, LABCONCO® a -35 °C. Posteriormente, los viales con la muestra fueron colocados en la liofilizadora (FREEZE DRY SYSTEM, FREZONE6, LABCONCO®), durante aproximadamente siete horas. Dicho proceso se repitió para la tintura de cada tratamiento (Machado, 2000).

#### 6.2.5. Evaluación de la efectividad biológica de extractos de hojas de plantas de *Catharanthus roseus* y de flores de *Calendula officinalis*.

En el Laboratorio de Docencia, Investigación y Servicios (LADISER), Inmunología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas de Orizaba, Universidad Veracruzana, se trabajó con tres líneas celulares: 1) Vero (ATCC® CCL-81™) son células epiteliales derivadas del riñón de mono verde africano, adulto; 2) la línea J774A.1 (ATCC® TIB-67™) macrófagos, obtenidos de sarcoma de células reticulares de ratón, y 3) células HeLa (ATCC® CCL-2™), células humanas, epiteliales del cérvix con adenocarcinoma (Figura 6.1.).

Las líneas celulares criopreservadas A -196 °C, fueron extraídas de un contenedor de nitrógeno líquido, a partir de una suspensión en una solución de suero fetal bovino con dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%, y un criopreservante de tipo penetrante, el cual actúa desplazando el agua del interior de la célula evitando así la formación de cristales de hielo intercelulares. Después de 15 min., los viales que contenían las líneas celulares, fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, para eliminar el criopreservante; posteriormente, los viales previamente limpiados con benzal, fueron transferidos a la campana de flujo laminar (Thermo Scientific, 1300 Series AZ), para eliminar el sobrenadante, y la suspensión de células fue transferida a botellas de cultivo celular (Corning®) de 25 cm<sup>2</sup>, que contenían 10 mL de medio Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino al 20%. Las botellas de cultivo celular fueron colocadas en incubadora (NUAIRE, AutoFlow NU-4750), a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>, y 95% de humedad relativa, durante 24 h. La tapa de las botellas fue desenroscada ligeramente para favorecer al intercambio de gases; transcurrido el tiempo se observó el crecimiento de las células, si éste era abundante se realizó el pase de células, si no, las botellas de cultivo celular se mantuvieron por 24 h. más en incubación.

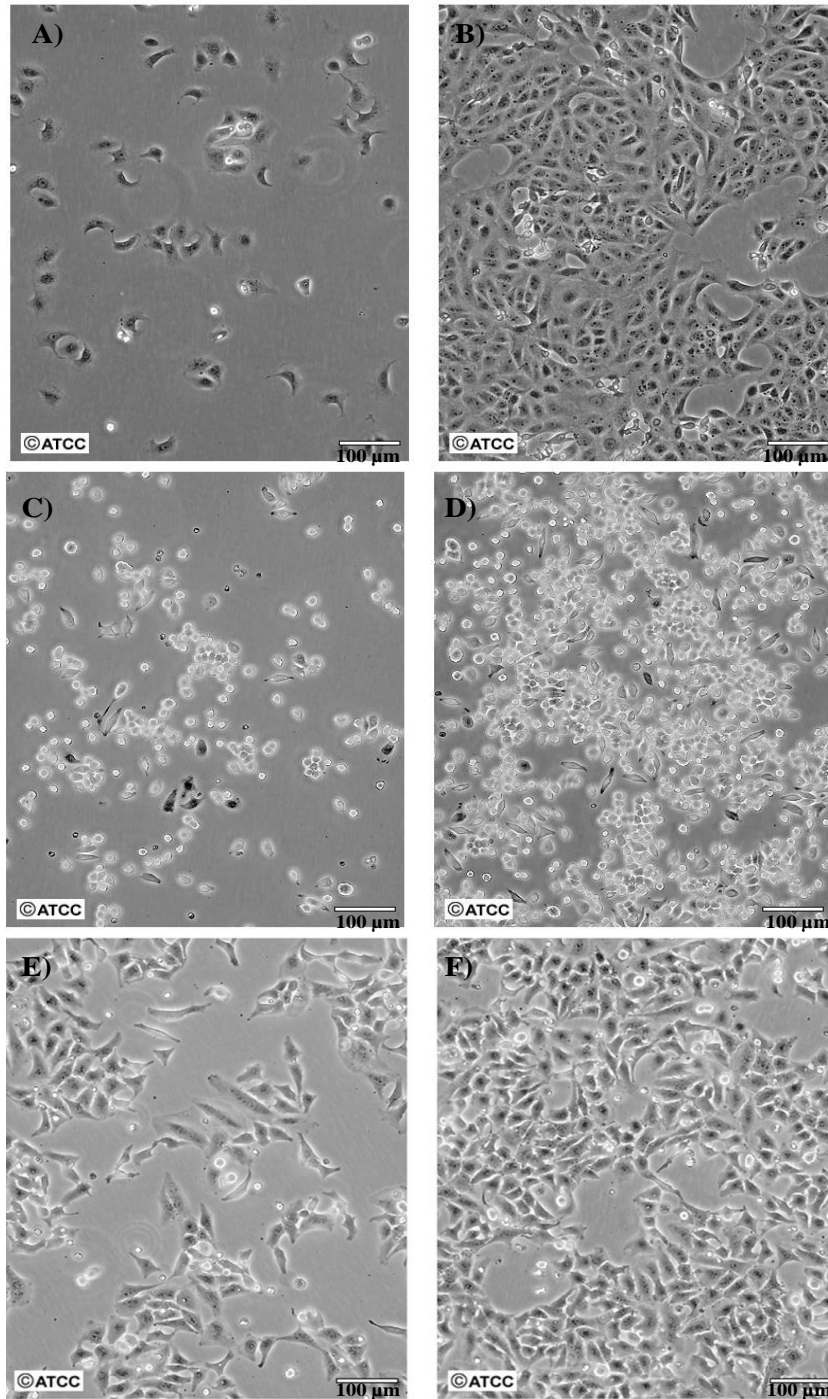
Las cajas de cultivo celular fueron retiradas de la incubadora, cuidando cerrar perfectamente las tapas antes de extraerlas. Las cajas se observaron al microscopio (IROSCOPE, SI-PH, C51700) para verificar el crecimiento de las células.

Durante su crecimiento las células se adhieren a la pared de las botellas de cultivo, debido a las cargas de la membrana, por lo que dentro de la campana de flujo después de eliminar el medio de cultivo se desprendieron las células de las botellas. A las células de las líneas Vero y HeLa, se les aplicó 3 mL de Tripsina/EDTA al 0.25%, y las botellas se incubaron a 37 °C durante 10 min; transcurrido el tiempo se observaron las botellas al

microscopio para verificar que las células no estuvieran adheridas a las paredes, y se agregó medio DMEM para modificar el pH. Una vez retiradas las células de las botellas se vaciaron a un tubo tipo Falcón y fueron centrifugadas a 4 °C durante 10 min a 3000 rpm (Mikro 22R, Hettich). Dentro de la campana de flujo se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue suspendido con medio DMEM en una caja de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> que contenían 20 mL de medio DMEM con suero fetal bovino al 20%; las cajas se incubaron a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>, y 95% de humedad relativa.

Para retirar las células de la línea J774A.1 de las botellas, se colocaron 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con EDTA al 0.01%, y después de 10 min se verificó que las células se hubieran desprendido. El contenido de las cajas fue transferido, dentro de la campana, a tubos tipo falcón para centrifugar durante 10 min a 3000 rpm. Dentro de la campana de flujo se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue suspendido con medio DMEM y vaciado a una caja de cultivo que contuviera 20 mL de medio DMEM con suero fetal bovino al 20%. Las cajas se incubaron a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>, y 95% de humedad relativa.

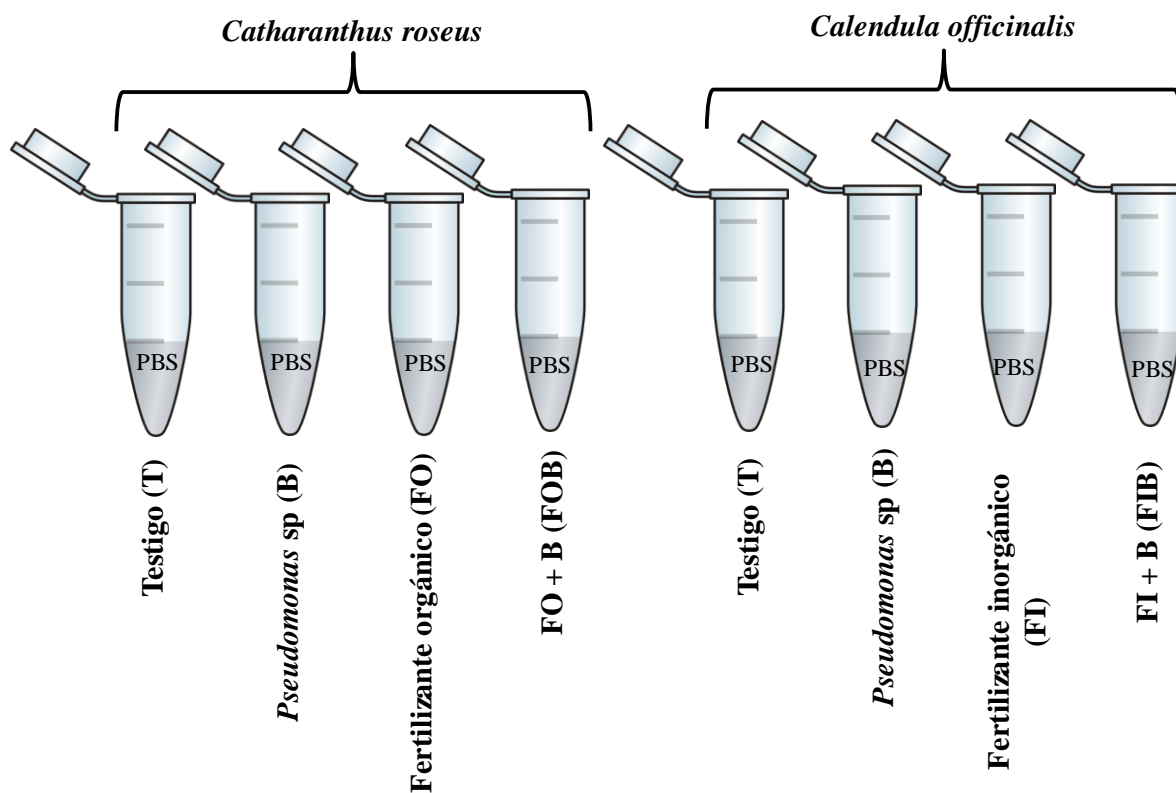
En cada cambio de medio DMEM se adicionaron 50 µL de una solución de ampicilina (100mg mL<sup>-1</sup>) para evitar contaminación.



**Figura 6.1.** Línea celular Vero, con baja densidad celular (A) y alta densidad (B). Línea celular J774A.1, con baja densidad celular (C) y alta densidad (D). Línea celular HeLa, con baja densidad celular (E) y alta densidad (F). ([www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx](http://www.atcc.org/products/all/CCL-2.aspx) 14/04/2015).

6.2.6. Efecto de extractos metanólicos liofilizados de hojas de *Catharanthus roseus* y flores de *Calendula officinalis* en tres líneas celulares.

Los extractos metanólicos liofilizados de hojas de *Catharanthus roseus* y de flores de *Calendula officinalis*, fueron pesados y resuspendidos en 1000  $\mu\text{L}$  de PBS a pH 7.4. en tubos eppendorf de 1.5 mL (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Extractos de plantas de *Catharanthus roseus* o de *Calendula officinalis* de los diferentes tratamientos resuspendidos en 1000  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Del peso obtenido por extracto se realizaron cálculos para conocer la cantidad de alícuota a aplicar por pozo (200  $\mu\text{L}$ ) para obtener las siguientes concentraciones; 5, 10 15, 20, 25 y 50  $\mu\text{g}$ , con dos repeticiones por concentración.

Las líneas celulares fueron separadas de las cajas de cultivo celular por medio de la metodología previamente mencionada, para después evaluar, con la cámara de Neubauer el número de células totales obtenidas de cada línea celular, verificando que se tuvieran 24 millones de células por línea.

Después, dentro de la campana de flujo laminar en placas de 96 pozos, se colocaron alícuotas de 100  $\mu$ L de cada línea celular, previamente resuspendida en medio DMEM con suero fetal bovino al 20%, asegurando que cada pozo contuviera 100, 000 células. Las placas de cada línea fueron incubadas durante 1 h a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, las alícuotas de los extractos con las diferentes concentraciones (5, 10 15, 20, 25 y 50  $\mu$ g) fueron colocadas en las placas de 96 pozos.

Además de la línea celular en los pozos iniciales A1-12, se colocaron 100  $\mu$ L medio DMEM con suero fetal bovino al 20%, y en los pozos de B1-12, 20  $\mu$ L DMSO, y 80  $\mu$ L de medio DMEM con suero fetal bovino para obtener 200  $\mu$ L de volumen total. Posteriormente, el resto de los pozos fueron aforados a 200  $\mu$ L con medio DMEM con suero fetal bovino y cada placa fue incubada por 48 h a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> (Figura 6.3).

Después de las 48 h de incubación, dentro de la campana de flujo laminar, los 200  $\mu$ L de medio de cultivo fueron removidos de los pozos con micropipeta; posteriormente, las células se fijaron con 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) al 50% en frío (4 °C), y las placas se incubaron por 1 h a 4 °C. Después se eliminó el TCA y las placas se lavaron tres veces con agua desionizada, secándolas al aire.

A cada pozo se le adicionaron 50  $\mu$ L de sulforodamina B (SRB) (TOX6-1KT, In vitro toxicology assay kit, Sigma) en solución de ácido acético al 1%, y las cajas se mantuvieron en parrilla de agitación (Rocking platform, Cole Parmer) por 30 min a temperatura ambiente.

Después se eliminó el SRB y se aplicaron 50 µL de solución de ácido acético al 1%, y se eliminaron de la placa secando al aire hasta que no se muestre rastro de la solución.

Posteriormente, la SRB se solubilizó con 50 µL de una solución de Tris-base 10 mM sin buffer, más tarde se colocaron las placas en un agitador de placas durante 5 min. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a 550 y 620 nm en un lector de microplacas (Thermo Electron Corporation, Multiskanex). El valor de densidad óptica del ensayo se define como la absorbancia media de cada pozo individual, menos el valor de la lectura del blanco, y los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad (Papazisis *et al.*, 1997).

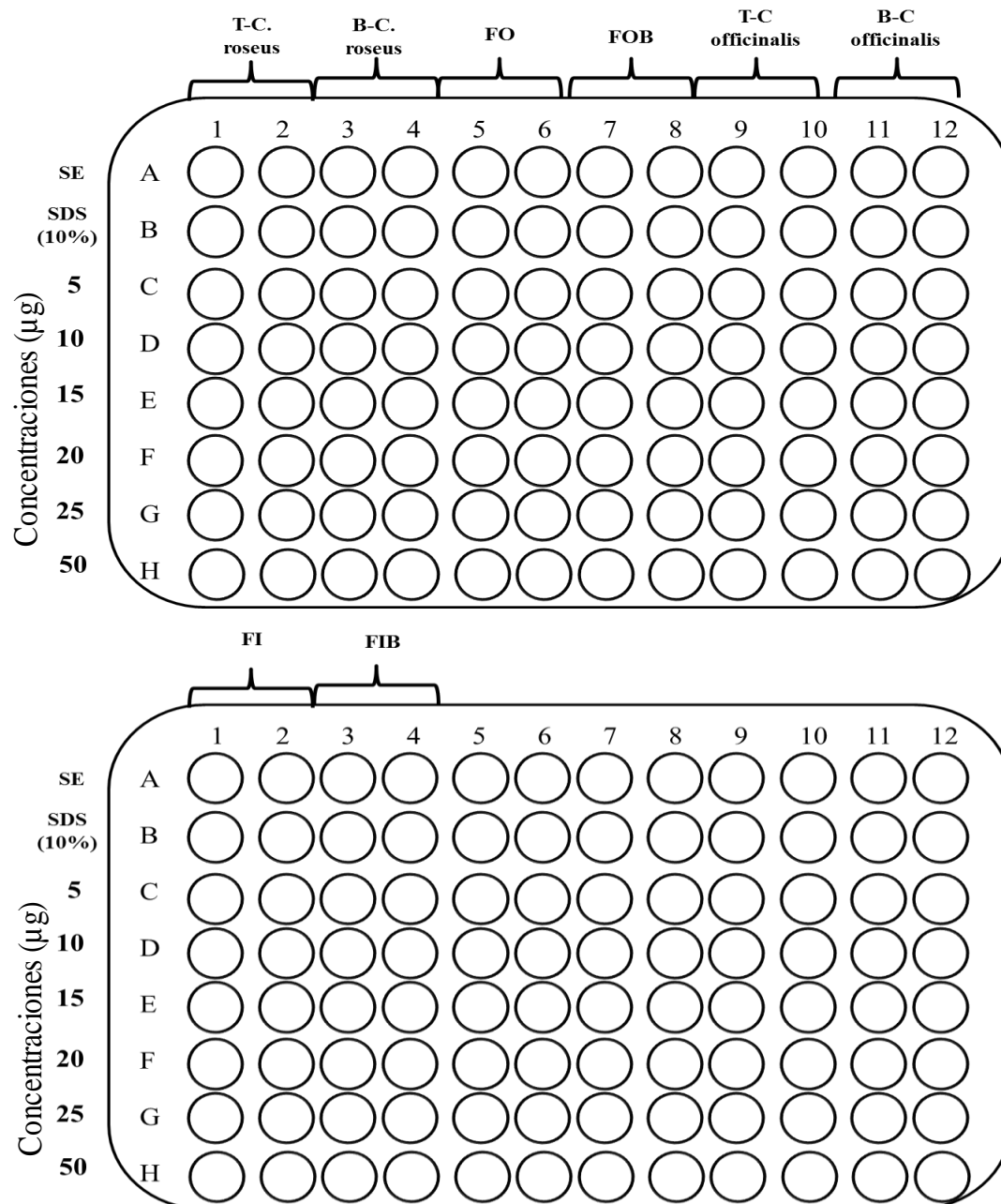
#### 6.2.7. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, incluyendo siete tratamientos para cada planta medicinal con diecinueve repeticiones cada uno. Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2006), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. Fertilización orgánica e inoculación bacteriana en el crecimiento de *Catharanthus roseus*.

La fertilización orgánica incrementó el peso seco total en las plantas; no obstante, las plantas sometidas al tratamiento fertilización + inoculación presentaron el mayor valor con respecto al resto de los tratamientos (Figura 6.4A).



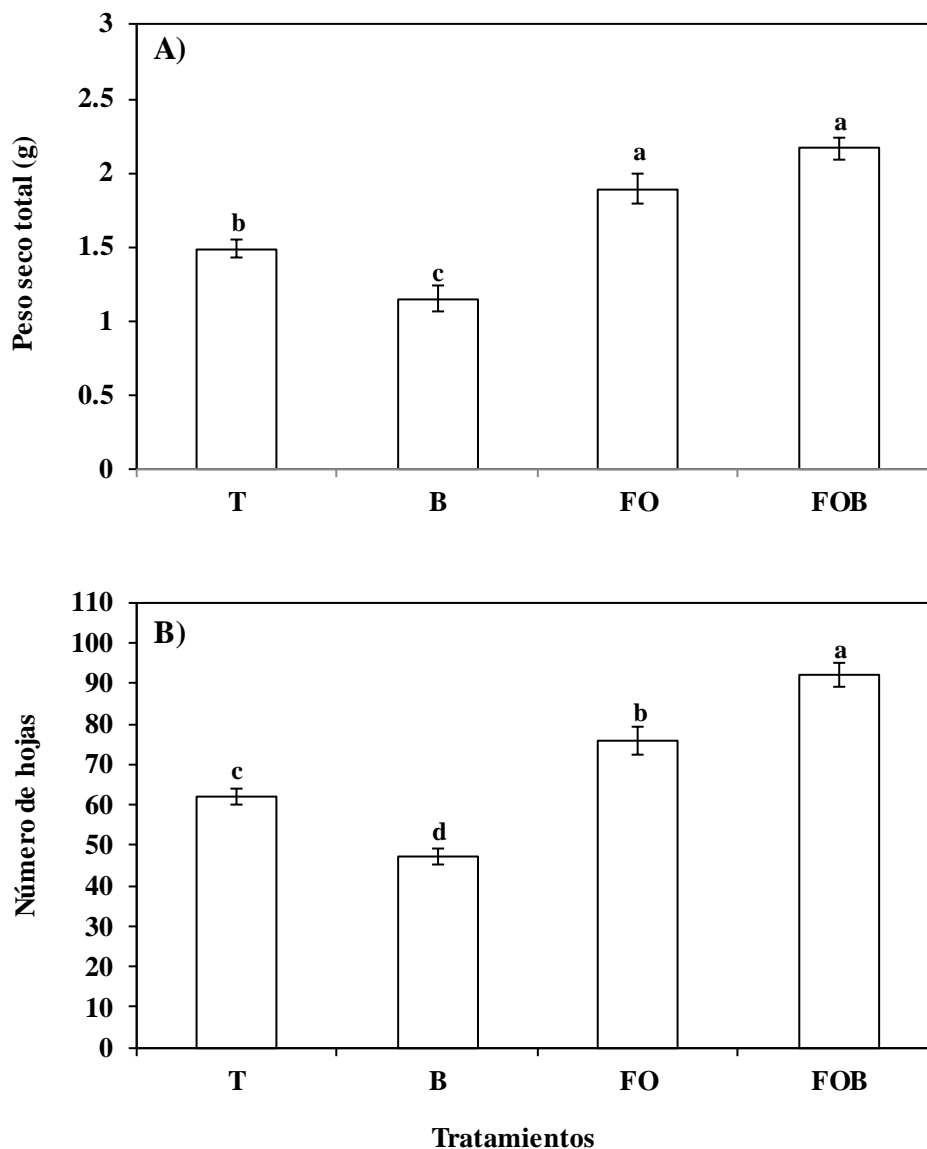
**Figura 6.3.** Diseño del acomodo de los extractos metanólicos de hojas de *Catharanthus roseus* y flores de *Calendula officinalis*, en la placa de 96 pozos. Simbología. T: Testigos (Sin fertilizar e inocular); B: Inoculación con bacterias; FO: Fertilización orgánica; FOB: Fertilización orgánica + inoculación bacteriana; **FI**: Fertilización inorgánica; **FIB**: Fertilización inorgánica + inoculación bacteriana; **SE**: Sin estímulo; **SDS**: Dodecil sulfato sódico.



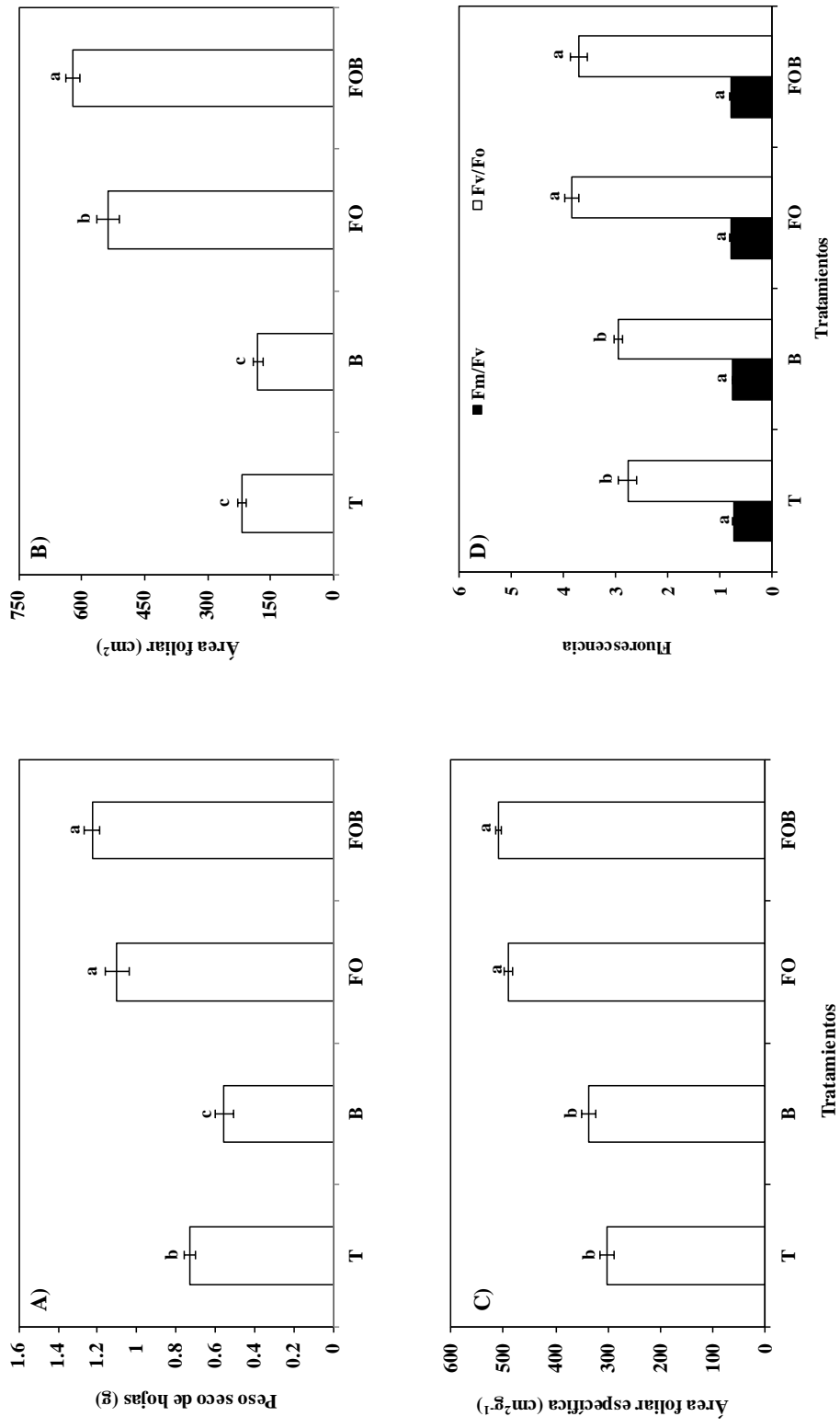
Con respecto al número de hojas, las plantas fertilizadas e inoculadas produjeron significativamente mayor cantidad de hojas en comparación con las plantas sometidas al resto de los tratamientos. En contraste, la inoculación bacteriana no influyó en la producción de hojas, al presentar el menor número de hojas con respecto a plantas testigo (Figura 6.4B). Las plantas fertilizadas e inoculadas además de un incremento en el número de hojas, mostraron mayor peso seco foliar (Figura 6.5A), aunque este tratamiento no mostró diferencias significativas, con respecto a aquellas plantas que fueron exclusivamente fertilizadas. En general, las plantas inoculadas exhibieron el valor más bajo en el peso seco de hojas (Figura 6.5A).

La inoculación junto con la fertilización indujo un incremento en el tamaño de las hojas de *C. roseus* (Figura 6.5B). Sin embargo, cuando las plantas únicamente fueron fertilizadas no hubo aumento del área foliar, presentando el valor promedio más bajo en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 6.5B). La fertilización orgánica incrementó el área foliar específica, pero sin mostrar diferencias significativas con aquellas que además estaban inoculadas (Figura 6.5C). Las plantas testigo presentaron el valor más bajo en el área foliar específica.

En la variable eficiencia fotoquímica se observó que entre los valores del parámetro  $F_v/F_m$  existe diferencia significativa entre las plantas sometidas a los tratamientos con fertilización orgánica y con fertilización más inoculación en comparación con las plantas testigo (0.73), (Figura 6.5D). Para el parámetro  $F_v/F_o$ , los valores más altos se registraron en las plantas sometidas a los tratamientos fertilización orgánica, y fertilización más inoculación, cuyos valores promedio fueron 3.8 y 3.7, respectivamente. Entre los valores



**Figura 6.4.** Efecto de la inoculación y fertilización orgánica en el peso seco total y número de hojas en plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., después de 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: T= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); B= *Pseudomonas* sp cepa OLS-SF5 FO= Fertilización orgánica con Floranid Master Extra (NPK 19-5-10); FOB= Fertilización e inoculación bacteriana.



**Figura 6.5.** Efecto de la inoculación y fertilización orgánica en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), área foliar específica (C), y eficiencia fotoquímica (fluorescencia) (D) de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., a los 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: T= Testigo (Sin fertilizar sin inocular); B= *Pseudomonas* sp cepa OLS-SF5; FO= Fertilización orgánica con Floranid Master Extra (NPK 19-5-10); FOB= Fertilización e inoculación bacteriana.

de estos tratamientos no hubo diferencia estadística significativa. El valor promedio más bajo se registró en plantas testigo con 0.75 (Figura 6.5D).

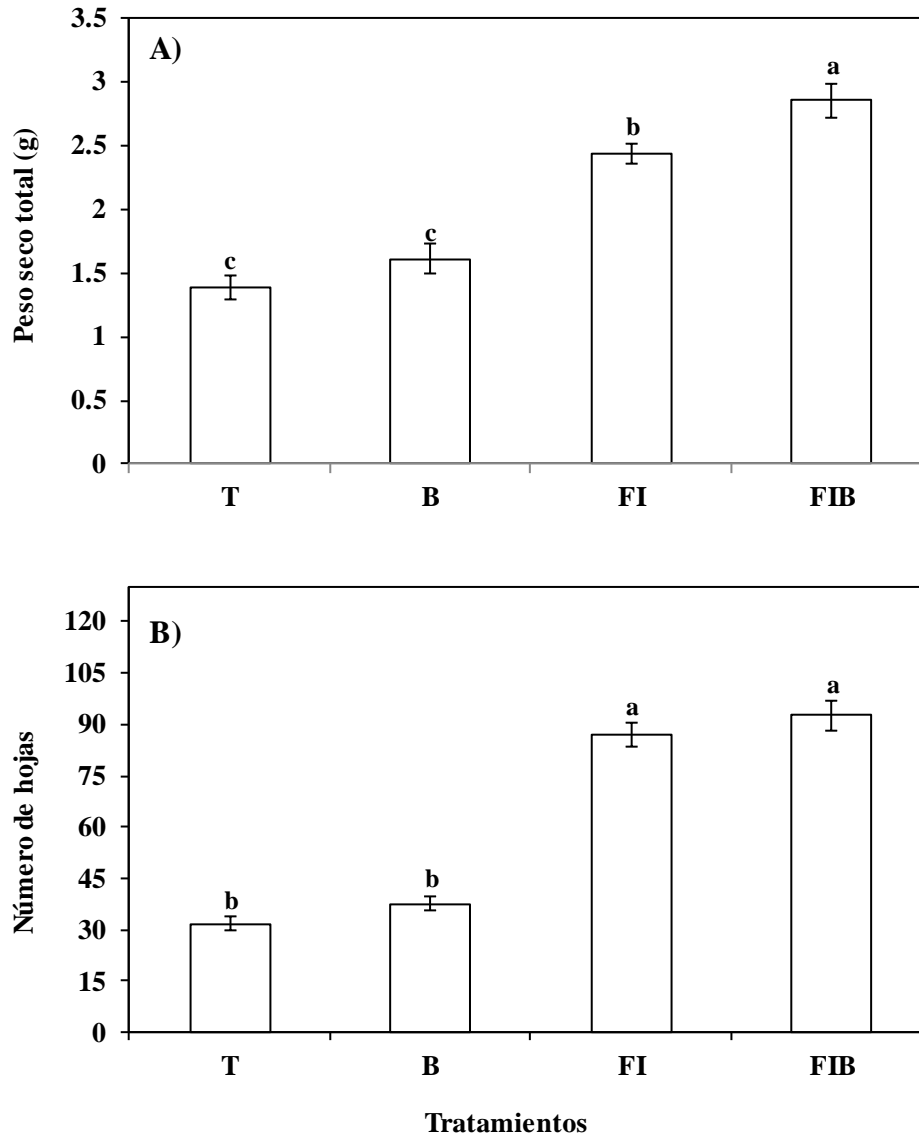
### 6.3.2. Fertilización inorgánica e inoculación bacteriana en el crecimiento de *Calendula officinalis* L.

Al fertilizar e inocular simultáneamente las plantas se obtuvo mayor peso seco total en comparación con las plantas testigo. La inoculación bacteriana no incrementó el peso seco total, puesto que no mostró diferencias con los valores obtenidos de las plantas testigo (Figura 6.6A).

El número de hojas incrementó ante la fertilización inorgánica con y sin la inoculación bacteriana, pues el número promedio de hojas presentes en las plantas de estos tratamientos fue mayor al registrado en plantas testigo (Figura 6.6B).

Las plantas inoculadas no evidenciaron incrementos en el número de hojas, por lo que no mostraron diferencias significativas con respecto al número de hojas de plantas inoculadas y plantas testigo (Figura 6.6B).

Los resultados del peso seco de hojas fortalecen los datos anteriores, puesto que las plantas fertilizadas e inoculadas nuevamente presentaron los valores más altos. Esto muestra que las plantas con este tratamiento además de presentar el mayor número de hojas, también mostraron mayor peso foliar. Sin embargo, las plantas que únicamente fueron fertilizadas mostraron valores significativamente menores a los obtenidos en las plantas fertilizadas e inoculadas (Figura 6.7A). El peso seco de hojas de las plantas únicamente inoculadas, fue mayor que el registrado para las plantas testigo. Sin embargo, estadísticamente entre ambos tratamientos no se observaron diferencias significativas (Figura 6.7A).



**Figura 6.6.** Efecto de la inoculación y fertilización inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el peso seco total, y el número de hojas, en plantas de *Calendula officinalis* L., después de 80 días.  $n=19$ . Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos. Simbología. **T**= Testigos (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= Inoculación con bacterias; **FI**= Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana.

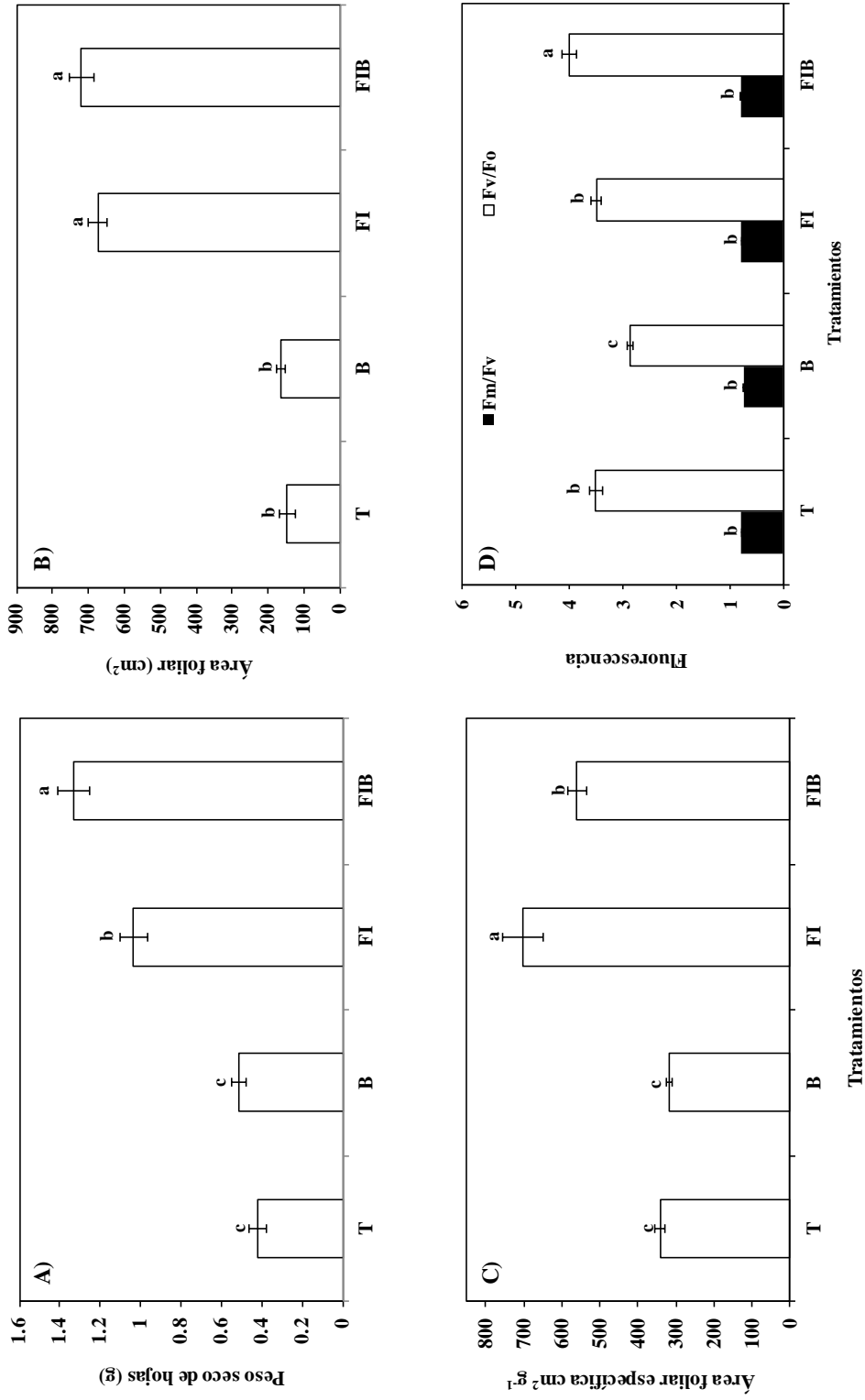
El área foliar de las plantas fertilizadas con y sin inoculación presentaron los valores más altos en comparación con el resto de los tratamientos. Sin embargo, entre las plantas de ambos tratamientos no existió diferencia estadística. Las plantas con la inoculación no presentaron incremento en el área foliar, en comparación con las plantas testigo (Figura 6.7B). En la variable área foliar específica, la fertilización inorgánica incrementó el valor de esta variable en comparación con los valores obtenidos del resto de los tratamientos (Figura 6.7C).

Para la variable eficiencia fotoquímica se observa que en el parámetro  $F_v/F_m$  no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 6.7D); mientras que para el parámetro  $F_v/F_o$ , los valores promedios más altos se obtuvieron en las plantas con la fertilización inorgánica en combinación con la inoculación bacteriana. El valor promedio más bajo se registró en las plantas inoculadas con la bacteria (Figura 6.7D).

La fertilización inorgánica con y sin inoculación incrementó el número y el peso seco de flores, así como, el número de botones florales, en comparación con las plantas testigo (Figura 6.8A, B y C); la inoculación bacteriana no promovió el número de flores y el peso seco de las mismas, ni el número de botones florales (Figura 6.8A, B y C). Las plantas fertilizadas inorgánicamente e inoculadas mostraron el valor más alto en el peso seco de botones florales con respecto al resto de los tratamientos (Figura 6.8D).

### 6.3.3. Actividad biológica de extractos metanólicos liofilizados de hojas de *Catharanthus roseus* y flores de *Calendula officinalis* en tres líneas celulares

En la interacción de extractos metanólicos liofilizados de hojas y flores de *C. roseus* y *C. officinalis*, respectivamente, se observó efectividad citotóxica diferencial en las líneas celulares evaluadas, cuyos resultados se muestran a continuación para cada especie vegetal.



**Figura 6.7.** Efecto de la inoculación y fertilización inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el peso seco de hojas (A), área foliar (B), área foliar específica (C), y eficiencia fotoquímica (D) de *Calendula officinalis* L., a los 80 días.  $n=19$ . Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: **T**= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= *Pseudomonas* sp cepa OLS-SF5; **FI**=Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana.

#### 6.3.3.1 Actividad biológica de extractos metanólicos de hojas de *C. roseus*

Los extractos liofilizados obtenidos de las hojas de los diferentes tratamientos presentaron la misma efectividad citotóxica en la línea celular HeLa, en comparación con los extractos obtenidos de plantas testigo (Figura 6.9). Sin embargo, el mayor porcentaje de citotoxicidad en esta línea celular (no significativo) se observó al aplicar el extracto de hojas de plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp.

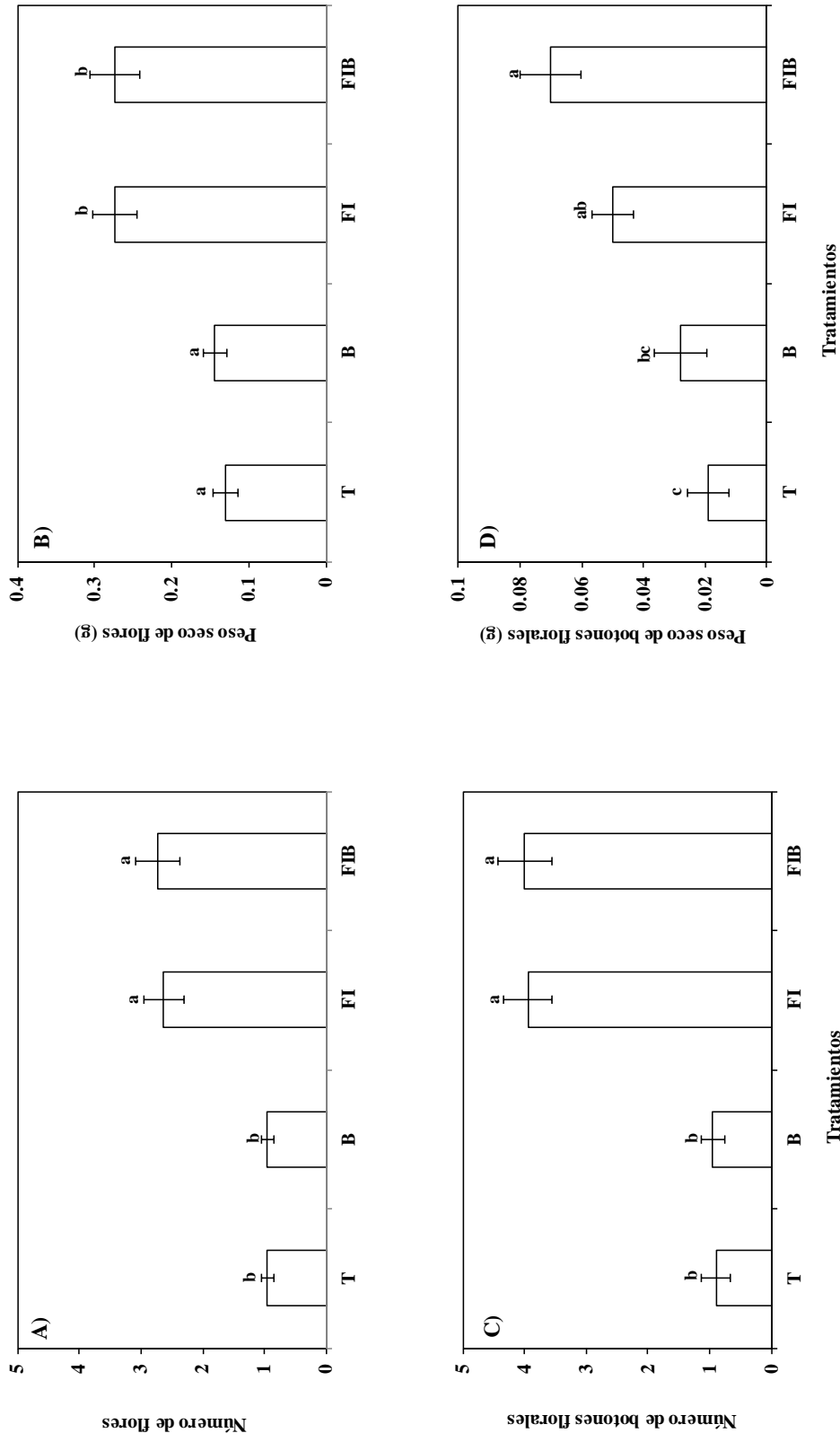
Por otro lado, las células epiteliales (Vero) fueron afectadas al aplicar el extracto de hojas de las plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp, y el obtenido de hojas de plantas testigo. No obstante, el extracto que causó menos toxicidad a las células fue el obtenido de plantas fertilizadas orgánicamente (Figura 6.9), donde el porcentaje de células muertas fue de 0%. Sin embargo, estadísticamente, se obtuvo el mismo efecto con el extracto obtenido de plantas fertilizadas e inoculadas con *Pseudomonas* sp. (Figura 6.9).

La línea celular de macrófagos J774A.1 fueron más susceptibles al extracto metanólico liofilizado obtenido de plantas fertilizadas e inoculadas, presentando 49% de células muertas. En contraste, el extracto que ocasionó menor mortandad de las células J774A.1, fue el obtenido de plantas únicamente inoculadas, con un 2% de células muertas (Figura 6.9).

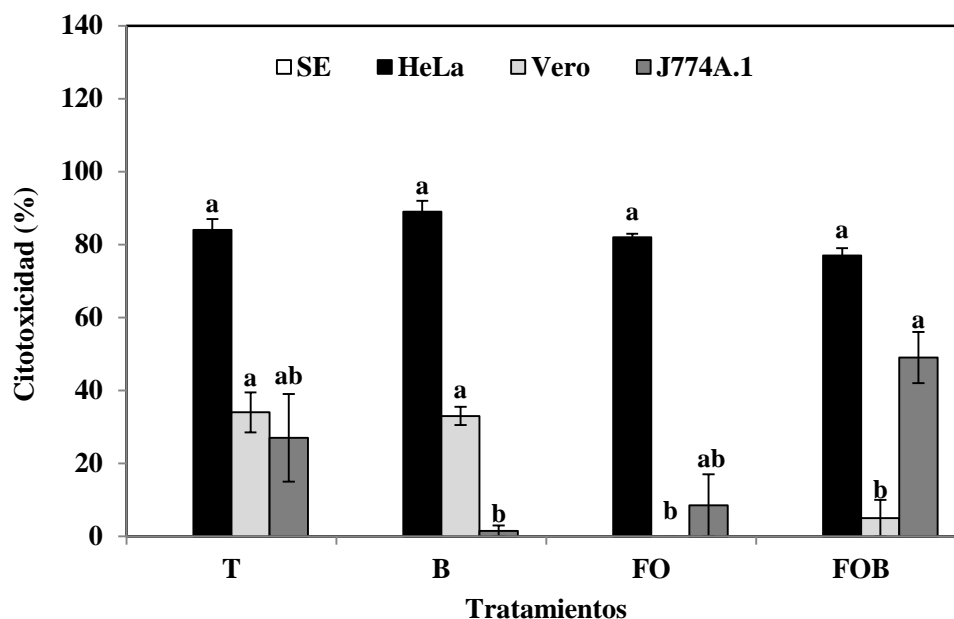
#### 6.3.3.2 Actividad biológica de extractos metanólicos de flores de *Calendula officinalis*.

El grado de citotoxicidad en células cancerígenas (HeLa) fue mayor al aplicar el extracto de flores obtenido de plantas fertilizadas inorgánicamente e inoculadas con la bacteria (88%). Sin embargo, este resultado no fue estadísticamente diferente con respecto a los extractos de las plantas testigo (89%). El extracto menos tóxico para las células cancerígenas fue el extraído de flores de plantas únicamente con la fertilización inorgánica (46%) (Figura 6.10).





**Figura 6.8.** Efecto de la inoculación y fertilización inorgánica ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) en el número de flores (A), peso seco de flores (B), número de botones florales (C) y peso seco de botones florales (D) de *Calendula officinalis* L., a los 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: **T**= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= *Pseudomonas* sp. cepa OLS-SF5; **FI**= Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana.

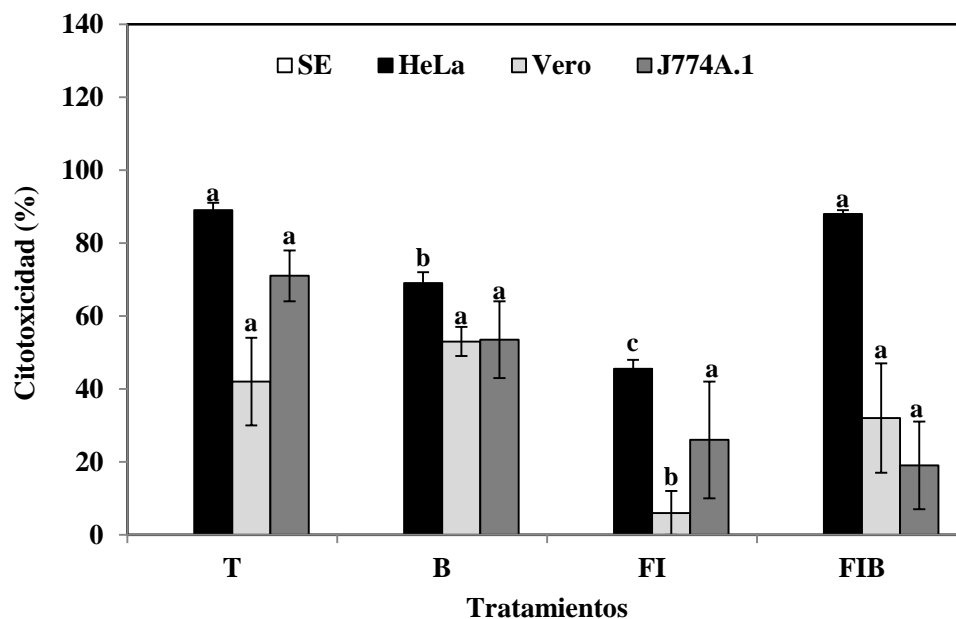


**Figura 6.9.** Efectividad citotóxica de extractos metanólicos obtenidos de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., extraídos después de 80 días. n=19. Medias + error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos. Simbología: **T**= Testigo (Sin fertilizar y sin inocular); **B**= *Pseudomonas* sp. cepa OLS-SF5; **FO**= Fertilización orgánica con Floranid Master Extra (NPK 19-5-10); **FOB**= Fertilización e inoculación bacteriana; **SE**= Sin estímulo.

El daño causado a las células epiteliales (Vero) fue mayor con los extractos obtenidos de flores de plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp., cuyo porcentaje de mortandad fue del 53%. El extracto menos tóxico para las células epiteliales fue el obtenido de las flores de plantas únicamente fertilizadas inorgánicamente, con un porcentaje de mortandad del 6% (Figura 6.10).

La toxicidad del extracto obtenido de las flores de las plantas sometidas a cualquier tratamiento fue estadísticamente igual al aplicarlo a la línea celular J774A.1. Sin embargo, el

extracto de flores menos tóxico fue aquél obtenido de plantas fertilizadas e inoculadas con la bacteria al mostrar 19% de células muertas (Figura 6.10).



**Figura 6.10.** Efectividad citotóxica de extractos metanólicos obtenidos de plantas de *Calendula officinalis* L., extraídos después de 80 días. n=19. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos. Simbología. **T**= Testigos (Sin fertilizar e inocular); **B**= *Pseudomonas* sp. cepa OLS-SF5; **FI**= Fertilización con nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ); **FIB**= Fertilización e inoculación bacteriana; **SE**= Sin estímulo.

#### 6.4. Discusión

Las plantas utilizadas en este estudio fueron consideradas en función de su uso antineoplásico, reportado en la medicina tradicional (Acosta *et al.*, 2001; Acosta y Rodríguez, 2002). La actividad citotóxica en células cancerosas de extractos de hojas y flores de plantas

de *C. roseus* y *C. officinalis*, respectivamente, es ampliamente conocido (Duffin, 2000; Acosta *et al.*, 2001; Acosta y Rodríguez, 2002). Particularmente, *C. roseus* posee diversos metabolitos secundarios que tienen un efecto farmacéutico, así como su mecanismo de acción (Verma *et al.*, 2007). Por ejemplo, los alcaloides vincristina y vinblastina son ampliamente utilizados en el combate de una variedad de cánceres (Mukherjee *et al.*, 2001; Van der Heijden *et al.*, 2004; Aslam *et al.*, 2009). Lo anterior es consistente con la alta citotoxicidad de sus extractos obtenida en este experimento.

La desventaja de las plantas medicinales es que la síntesis de sus compuestos está regulada por diversos factores abióticos y bióticos. Debido a este antecedente se ha optado por diferentes estrategias, entre éstas el uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal o bien, el suministro de fertilizantes cuyos nutrientes estén relacionados con la síntesis de los principios activos, con lo cual se persiguen dos objetivos: a) incrementar la producción del metabolito secundario en cuestión, y/o b) obtener plantas más vigorosas.

Algunos reportes demuestran que la aplicación de microorganismos promotores del crecimiento vegetal mejoran indicadores agronómicos en varias especies vegetales. Entre los microorganismos reportados que promueven el crecimiento de las plantas, se encuentran *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* y *Serratia*, (Gray y Smith 2005; Bhattacharyya y Jha, 2012).

Sin embargo, son pocos los trabajos que documentan el efecto de estos microorganismos en relación con el crecimiento y el metabolismo secundario de plantas medicinales. Jaleel *et al.* (2007) evaluaron el efecto de la rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, *Pseudomonas fluorescens* en *Catharanthus roseus*, cuyos resultados muestran que esta bacteria mejoró parcialmente la inhibición del crecimiento inducida por la

sequía, lo cual se refleja en el aumento del peso fresco y seco de sus órganos, concluyendo que la bacteria contribuye evitando al estrés causado por sequía. Lo anterior es contrario a los resultados obtenidos en este experimento, puesto que, bajo las condiciones establecidas, las plantas de *C. roseus* mostraron inhibición de su crecimiento por efecto de la bacteria *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5).

Por otro lado, el uso de fertilizantes se justifica por sus beneficios en el incremento de la productividad de las plantas (Loomis y Connor 2002). Esto es acorde con los resultados obtenidos en este trabajo, puesto que la aplicación de fertilizante orgánico e inorgánico en plantas de *C. roseus* y *C. officinalis*, respectivamente, mejoró consistentemente el crecimiento en ambas plantas. Así mismo, es importante destacar que la combinación de la inoculación con el fertilizante es una estrategia adecuada para favorecer el crecimiento de ambas plantas, ya que se obtuvieron los valores más altos en el peso seco total, número de hojas, peso seco de hojas, área foliar, y eficiencia fotoquímica. Este efecto se debió posiblemente al aporte de nutrientes y a la facilitación de éstos por parte de la bacteria hacia las plantas.

La eficiencia fotoquímica medida por la fluorescencia, es una variable registrada en plantas que han sido sometidas a factores estresantes, (Mehta *et al.*, 2010; Furuuchi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015a). La evaluación de este parámetro resulta de gran utilidad porque se puede inferir si algún factor externo causa estrés en alguna especie vegetal (Kooten y Snel, 1990). Por ejemplo, Gill *et al.* (2012) reportan que el aparato fotosintético parece ser especialmente sensible al efecto negativo del cadmio, al inducir cambios en la síntesis de clorofila, o bien, interfiriendo en la transpiración y en la respiración (Hasan *et al.*, 2008), así como en la apertura de los estomas (Sandalio *et al.*, 2001) reduciendo la fotosíntesis y afectando el crecimiento de la planta.

La eficiencia fotoquímica evaluada por la fluorescencia de clorofila está fuertemente correlacionada con la sobrevivencia de la planta ante factores estresantes, por lo que se ha considerado como un indicador de la intensidad del estrés (Baker y Rosenqvist, 2004). Entre los parámetros de fluorescencia de clorofila, la máxima eficiencia fotoquímica del fotosistema II (PSII) en hojas adaptados a la oscuridad ( $F_v/F_m$ ), es reconocido como un buen indicador de los efectos foto-inhibidores o fotooxidativos en el PSII (Maxwell y Johnson, 2000). Por otro lado, el parámetro  $F_v/F_o$  indica el tamaño y el número de los centros fotosintéticos activos en el cloroplasto y por lo tanto, la fuerza fotosintética de la planta (Israr *et al.*, 2011).

Björkman y Demming (1987) sugirieron que si el valor  $F_v/F_m$  es superior a 0.8, significa que el potencial de la eficiencia del PSII no es afectada. En el presente estudio, los valores más bajos de  $F_v/F_m$  en *C. roseus*, se obtuvieron en las plantas inoculadas con la bacteria promotora del crecimiento vegetal (0.74) y en plantas testigo (0.73). En cambio, en *C. officinalis*, los valores más bajos en  $F_v/F_m$  además de plantas testigo (0.77) o de plantas inoculadas (0.74), también se observó en aquellas que fueron fertilizadas inorgánicamente (0.77). Lo anterior indica que las plantas de dichos tratamientos presentaban alteración en la eficiencia del PSII, lo cual se vio reflejado posiblemente en las variables agronómicas. Así mismo, se infiere que las plantas del tratamiento fertilizado e inoculado y fertilizado simultánea, en ambas especies vegetales no sufrieron alteraciones en la eficiencia de su PSII, al mostrar valores de 0.8, en promedio.

Por su parte Dan *et al.* (2000) proponen que la relación de  $F_v/F_o$  con un valor de 4.0 o superior, indica que la planta está sana y no sufre de estrés en el proceso de la fotosíntesis. Para este estudio los resultados muestran que los valores más altos de  $F_v/F_o$ , en ambas especies vegetales, se obtuvieron cuando se combinó la fertilización con la inoculación;

mientras que para el resto de los tratamientos se observaron valores inferiores. Lo anterior indica que la combinación de la fertilización e inoculación en ambas especies vegetales evitó la expresión de un efecto por estrés en el proceso fotosintético, lo cual se reflejó en la obtención de plantas más vigorosas.

Por otra parte, los extractos de hojas de *C. roseus* presentaron niveles altos de citotoxicidad bajo cualquier tratamiento, en la línea celular HeLa, lo cual concuerda con el alto número de metabolitos secundarios que contiene esta planta, entre ellos, vinblastina y vincristina (Mukherjee *et al.*, 2001; Van der Heijden *et al.*, 2004; Aslam *et al.*, 2009). Sin embargo, es interesante destacar que cuando las plantas son sometidas a fertilización orgánica, éstas conservan la misma citotoxicidad, pero, disminuye en células epiteliales y macrófagos. Para plantas de *C. officinalis*, el extracto de flores de las plantas sometidas a la combinación de la fertilización inorgánica e inoculación, mostraron alto grado de citotoxicidad hacia células cancerosas, pero menor para células epiteliales y macrófagos.

Lo anterior es importante debido a que usualmente los medicamentos que contrarrestan esta enfermedad no son específicos, por lo tanto, afectan o atacan a cualquier célula, haciendo aún más vulnerables a los pacientes, es decir, los medicamentos quimioterapéuticos no pueden detectar la diferencia entre las células en reproducción de los tejidos normales y las células del cáncer. Esto significa que las células normales son dañadas junto con las células cancerosas, causando efectos secundarios.

## **6.5. Conclusiones**

Para el cultivo de plantas de *C. roseus* y *C. officinalis* se recomienda la combinación de la bacteria promotora del crecimiento vegetal (*Pseudomonas*) y la aplicación de fertilizante, para *C. roseus* el uso de fertilizante orgánico y para *C. officinalis* fertilizante

inorgánico, pues bajo las condiciones establecidas se obtuvo mayor crecimiento de ambas especies medicinales.

La obtención de un extracto antineoplásico a partir de hojas de *C. roseus* con alto grado citotoxicidad en células cancerosas, pero menor en células epiteliales y macrófagos se sugiere únicamente la aplicación de fertilizante orgánico.

En plantas de *C. officinalis*, se sugiere como estrategia para la obtención de un extracto con alto grado de citotoxicidad en células cancerosas, pero menor para células epiteliales y macrófagos, la aplicación combinada de la fertilización inorgánica e inoculación con la bacteria promotora de crecimiento vegetal, *Pseudomonas* sp (OLS-SF5).



## CAPÍTULO VII

### Fertilización orgánica e inoculación con *Pseudomonas* sp. en la fotosíntesis y en la expresión de genes claves en la vía de síntesis de indol alcaloides terpenoides, en *Catharanthus roseus*

#### Resumen

Esta investigación evaluó el efecto de la fertilización orgánica y de la inoculación bacteriana en el crecimiento, la eficiencia fotoquímica, y la expresión de los genes *ORCA3*, *D4H*, *STR* y *TDC*, involucrados en la ruta de los alcaloides indoles terpenoides (TIA) en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Las plántulas fueron establecidas en macetas con sustrato constituido por vermiculita, turba y agrolita (1:1:2 v/v/v) y sometidas a los siguientes tratamientos: 1) testigo, con plantas sin fertilizar y sin inocular; 2) fertilización orgánica con aplicación de Floranid Master Extra, NPK 19-5-10; y 3) inoculación con *Pseudomonas* sp. Después de 70 días, se determinó el número de hojas, altura, área foliar, biomasa seca total, y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (EFPSII), y la expresión génica mediante extracción de RNA a partir de hojas, utilizando qRT-PCR en tiempo real. El mayor crecimiento vegetal se registró en las plantas fertilizadas, en comparación con los otros dos tratamientos. La EFPSII no fue afectada por la fertilización o la inoculación, en comparación con el testigo. Los genes *ORCA3* y *TDC* mostraron mayor actividad transcripcional (2.00) en plantas fertilizadas, seguidos de *D4H* (1.98), y *STR* (1.83). Las plantas inoculadas mostraron menores valores de transcripción, y el valor más alto se observó para el gen *ORCA3* (1.61) y el más bajo para el gen *D4H* (1.16). La inoculación de *C. roseus* con *Pseudomonas* sp., disminuyó el crecimiento vegetal, y la expresión de genes en la ruta de los TIA.

**Palabras clave:** Vinca, planta medicinal, *Pseudomonas*, fertilizante orgánico, qRT-PCR.

## CHAPTER VII

### **Organic fertilization and inoculation with *Pseudomonas* sp. in the photosynthesis and key gene expression of terpenoid indole alkaloid pathway, in *Catharanthus roseus***

#### **Abstract**

This research evaluated the effect of organic fertilization and plant growth promoting rhizobacteria on the growth, photochemical efficiency and on the expression of genes *ORCA3*, *D4H*, *STR*, and *TDC*, involved in the terpenoid indole alkaloid (TIA) pathway in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Seedlings were set in pots with vermiculite, peat-moss and perlite (1:1:2 v/v/v), and subjected to the following treatments: 1) control, unfertilized and non-inoculated plants; 2) organically fertilized plants with Floranid Master Extra, NPK 19-5-10; and 3) inoculated plants with *Pseudomonas* sp. After 70 days, the number of leaves, the leaf area, the total dry weight, the photochemical efficiency of photosystem II (PEPSII), and the gene expression by using qRT-PCR were determined. The highest plant growth was achieved at fertilized plants. The PEPSII was unaffected by either fertilization or bacterial inoculation when compared to the control. Genes *ORCA3* and *TDC* had higher transcriptional activity (2.00) in fertilized plants, followed by *D4H* (1.98) and *STR* (1.83) genes. Inoculated plants showed the lowest transcriptional values; the high value was observed for the gene *ORCA3* (1.61), whereas the gene *D4H* (1.16) had the lowest value. Bacterial inoculation diminished the growth and the expression of genes of TIA pathway in *C. roseus*.

**Key words:** Vinca, medicinal plant, *Pseudomonas*, organic fertilizer, qRT-PCR.

## 7.1. Introducción

Las plantas producen amplia variedad de productos naturales, y muchos de ellos llamados metabolitos secundarios, los cuales no parecen participar directamente en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas (Hussain *et al.*, 2012; Jimenez-García *et al.*, 2013). Sin embargo, estos metabolitos participan en procesos de auto-defensa de las plantas contra herbívoros y patógenos (Ober y Kaltenecker, 2009), y en la adaptación ante ambientes adversos (Rao y Ravishankar 2002; Hussain *et al.*, 2012). Como metabolitos secundarios se conocen a terpenos, fenoles, flavonoides, esteroides, ceras, grasas, taninos, gomas, resinas, carotenoides, y alcaloides (Nunnery *et al.*, 2010; Asensi *et al.*, 2011). Los alcaloides son producidos por un 20% de las plantas y se derivan principalmente de aminoácidos (Facchini y De Luca 2008; Rai *et al.*, 2013); algunos alcaloides se utilizan para contrarrestar padecimientos como ansiedad, depresión, dolor, inflamación, y cáncer (Liu *et al.*, 2013).

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don., es una planta endémica de Madagascar que se caracteriza por producir diversos metabolitos secundarios (Gidding *et al.*, 1999), que le confieren amplio uso en la medicina tradicional para tratar diabetes, cáncer, hipertensión, fiebre, o hemostasia (Don, 2003; Nor Hazwani *et al.*, 2010). Entre los metabolitos producidos por *C. roseus* se encuentran los alcaloides indol terpenoides (TIA), que se encuentran en plantas de la familia *Apocynaceae*, y son un grupo de productos naturales estructuralmente diversos con potentes actividades biológicas, y se reconocen más de 3000 TIA, lo que los hace uno de los principales grupos de alcaloides en las plantas (Dewick, 2002).

Se estima que *C. roseus* contiene más de 120 compuestos TIA y muchos de los alcaloides presentan actividad farmacológica importante (Van der Heijden *et al.*, 2004; Nor Hazwani *et al.*, 2010). Dos de estos TIA, vinblastina y vincristina, son utilizados eficazmente en el tratamiento del cáncer (Acosta y Rodríguez, 2002). La mayoría de estos alcaloides se

producen en cantidades extremadamente bajas en la planta, lo que limita su uso a escala comercial. Además, la síntesis química y los cultivos de células *in vitro* para la producción a gran escala de estos alcaloides aún presentan serias deficiencias técnicas (Shanks, 2005).

La cantidad de metabolitos secundarios presente en las plantas está determinada por factores bióticos o abióticos, el estado fenológico de la planta, la hora de colecta, los instrumentos empleados, y los niveles de humedad, entre otros (OMS, 2003). Lo anterior ha orientado a la búsqueda de alternativas para estimular el crecimiento vegetal, a fin de obtener mayor cantidad del metabolito en cuestión. Para lograr este incremento, se han usado microorganismos promotores del crecimiento vegetal, abonos, y fertilizantes (Ibrahim *et al.*, 2013; Zamani *et al.*, 2014; Gómez-Merino *et al.*, 2015).

La síntesis de metabolitos secundarios en los órganos vegetales depende de la actividad de enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis de estos compuestos que forman parte del metabolismo secundario de las plantas (Luca y Laflamme, 2001), mismas que son codificadas por genes cuya actividad transcripcional puede medirse por diferentes técnicas, y correlacionarse con la actividad enzimática (Walker, 2002). Una de las técnicas más sofisticadas y confiables, desarrollada a mediados de la década de 1990 para analizar y cuantificar los ácidos nucleicos, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica utiliza colorantes de unión fluorescentes que permiten registrar la acumulación de ADN durante la reacción, lo cual permite dar seguimiento en tiempo real, a la amplificación de ADN, así como eliminar la posibilidad de contaminación en el laboratorio (Walker, 2002; Rebrikov y Trofimov, 2006). La PCR puede ser acoplada a la transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR en tiempo real, o RT-PCR cuantitativa) permitiendo analizar la actividad transcripcional, es decir, la expresión de genes específicos (Walker, 2002).

La qRT-PCR se distingue por su mayor sensibilidad, especificidad y amplio rango de cuantificación (Artico *et al.*, 2010). El avance en esta técnica ha permitido encontrar información sobre la expresión de genes, durante el crecimiento o en las rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas con importancia farmacológica (Zeng *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). Este proceso de transcripción génica es complejo, y puede estar regulado por diferentes factores como lo son el tipo de tejido, las señales internas y externas (Memelink *et al.*, 2001), y el tipo de fertilización que se aplique a las plantas (Yang *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la fertilización orgánica y la inoculación de una bacteria benéfica en el crecimiento, la eficiencia del fotosistema II (EFFII), y la expresión de genes involucrados en la síntesis de alcaloides indol terpenoides (TIA), de plantas de *C. roseus* cultivadas en invernadero.

## **7.2. Materiales y métodos**

Para este estudio se utilizaron plántulas de *C. roseus* (Plántulas de Tetela S. de R. L. de C. V., Cuernavaca, Morelos) de tres semanas después de la germinación. Las plántulas fueron establecidas en invernadero, y trasplantadas a macetas con 1000 g de sustrato constituido por turba y agrolita (1:1 v/v), previamente esterilizado (121 °C durante 3 h, dejando reposar el sustrato 24 h, y volviendo a esterilizarlo a la misma temperatura y tiempo). La temperatura (°C) en el invernadero fue registrada con una mini-estación climática (Data Logger Watchdog modelo 100, Spectrum® Technologies Inc., Ciudad de Illinois, USA). La temperatura promedio máxima y mínima fue de  $32.9 \pm 0.47$  y  $15.8 \pm 0.19$  respectivamente, y la humedad relativa (%) máxima fue de  $27.2 \pm 0.66$  y la mínima de  $23.45 \pm 0.04$ .

### 7.2.1. Reactivación de crecimiento y preparación del inóculo bacteriano e inoculación de las plántulas de *Catharanthus roseus*.

La cepa bacteriana *Pseudomonas* sp., OLS-SF5 previamente aislada de carpóforos del hongo ectomicorrízico *Lactarius salmonicolor*, fue reactivada por estría cruzada en cajas de Petri con agar nutritivo (Merck®), e incubadas a 28 °C durante tres días.

Una vez reactivado su crecimiento, la cepa bacteriana fue sembrada en botellas de vidrio con 50 mL de caldo nutritivo (por cuadruplicado), incubadas en agitación a 180 rpm (Thermo Scientific, MaxQ4000, Ciudad, EEUU) durante tres días, a temperatura ambiente (26 °C). Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada estéril; el caldo nutritivo que contenía a la cepa bacteriana fue colocado en tubos tipo falcón y centrifugados a 7000 rpm durante 15 minutos. Después se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en agua destilada estéril utilizando un vortex, y este procedimiento se repitió una vez más. La concentración del inoculante fue de  $2.6 \times 10^7$  células por mililitro.

En cada una de las unidades experimentales correspondientes, fueron colocados, con pipetas de vidrio previamente esterilizadas, 5 mL de inóculo de la cepa bacteriana, en condiciones de esterilidad. Se establecieron seis unidades experimentales por cada en ensayo (tres ensayos en total), y se mantuvieron en condiciones de invernadero.

### 7.2.2. Aplicación de la fertilización orgánica en las plántulas de *Catharanthus roseus*

La fertilización orgánica de las plantas consistió en la aplicación del producto comercial Floranid Master Extra (NPK 19-5-10) al 100% (0.804 g), de acuerdo con la dosis recomendada por el fabricante y con la cual se obtuvo mayor crecimiento en ensayos previos (Capítulo IV). El fertilizante fue incorporado al sustrato al momento del trasplante. Las plantas fueron regadas cada tercer día con agua corriente, y cada ocho días con solución

nutritiva Jensen (Vincent, 1970), la cual contenía la siguiente composición iónica  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y elementos traza, pH de 6.0.

Después de 70 días de haber aplicado los tratamientos, las plantas fueron cosechadas para evaluar el número de hojas, altura, área foliar, biomasa seca total (hojas, tallo y raíces), eficiencia fotoquímica en hojas medida por fluorescencia (EFFII) (Opti-Sciences, Modelo OS-30p+, Ciudad, EEUU). El área foliar fue determinada con un medidor de área foliar (Area Meter, Modelo LI-3100; Ciudad Nebraska, EEUU). La biomasa seca total se obtuvo al pesar por separado hojas, tallos y raíces en balanza analítica (Sartorius, Modelo Analytic AC 210S, Ciudad Illinois, EEUU), después de que los diferentes órganos de la planta fueron secados a 70 °C por 72 h.

### 7.2.3. Extracción de RNA de hojas y síntesis de cDNA para el análisis de expresión de genes TIA

Se tomaron hojas de *C. roseus* de dos réplicas biológicas con 3 plantas cada una. Las muestras fueron pulverizadas con nitrógeno líquido y posteriormente, se hizo la extracción de RNA utilizando tres métodos: 1) kit comercial QIAGEN RNeasy (Qiagen Inc., Valencia, CA, EEUU), 2) kit IBI Scientific (IBI Scientific, Peosta, EEUU); y 3) Trizol (Invitrogen, TRIzol® Reagent). Las tres metodologías se aplicaron siguiendo el protocolo propuesto por cada casa comercial.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de RNA total utilizando un NanoDrop (Thermo Scientific), y se visualizó en gel de agarosa. Como parámetro de calidad se comparó la relación entre las absorbancias 260/280, así como la definición de bandas en el gel. Para la síntesis cDNA se tomó 1 µg de RNA total en un volumen final de reacción de 20 µL usando el Kit SuperScript®III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, SuperScript®III), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

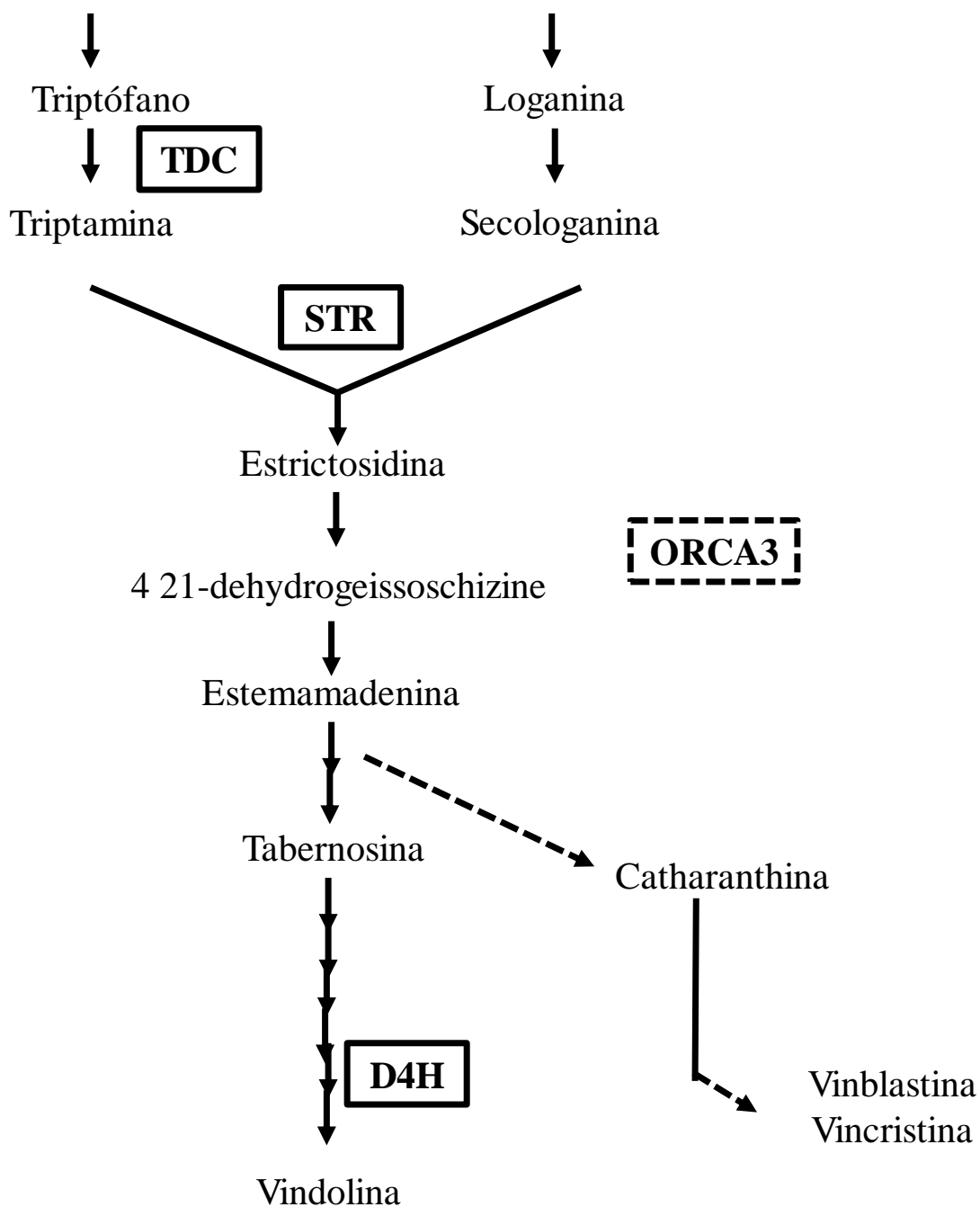
#### 7.2.4. Análisis qRT-PCR

Las secuencias de los primers/iniciadores/oligonucleótidos de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides indol terpenoides (*ORCA3*, *D4H*, *STR* y *TDC*) (Figura 7.1), así como los genes de referencia (*CrEF1*, *CrUBQ11*, *CrCyC*, *RPS9* y *CrUBQ6*), fueron utilizados con base en Sander (2009) (Cuadro 7.1).

Además, se pusieron a prueba los genes factor de elongación (*CrEF1*), ubiquitina 11 (*CrUBQ11*), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (*CrCyC*), 40s ribosomal proteína S9 (*RPS9*) y ubiquitina 6 (*CrUBQ6*), lo anterior para identificar el gen de referencia adecuado las condiciones experimentales (Sander, 2009).

La mezcla de PCR contenía 2 µL (20 ng/ µL) de cDNA diluido, 7.5 µL de 2X SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems® Carlsbad, CA, USA), y 3 µL de cada iniciador de los genes, en un volumen final de 15 µL. También se llevaron a cabo reacciones de PCR para cada gen de referencia. Cada reacción se realizó por triplicado.





**Figura 7.1.** Ruta de biosíntesis de los alcaloides indol-terpenoides de *Catharanthus roseus*.

Los genes con recuadro se piensan que están regulados por el factor de transcripción *ORCA3* (van der Fits y Memelink, 2000). Simbología: *TDC*= triptófano descarboxilasa; *STR*: estrictosidina sintasa; *D4H*= Deacetoxivindolina 4-hidroxilasa.

**Cuadro 7.1.** Secuencias de los genes involucrados en la síntesis de alcaloides indol terpenoides, en *Catharanthus roseus*. Así como de los genes de referencia utilizados

<b>Gen</b>	<b>Secuencia de primers</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<i>ORCA3</i>	5'-cgaattcaatggcggaaagc-3' 5'-ccttatctccgccggaact-3'	146
<i>D4H</i>	5'-taccctgcatgccctcaacc-3' 5'-ttgaaggccgccaattgat-3'	121
<i>STR</i>	5'-tgacagtcccgaaggtgtgg-3' 5'-cgccgggaacatgtagctct-3'	122
<i>TDC</i>	5'-tccgaaaacaagcccatcgt-3' 5'-aaggagcggtttcggggata-3'	126
<i>CrEF1</i>	5'-tcaggaggctcttctgtga-3' 5'-agctcccttggcagggtcat-3'	115
<i>CrUBQ11</i>	5'-ggaaggcattccaccagacca-3' 5'-tacctccccggagacgaagc-3'	131
<i>CrCyC</i>	5'-gtggctcgatggcaaacacg-3' 5'-gccgcagtctcaaccacaa-3'	127
<i>RPS9</i>	5'-tgaagccctttgaggaggatg-3' 5'-tgccatcccagacttgaaaaca-3'	139
<i>CrUBQ6</i>	5'-gaatcccaccggaccagcag-3' 5'-cctccacggagacgaaggaca-3'	124

La PCR en tiempo real se realizó en base a a García-Morales *et al.* (2014) en un detector de secuencia ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems®). Los valores de estabilidad de expresión ( $M$ ) de los genes de referencia se calcularon de acuerdo con Vandesompele *et al.* (2002):

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n - 1}$$

Donde: j y k= son genes referencia

n = es el número de repeticiones

#### 7.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico de los datos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, incluyendo tres tratamientos con seis repeticiones cada uno, y se consideraron los siguientes tratamientos: 1) plantas inoculadas con *Pseudomonas* sp (cepa OLS-SF5); 2) plantas fertilizadas orgánicamente al 100%; y 3) plantas testigo. Se establecieron tres pruebas experimentales independientes distribuidas en el tiempo, considerando los mismos tratamientos y número de repeticiones. Los datos fueron analizados mediante el programa SAS para Windows (SAS Institute Inc., 2006), realizando un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### 7.3. Resultados

La inoculación bacteriana y la fertilización orgánica incrementaron la altura de planta en comparación con plantas testigo; sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas

entre plantas fertilizadas o inoculadas (Figura 7.2A). La fertilización aumentó significativamente el número de hojas con respecto a la inoculación (Figura 7.2B).

La fertilización incrementó significativamente el área foliar específica en comparación con plantas inoculadas y testigo (Figura 7.3A). Las plantas fertilizadas mostraron mayores valores de EFFII, mientras que las plantas testigo tuvieron los menores valores. No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas entre plantas testigo y plantas inoculadas (Figura 7.3B).

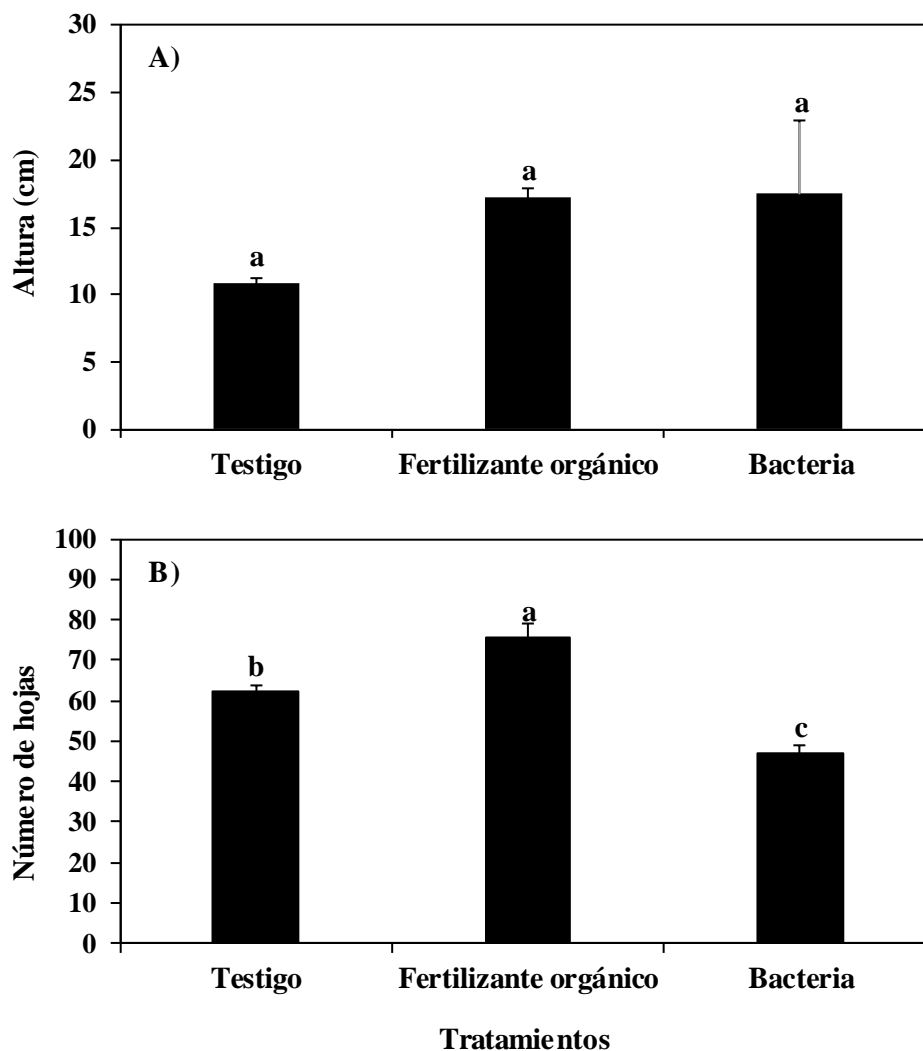
La fertilización orgánica incrementó el peso seco total de las plantas, en comparación con las plantas inoculadas y testigo, aunque las plantas inoculadas mostraron significativamente, menor peso seco total (Figura 7.4).

La eficacia de los métodos de extracción de RNA total en hojas fue diferencial, considerando la cantidad y la calidad de RNA extraído. En las plantas sometidas al fertilizante orgánico, los tres métodos de extracción fueron eficientes en rendimiento y calidad (Cuadro 7.2). Para la extracción de RNA en plantas inoculadas y plantas testigo, el mayor rendimiento y calidad de RNA se obtuvo únicamente mediante la extracción con Trizol (Cuadro 7.2).

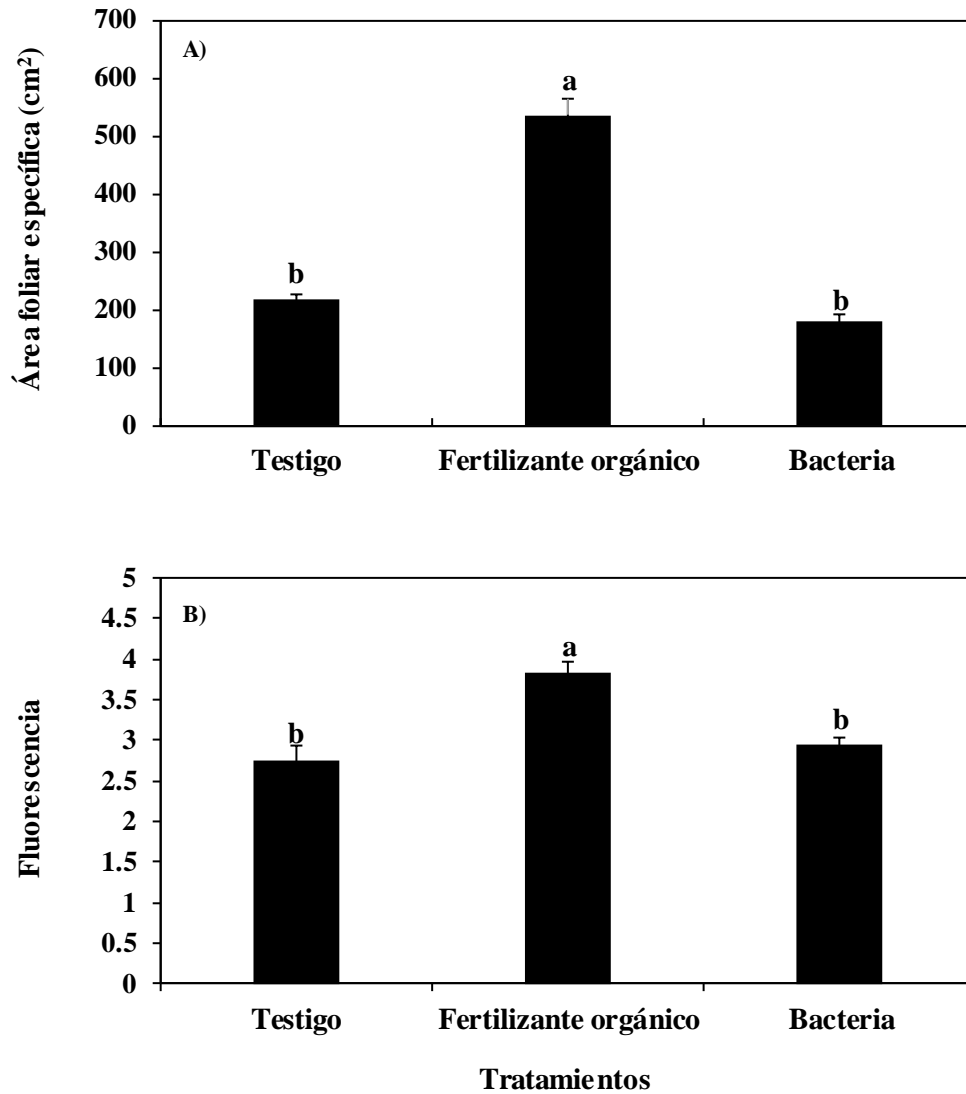
Los resultados muestran que los genes de referencia *RPS9* y *CrUBQ6* mostraron mayor estabilidad (menor valor de *M*), y su expresión no fue afectada significativamente por los tratamientos aplicados (Cuadro 7.3). Por lo tanto, estos genes de referencia fueron considerados para este análisis.

Los genes que presentaron mayor expresión fueron *ORCA3* y *TDC*; no obstante, el valor de expresión del gen *ORCA3* no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos (Cuadro 7.4). Para el gen *TDC* se observaron diferencias entre tratamientos, denotando que las plantas sometidas a fertilización orgánica mostraron mayor expresión. Resultados

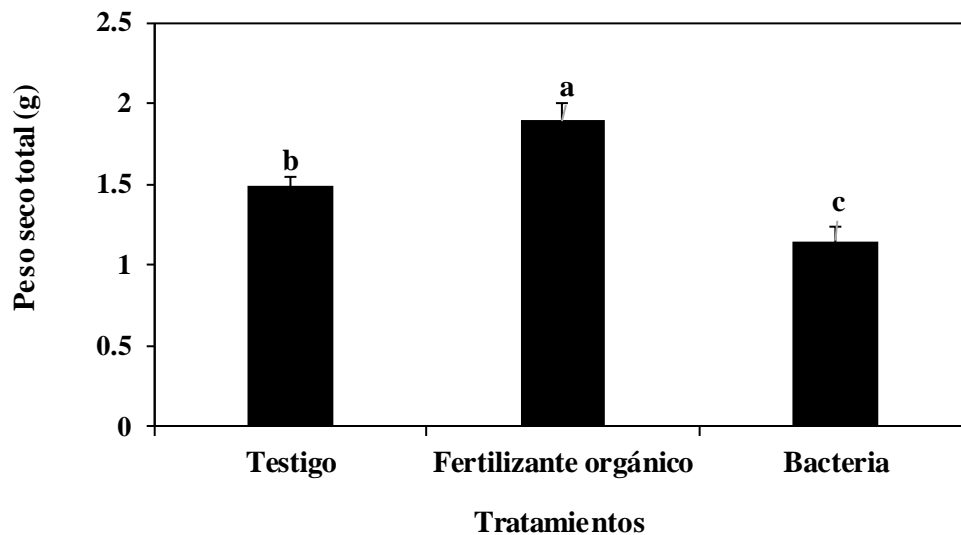
similares se observaron para la expresión del gen *D4H*, cuya expresión fue mayor en las plantas fertilizadas. La expresión del gen *STR* no fue afectada por el tratamiento aplicado; sin embargo, el valor más alto se obtuvo en las plantas fertilizadas (Cuadro 7.4).



**Figura 7.2.** Efecto de la inoculación de la bacteria *Pseudomonas* sp (OLS-SF5), y la aplicación de fertilizante orgánico (Floranid Master Extra) en la altura (A) y número de hojas (B) de plantas de *Catharanthus roseus*, después de 70 días. n= 18. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 7.3.** Efecto de la inoculación de la bacteria *Pseudomonas* sp (OLS-SF5), y aplicación de fertilizante orgánico (Floranid Master Extra) en el área foliar específica (A) y eficiencia fotoquímica del fotosistema II (B) de plantas de *Catharanthus roseus*, después de 70 días. n= 18. Medias  $\pm$  error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 7.4.** Efecto de la inoculación de la bacteria *Pseudomonas* sp (OLS-SF5), y la aplicación de fertilizante orgánico (Floranid Master Extra) en el peso seco total de plantas de *Catharanthus roseus*, después de 70 días. n= 18. Medias + error estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) entre tratamientos.

**Cuadro 7.2.** Rendimiento y pureza (260/280) del RNA extraído de hojas de *Catharanthus roseus*, de plantas sometidos a fertilización orgánica e inoculación por la bacteria *Pseudomonas* sp.

Métodos de extracción de RNA			
Tratamiento	QIAGEN RNeasy	Total RNA	TRIZOL
		IBI Scientific	TRIZOL® Reagent
Rendimiento (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )			
Testigo	83.2	105.7	962.9
Fertilizante			
orgánico	980.0	1808.0	3742.2
Bacteria	117.0	104.8	770.7

**Cuadro 7.3.** Valores de estabilidad de expresión ( $M$ ) de los genes de referencia *ORCA3*, *D4H*, *STR* y *TDC* en *Catharanthus roseus*.

Abreviación	Nombre del gen	Estabilidad de expresión ( $M$ )
<i>EF-1<math>\alpha</math></i>	Factor de elongación-1 $\alpha$	0.16
<i>UBQ11</i>	Poliubiquitin 11	0.12
<i>CyC</i>	Ciclophilin	0.10
<i>RPS9</i>	Ribosomal protein	0.09
<i>UBQ6</i>	Ubiquitin 6	0.09



**Cuadro 7.4.** Niveles de expresión de los genes *ORCA3*, *D4H*, *STR* y *TDC* implicados en la síntesis de alcaloides indol terpenoicos en las plantas de *Catharanthus roseus*, después de 70 días de crecimiento.

Nombre del gen	Expresión relativa	
	Fertilizante	Bacteria
<i>ORCA3</i>	2.00 a	1.61 a
<i>D4H</i>	1.98 a	1.16 b
<i>STR</i>	1.83 a	1.39 a
<i>TDC</i>	2.00 a	1.33 b

\*Valores obtenidos con referencia en el tratamiento testigo,

letras idénticas indica que son estadísticamente iguales (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ).

#### 7.4. Discusión

La fertilización promovió de manera eficaz el crecimiento de las plantas en comparación con plantas testigo. Los fertilizantes usados adecuadamente, suministran nutrientes al suelo, lo cual se ve reflejado en el crecimiento de las plantas (FAO, 2002). *Catharanthus roseus* es una planta medicinal y ornamental que presenta síntomas evidentes ante la deficiencia de nitrógeno, afectando con ello su crecimiento (Marschner, 1993; Logan *et al.*, 1999; Paul y Foyer, 2001). Lo anterior sugiere que esta planta requiere de aportes importantes de fertilizantes. La eficiencia de un fertilizante para satisfacer los requerimientos de las plantas, se relaciona con la limitada pérdida que puede tener por lavado o volatilización, así como en una rápida respuesta de crecimiento de las plantas (Fernández-Escobar *et al.*, 2004). En este sentido, la aplicación de fertilizantes orgánicos de liberación

lenta como fue el caso del Floranid, puede representar mínima pérdida de nutrientes, lo que contribuyó en estimulación del crecimiento de las plantas.

La producción de metabolitos secundarios está en parte, genéticamente determinada, pero en cierta medida puede ser influenciada positivamente por la fertilización, lo cual estimula el crecimiento y el rendimiento del cultivo (Finck, 1988). Nunes *et al.* (2009) reportan que la aplicación de bajas dosis fertilizantes aumenta el rendimiento de la materia seca de partes vegetativas y reproductivas en plantas de *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt, planta medicinal con propiedades antidepresivas (Ferraz *et al.*, 2001). Por otra parte, el metabolito secundario de *H. polyanthemum* aumentó debido al incremento significativo en el rendimiento de materia seca (Nunes *et al.*, 2009). Así mismo, las plantas de *Rosmarinus officinalis* L. incrementaron su rendimiento ante la aplicación de nitrógeno en comparación con las plantas no fertilizadas (Rao *et al.*, 1999). Ibraim *et al.* (2013) realizaron un estudio para comparar la producción de metabolitos secundarios en *Labisia pumila* Benth, en respuesta a dos fuentes de fertilizantes (orgánico e inorgánico), observando que la aplicación de fertilizante orgánico estimuló la producción de compuestos fenólicos totales, flavonoides, ácido ascórbico, saponinas y glutatión.

Por otra parte, en el presente estudio, la inoculación bacteriana no causó efectos positivos en la promoción del crecimiento de las plantas. La información publicada hasta el momento indica que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden utilizar diversos mecanismos, ya sea solos o en combinación, para colonizar con éxito la raíz, entre los cuales se encuentran la síntesis de aminoácidos, vitamina B (Simons *et al.*, 1997; Camacho *et al.*, 2002), lipopolisacáridos (Dekkers *et al.*, 1998), presencia de fimbrias (Vesper, 1987), entre otros. El efecto nulo de la inoculación de la bacteria, se puede explicar en parte debido a que algunos inoculantes no son capaces de mejorar el rendimiento de los

cultivos, debido a la ineficiencia de las bacterias para colonizar consistentemente la rizosfera (Loredo-Osti *et al.*, 2004). Además, el beneficio de las bacterias en el crecimiento de las plantas usualmente se correlaciona con su interacción con las condiciones experimentales o bien, con las características intrínsecas de la planta (Lucy *et al.*, 2004). Se ha observado que no todas las plantas pueden presentar una respuesta positiva en el crecimiento después de la inoculación por bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Capítulo V)

La inoculación bacteriana no produjo cambios significativos en la EFFII (Maxwell y Johnson, 2000; González *et al.*, 2008). Resultados similares fueron reportados por Del Amor y Porras (2009), al evaluar la influencia de dos bacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Azospirillum brasilense* y *Pantoea dispersa*) en plantas de *Capsicum annuum* L. con bajo suministro de nitrógeno, las cuales no mostraron modificaciones fisiológicas en el fotosistema II.

De Luca y Laflamme (2001) indicaron que la biosíntesis de alcaloides, en particular, se regula principalmente a nivel de la expresión de genes que catalizan pasos cruciales de biosíntesis de alcaloides indol terpenoides, cuya enzima triptófano descarboxilasa (*TDC*) ha sido ampliamente estudiada (De Luca y Cutler, 1987). Algunas investigaciones han determinado que la actividad de la *TDC* aumenta en cultivos de *C. roseus* en respuesta a estímulos externos, es decir, cuando las plantas fueron sometidas a la inoculación de microorganismos (Pasquali *et al.*, 1992) o bien, a la exposición a irradiaciones UV (Liu *et al.*, 2011). En este sentido, los resultados del presente trabajo muestran que otro factor que induce la expresión del gen que codifica para *TDC* es la aplicación de fertilizante orgánico.

La regulación de la expresión del gen *TDC* está regulada por factores externos; sin embargo, se reconoce que el tipo de tejido o la etapa fenológica vegetal tienen un papel crucial. Para este experimento se utilizaron hojas jóvenes, donde reportes previos indican que

en hojas jóvenes de *C. roseus*, la actividad del gen *TDC* es mayor con respecto a aquellas hojas maduras (Pasquali *et al.*, 1992). Es importante comentar que la sobreexpresión del gen *TDC* en *C. roseus* no se ha relacionado con mayor producción TIA, a pesar de que ocurre un aumento en su actividad (Moreno *et al.*, 1995).

La sobreexpresión del gen deacetoxivindolina 4-hidroxilasa (*D4H*) está regulada por el fitocromo, el cual está implicado en la regulación de la biosíntesis de vinblastina (Aerts y De Luca, 1992). Para este estudio la fertilización orgánica produjo mayor expresión del gen *D4H* por lo que presumiblemente se podría encontrar mayor concentración de vinblastina en las plantas fertilizadas, en comparación con las plantas inoculadas y con respecto al testigo. Sin embargo, el contenido de este alcaloide no se consideró en este trabajo.

Las células vegetales deben regular las vías de su metabolismo primario para que la biosíntesis de metabolitos secundarios se lleve a cabo. Aparentemente, el factor de transcripción *ORCA3* actúa como un regulador central de flujos metabólicos directos en la biosíntesis de TIA mediante la regulación de los genes implicados en el metabolismo primario y secundario (Memelink *et al.*, 2001). Por otra parte, la expresión *ORCA3* induce la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de TIA, entre estos genes está el gen que codifica para la enzima estrictosidina sintasa (*STR*) (van der Fits y Memelink, 2001; Li *et al.*, 2015). Lo anterior explica porqué en las plantas fertilizadas o en aquellas inoculadas se observó que a mayor expresión del gen *ORCA3*, mayor expresión del gen *STR*. considerando entonces que la expresión de *ORCA3* no presentó diferencias entre tratamientos (Cuadro 7.3), posiblemente por esta razón el gen *STR* tampoco presentó diferencias entre tratamientos.

## 7.5. Conclusiones

La aplicación de Floranid Master Extra (NPK 19-5-10) al 100%, estimuló el crecimiento de plantas de *Catharanthus roseus*; en contraste, la inoculación de *Pseudomonas* sp, como bacteria promotora del crecimiento vegetal, no produjo resultados positivos en el crecimiento ni en la eficiencia del fotosistema II de las plantas. En contraste, la aplicación de fertilizante orgánico contribuyó a mejorar la eficiencia del fotosistema II.

La fertilización o la inoculación bacteriana modificó la expresión de genes involucrados en la síntesis de alcaloides indol terpenoides (TIA). Las plantas fertilizadas mostraron un aumento en la expresión de los genes *ORCA*, *D4H*, *STR*, y *TDC*; sin embargo, sólo se apreciaron diferencias consistentes en la expresión de los genes *TDC* y *STR*. En tanto, la inoculación bacteriana no influyó en la sobreexpresión de genes, exhibiendo valores más bajos en comparación con la fertilización. El gen que presentó mayor valor de expresión en las plantas inoculadas, fue el *STR*, sin embargo, no mostró diferencias significativas con respecto a la fertilización. Estos datos proporcionan información importante para poder correlacionar la fertilización orgánica no sólo exclusivamente con el incremento en el crecimiento en plantas de *Catharanthus roseus*, sino probablemente en el incremento en la concentración de metabolitos secundarios importantes en el combate del cáncer.

## CAPÍTULO VIII

### CONCLUSIONES GENERALES

Para el cultivo de *C. roseus* y *C. officinalis* se debe elegir el tipo de fertilización nitrogenada, así como una concentración óptima para la obtención de plantas sanas. Las plantas de *C. roseus*, bajo las condiciones del presente experimento, respondieron significativamente a la aplicación de la fertilización orgánica aplicada al 100%, mientras que para *C. officinalis* la fertilización inorgánica con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a una concentración de 16 mM, resultó en mayor beneficio.

Ambas plantas evidenciaron mejor respuesta en el desarrollo vegetal al ser inoculadas con la bacteria *Pseudomonas* sp. (OLS-SF5). Las plantas de *C. roseus* mostraron mayor altura, peso seco total, peso seco de hoja y área foliar; mientras que las plantas de *C. officinalis* mostraron mayor altura y área foliar. Sin embargo, para *C. officinalis*, en las variables peso seco total, peso seco de hoja y área foliar específica la inoculación combinada de todas las cepas bacterianas (tratamiento denominado mixto) produjo mejores resultados. Ambas especies vegetales no reflejaron cambios en la eficiencia del fotosistema II ante la inoculación.

Para el cultivo de plantas de *C. roseus* y *C. officinalis* se recomienda la combinación de la bacteria promotora del crecimiento vegetal, perteneciente al género *Pseudomonas* y la aplicación de fertilizante. No obstante, para *C. roseus* se sugiere el uso de fertilizante orgánico, y para *C. officinalis* fertilizante inorgánico, pues bajo las condiciones establecidas, se obtuvo mayor crecimiento de ambas especies medicinales, utilizando dicha fertilización.

Para la obtención de extracto antineoplásico con alto grado citotoxicidad en células cancerosas, pero menor en células epiteliales y macrófagos, se sugiere en *C. roseus* únicamente la aplicación de fertilizante orgánico; en *C. officinalis* se sugiere la combinación del fertilizante inorgánico y la inoculación con la bacteria *Pseudomonas* sp (OLS-SF5).

La fertilización orgánica aumentó la expresión de los genes *ORCA*, *D4H*, *STR*, y *TDC*, en la especie vegetal *C. roseus*; sin embargo, sólo se apreciaron diferencias consistentes en la expresión de los genes *TDC* y *STR*.

La inoculación bacteriana no influyó en la sobreexpresión de los genes, *ORCA*, *D4H*, *STR*, y *TDC*, exhibiendo los valores más bajos en comparación con la fertilización. El gen que presentó mayor sobreexpresión fue *STR*; sin embargo, no mostró diferencias significativas con respecto a las plantas fertilizadas.

Finalmente se concluye que la efectividad biológica en los extractos obtenidos de las plantas medicinales evaluadas es diferencial. Para *C. roseus* se obtuvo mejor efectividad biológica del extracto obtenido de las hojas, cuando se le aplicó exclusivamente fertilizante orgánico y no ante la inoculación bacteriana como se sugería inicialmente. Para los extractos de *C. officinalis*, la mayor efectividad del extracto de flores se obtuvo al fertilizar las plantas inorgánicamente e inocular la bacteria promotora de crecimiento vegetal, *Pseudomonas* sp (OLS-SF5).

## LITERATURA CITADA

- Acosta, De la L. L., Rodríguez, F. C., y Sánchez, G. E. 2001. Instructivo técnico para el cultivo de *Calendula officinalis*. Revista Cubana de Plantas Medicinales 1: 23-27.
- Acosta, De la L. L., y Rodríguez, F. C. 2002. Instructivo técnico para el cultivo de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Vicaria. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 7: pp0.
- Acosta, G., A. 2006. El fibroblasto: su origen, estructura, funciones y heterogeneidad dentro del periodonto. Universitas odontológica 25:26-33.
- Adesemoye, A.O., TorbertJ, H.A. y Kloepper, W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. Microbial Ecology 58: 921–929.
- Aerts, R.J., y De Luca., V. 1992. Phytochrome is involved in the light regulation of vindoline biosynthesis in *Catharanthus*. Plant Physiology 100: 1029-1032.
- Aguirre, M.J., Irizar, G.M., Durán, P.A., Grajeda, C.O., Peña, del R.M., Loredó, C. y Gutiérrez, B.A. 2009. Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México, INIFAP, México.
- Ahemad, M. y Saghir, K. M. 2011. Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: Recent advancements. Insight Microbiology 1:39-54
- Alavanja, M., C., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C. F., Knott, T., Hoppin, J.A., Barker, J., Coble, J., Sandler, D.P., y Blair, A., 2003. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the agricultural health study cohort. American Journal of Epidemiology 157: 800-814.
- Albújar, B.P. 2006. La epidemiología del cáncer, Academia Nacional de Medicina - Anales 119-122.



- Alcántar-González, G., Trejo-Téllez, L.I., 2010. Nutrición de cultivos. Mundi-Prensa México pp 451.
- American Cancer Society, 2012. Datos y estadísticas sobre el cáncer entre los hispanos/latinos 2012-2014.
- Andreu, J., Betrán, J., Delgado, I., Espada, J.L., Gil, M., Gutiérrez, M., Iguácel, F., Isla, R., Muñoz, F., Orús, F., Pérez, M., Quílez, D., Sin, E., Yagüe, M.R. 2006. Fertilización nitrogenada. Guía de actualización. Gobierno de Aragón. Departamento de Agricultura y Alimentación. pp 196.
- Anjana, S. y Muhammad, I. 2007. Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 27: 45-57.
- Antoun, H. y Prevost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: Siddiqui ZA (ed) PGPR: biocontrol and biofertilization. Springer, Netherlands, pp 1–38.
- Araujo, C., B., O., Santos, A., M., Fernandes, L., A., Martins, E., R., Sampaio, R.,A., Costa, C.,A., y Leite, G., L., D. 2009. Uso da adubação orgânica e cobertura morta na cultura da caléndula (*Calendula officinalis* L.). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2:117-123.
- Aristil, Ch. P. M. 2013. Manual de farmacología básica y clínica. McGraw-Hill. México. pp 200. ISBN 978-607-15-0911-6.
- Artico, S., Nardeli, S.M., Brilhante, O., Grossi-de-Sa, M.F., y Alves-Ferreira, M. 2010. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RTPCR data. *BMC Plant Biology*. ; 10: 49. doi: 10.1186/1471-2229-10-49 PMID: 20302670
- Asensi, M. Ortega, A., Mena, S., Feddi, F., y Estrela, J. M. 2011. Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48: 197–216.

- Aslam, J., Mujib, A., Nasim, S.A., y Sharma, M.P., 2009. Screening of vincristine yield in ex vitro and in vitro somatic embryos derived plantlets of *Catharanthus roseus* L. (G) Don. *Scientia Horticulturae* 119: 325–329.
- Bacilio-Jiménez, M., Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Pérez-Campos, E., Bouquelet, S., y Zenteno, E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil* 249: 271-277.
- Badri, D.V., Weir, T. L., van der Lelie, D., y Vivanco, J.M. 2009. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 20:642–650.
- Bair, C. 2001. *Química ambiental*. Editorial Reverte. España. pp 622.
- Baker, N.R., y Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55:1607–1621.
- Ballester-Olmos, J.F., 1995. Abonos nitrogenados de liberación lenta. Ministerio de agricultura pesca y alimentación. Secretaria General de estructuras agrarias. Madrid, España. pp 1-20.
- Bashan, Y. y Bashan, L.E. 2005 Bacteria, pp 103-115. In: Hillel D., (ed). *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford, U.K. Vol.1.
- Bashan., Y., y Bashan, L.E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. *Advances in Agronomy* 108:77–136.
- Benedí, J y Gómez del RA. 2006. Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional* 2: 60-64.
- Berg, G., y Smalla, K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:1-13.
- Beyaert, R.P. 2006. Influence of nitrogen fertilization on the growth and yield of North American Ginseng. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 11:65-80.

- Bhattacharyya, P. N., y Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agricultura. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1327–1350.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2013. Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, México.
- Bielski, S. y Szwejkowska, B. 2013. Effect of fertilization on the development and yields of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *Herba Polonica* 59: 5-12.
- Biesiada, A., Kuś, A. 2010. The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Horticulture*. 9: 3–12.
- Björkman, O., y Demming, B. 1987. Photo yield of O evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489–504.
- Bonadanna, G., Rossi, A., y Valagussa, P. 1985. Adjuvant CMF chemotherapy in operable breast cáncer: Ten years later. *Lancet* 1: 976.
- Borella, J.C., Ribeiro, N.S., Freato, A.M.R., Mazzo, K.F. y Barbosa, D.M. 2011. Influência da adubação e da cobertura morta na produtividade e no teor de flavonóides de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2: 235-239.
- Boussadia, O., Steppe, K., Zgallai, H., Ben El Hadj, S., Braham, M., Lemeur, R., y Van Labeke, M.C., 2010. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars ‘Meski’ and ‘Koroneiki’. *Scientia Horticulturae* 123, 336–342.
- Bouwmeester, H.J., Roux, Ch., López-Raez, J.A., y Becard, G. 2007. Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends in Plant Science* 12: 224-230.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., y Sessitsch, A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30–37.

- Bray, F.L., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., y Forman, D. 2012. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *The Lancet Oncology* 13: 790-801.
- Bredel, M. 2001. Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain Research Reviews* 35:161-204.
- Bringhurst, R.M., Cardon, Z.G. y Gage, D.J. 2001. Galactosides in the rhizosphere: Utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 4540-4545.
- Butler, M. 2005. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 283–291.
- Cairns, J. 1981. *Cáncer: Ciencia y sociedad*, Reverte, España. pp 2010.
- Camacho C. M.M., Wijfjes, A.H.M., Mulders, I.H.M., Lugtenberg, B.J.J., y Bloemberg, G.V. 2002. Characterization of NADH dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 and their role in competitive root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 662-671.
- Cano, M., A., 2011. interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* 14: 15-31.
- Carrillo-Castaneda, G., Juárez-Muños, J., Peralta-Videa, J.R., Gomez, E., Tiemannb, K.J., Duarte-Gardea, M., y Gardea-Torresdey, J.L. 2002. Alfalfa growth promotion by bacteria grown under iron limiting conditions. *Advances in Environmental Research* 6: 391–399.
- Carteaux, F., Thibaud, M.C., Zimmerli, L., Lessard, P., Sarrobert, C., David, P., Gerbaud, A., Robaglia, C., Somerville, S., y Nussaume, L. 2003. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *The Plant Journal* 36: 177–188.

- Castells, M.S., y Hernández, P.M. 2007. Farmacología en enfermería. Elsevier. Madrid, España. Pp 655.
- Cearra, I., Gancho, G., y Castrillo, E. 2009. Intoxicación por colchicina: Revisión a propósito de un caso. *Revista Biomédica* 106:22-27.
- Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A., y Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34:33–41.
- Compant, S., Clement, C., y Sessitsch, A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology y Biochemistry* 42:669-678.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, Ch., y Barka, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951–4959.
- Copetta, A., Lingua, G., y Berta G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza* 16:485–494.
- Cortinas, C. 1990. Cáncer, herencia y ambiente, Fondo de cultura económica, México. pp 51.
- Curl, E.A., y Truelove, B. 1986. The Rhizosphere. Springer Verlag, Berlin, 1986, pp. 288
- Dan, T.V., KrishnaRaj, S, y Saxena, P.K. 2000. Metal tolerance of scented geranium (*Pelargonium* sp. ‘Frensham’): effects of cadmium and nickel on chlorophyll fluorescence kinetics. *International Journal of Phytoremediation* 2:91–104.
- De la Garza, S.J. y Juárez S.P. 2014. El cáncer. Universidad Autónoma de Nuevo León. 188 pp.
- Acosta, L.L., Rodríguez, F.C. y Sánchez, G.E. 2001. Instructivo técnico de *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 1:23-7

- De la Rosa, D., 2008. Evaluación agro-ecológica de suelos. Para un desarrollo rural sostenible. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp 404.
- De la Rosa-Mera, C.J., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Sánchez-Colín, Ma. de J., y Muñoz-Muñiz, O.D. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and potassium bicarbonate enhance the foliar content of the vinblastine alkaloid in *Catharanthus roseus*. *Plant and Soil* 349:367–376.
- De la Rosa-Mera, C.J., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Sánchez-Colín, Ma. de J, y Franco-Ramírez, A. 2012. Aislamiento de consorcios de hongos micorrícicos arbusculares de plantas medicinales y su efecto en el crecimiento de vinca (*Catharanthus roseus*). *Revista Chilena de Historia Natural* 85:187-198.
- De Luca, V. y Cutler, A.J. 1987. Subcellular localization of enzymes involved in indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology*. 85: 1099-1102.
- De Luca, V. y Laflamme, P. 2001. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 4:225–233.
- Dekkers, L.C., Phoelich, C.C., van der Fits, L., y Lugtenberg, B.J.J. 1998. A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 7051-7056
- Del Amor, F. M. y Porras, I. 2009. Effects of plant-growth-promoting bacteria on growth and yield of pepper under limited nitrogen supply. *Canadian Journal of Plant Science* 89:349-358.
- Dewick, P.M. 2002. Alkaloids, in: medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 350–359.
- Di Lonardo, A., Nasi, S., y Pulciani, S. 2015. Cancer: We Should Not Forget The Past. *Journal of Cancer* 6: 29-39.
- Diaz, R. J., y Rosenberg, R. 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science* 321:926-929.

- Díaz-Rubio, E., y García-Conde, J. 2000. *Oncología Clínica Básica*. Arán. pp 759. ISBN 84-86725-60-7.
- Diez, J.A., Roman, R., Cartagena, M.C., Vallejo, A., Bustos, A. y Caballer, R. 1994. Controlling nitrate pollution of aquifers by using different nitrogenous controlled release fertilizers in maize crop. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 48:49-56.
- Dirzo, R. 1985. Metabolitos secundarios en las plantas ¿atributos panglossianos o de valor adaptativo. *Ciencia* 36: 137-145.
- Don, G. 2003. *Catharanthus roseus*. In I A Ross (ed.). *Medicinal plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern uses*, vol. 1. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, 175–196.
- Dosne, P.Ch. 2006. Las células HeLa como prototipo del cultivo celular inmortalizado. *Medicina (Buenos Aires)* 66: 487-488.
- Drogue, B., Dore, H., Borland, S., Wisniewski-Dye, F., y Prigent-Combaret, C. 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? . *Research in Microbiology* 163: 500-510.
- Duffin, J., 2000. Poisoning the spindle: serendipity and discovery of the anti-tumor properties of the vinca alkaloids. *Canadian Bulletin of Medical History* 17: 155–192.
- Dufour, L., y Gueirin, V., 2003. Growth, development features and flower production of *Anthurium andreanum* Lind. in tropical conditions. *Scientia Horticulturae* 98:25–35.
- Dzida, K., y Jarosz, Z. 2006. Plonowanie i skład chemiczny majeranku ogrodowego (*Origanum majorana* L.) w zależności od zróżnicowanego nawożenia azotowo-potasowego. *Acta Agrophysica* 7: 561–566.

- Engel, N., Oppermann, C., Falodun, A., y Krogl, U. 2011. Poliferative effects of five traditional Nigerian medicinal plant extracts on human breast and bone cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 137:1003-1010.
- Erisman, J.W., Galloway J., Seitzinger S., Bleeker A. y Butterbach-Bahl K. 2011. Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3:281–290.
- Espinosa, R.R., Herrera, I.L., Bravo, S.L.R., Hernández, A.M., Torres, G.S., Ramos, G.Y., y Espinosa M.M. 2012. Efecto sinérgico de taninos y flavonoides presentes en *Terminalia catappa* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* 16: 27-32.
- Espinosa-Galván, D., y Rodríguez-Landa, J.F. 2004. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas, *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 15, pp. 123-136.
- Facchini, P.J., y De Luca, V. 2008. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The Plant Journal* 54 :763–784.
- Facchini, P.J., y St-Pierre, B. 2005. Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 657–666.
- FAO. 2002. Los fertilizantes y su uso.
- Fernández-Escobar, R., Benlloch, M., Herrera, E., y García-Novelo, J.M. 2004. Effect of traditional and slow-release N fertilizers on growth of olive nursery plants and N losses by leaching. *Scientia Horticulturae* 101: 39–49.
- Ferraz, A.B.F., Bordignonb, S.A.L., Staatsa, Sh., Schripsemac, J., y von Posera, G. L. 2001. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry* 57:1227–1230.
- Finck, A. 1988. Fertilizantes y fertilización de los cultivos. Ed. Reverté. Barcelona, España.



- Fonseca, M.G. 2012. Patología forense latinoamericana: alcances y necesidades. *Medwave* 12:1-6.
- Frankenberger W.T.J., y Arshad, M. 1995. *Phytohormones in soil: microbial production and function*. Dekker, New York. 503pp.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., y Sarniguet, A. 2011. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 583–609.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J., y Tarkka, M., 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22-36.
- Furuuchi, H., Jenkins, M.W., Senock, R.S., y Houpis, J.L.J., 2013. Estimating plant crown Transpiration and water use efficiency by vegetative reflectance indices associated with chlorophyll fluorescence. *Open Journal of Ecology* 3: 122–132.
- García, D.E. 2004. Los metabolitos secundarios de especies vegetales. *Pastos y forrajes* 27: 1-12.
- García-Morales, S., Gómez-Merino, F. C. y Trejo-Téllez, L. I. 2014. NAC transcription factor expression, amino acid concentration and growth of elite rice cultivars upon salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 36:1927–1936.
- Gidding, C.E.M., Kellie, S.J, Kamps, W.A., y de Graaf, S.S.N. 1999. Vincristine revisited. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 29:267–287.
- Gill, S.S., Khan, N.A., y Tuteja, N. 2012. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Science* 182:112–120.
- Gillet, N.A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., Berry, C., Bushman, F.D., Taylor, G.P., Bangham, C.R. 2011. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* 117: 3113-22.

- Glick, B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation Scientifica.<http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.
- GLOBOCAN. 2008. IARC.
- Golcz, B., Politycka, B., y Seidler-Łożykowska, K. 2006. The effect of nitrogen fertilization and stage of plant development on the mass and quality of sweet basil leaves (*Ocimum basilicum* L.). *Herba Polonica* 52: 22–30.
- Gómez-Merino, F.C., Trejo-Téllez, L.I. y Alarcón, A. 2015. Plant and microbe genomics and beyond: potential for developing a novel molecular plant nutrition approach. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:208.
- González, B.J. 2000. Biología molecular en el cáncer ginecológico, pp. 1-23. In González-Merlo, J y González, B. *Ginecología Oncológica*. Ed. Masson, España.
- González, M.S., Perales V.H., y Salcedo, A.M. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica, UNAM* 27: 119-129.
- Gordon, M.C., y Newman, D.J., 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 100, 72-79.
- Gray, E.J., y Smith, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* 37:395–412.
- Gupta, R., 1977. Periwinkle—produces anticancer drug. *Indian Farming* 7:11–13.
- Hajdu, S.I. 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, Part 1. *Cancer*.117:1097-1102.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., y van Elsas J.D. 2001. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiology* 16: 463-471.
- Hartmann, A., Rothballer, M., y Schmid, M. 2008. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312:7-14.

- Hartmann, T. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831–2846.
- Hasan, S.A., Hayat, S., y Ali, B.A. 2008. 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environ Pollut* 151:60–66.
- Higaki, T., Imamura, J.S., y Paull, R.E., 1992. N. P, and Krates and leaf tissue standards for optimum *Anthurium andreanum* flower production. *Hortscience* 27: 909–912.
- Hill, A. F., 1989. *Economy Botany: A text book of useful plants and plant products*, 2da Ed. McGraw Hill Book, INC., New York.
- Hiltner, L. 1904. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft* 98: 59-78.
- Höfte, M., Seong, K.Y., Jurkevitch, E., y Verstraete, W. 1991. Pyoverdinin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2: Ecological significance in soil. *Plant Soil* 130: 249-257. INIFAP
- Huang, Ch., y Freter, C. 2015. Lipid metabolism, Apoptosis and Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 924-949.
- Hussain, S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, A., Iffat-Zareen, y A., Saeed, M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 4: 10-20.
- Ibrahim, M. H., Jaafar, H. Z. E., Karimi, E., y Ghasemzadeh, A. 2013. Impact of organic and inorganic fertilizers application on the phytochemical and antioxidant activity of Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). *Molecules* 18: 10973-10988.

- Israr, M., Jewell, A., Kumar, D., y Sahi, S.V. 2011. Interactive effects of lead, copper, nickel and zinc on growth, metal uptake and antioxidative metabolism of *Sesbania drummondii*. *Journal of Hazardous Materials* 186:1520–1526.
- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R., y Panneerselvam, R. 2007. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60:7-11.
- Jimenez-Garcia, S. N., Vazquez-Cruz, M. A., Guevara-Gonzalez, R. G., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernandez, A., y Feregrino-Perez, A. A. 2013. Current approaches for enhanced expression of secondary metabolites as bioactive compounds in plants for agronomic and human health purposes – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 63: 67-78
- Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Madana, R. M., Athira, K.V., Gogoi, R., y Barua, Ch. C. 2015. Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicology Letters* 233: 214–225.
- Kloepper, J.W.1997. Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In *Azospirillum/Plant Associations*. ed. Okon, Y., CRC Press, Boca Raton, pp. 137–166.
- Koller, M., Koch, R. y Degen, B., 2014. Fertilisation strategies in organic ornamental plants. *Acta Horticulturae* 1041: 47-52.
- Kooten, O.V., y Snel, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147-150.
- Kretzmer, G. 2002. Industrial processes with animal cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:135–142.

- Król, B. 2011. Yield and the chemical composition of flower heads of pot marigold (*Calendula officinalis* L. cv. Orange King) depending on nitrogen fertilization. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 10: 235-243.
- Kumar, S., Kalra, S., Singh, B., Kumar, A., Kaur, J., y Singh, K. 2016. RNA-Seq mediated root transcriptome analysis of *Chlorophytum borivilianum* for identification of genes involved in saponin biosynthesis. *Functional & Integrative Genomics* 16:37–55.
- Lastra, V.H. y Piquet, GR. 1999. *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia* 33:188-194.
- Lata, B., 2007. Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. *Phytochemistry Reviews* 6: 403–411.
- Li, Ch. Y., Leopold, A. L., Sander, G. D., Shanks, J. V., Zhao, L., y Gibson, S. I. 2015. CrBPF1 overexpression alters transcript levels of terpenoid índole alkaloid biosynthetic and regulatory genes. *Frontiers in Plant Science* 6: 1-13
- Li, S.L., Yang, W.H., Yang, T.T., Chen, Y., y Ni, W.Z., 2015. Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyia* cadmium accumulating plant. *International Journal of Phytoremediation* 17:85-92
- Liang, L.Z., Zhao X.Q., Yi X.Y., Chen Z.C., Dong X.Y., Chen R.F. y Shen R.F. 2013. Excessive application of nitrogen and phosphorus fertilizers induces soil acidification and phosphorus enrichment during vegetable production in Yangtze River Delta, China. *Soil Use Manage.* 29:161–168.
- Liu, M., Huang, H-H., Yang, J., Su, Y-P., Lin, H-W., Lin, L-Q., Liao, W-J., y Yu Ch-X. 2013. The active alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth. are potent anxiolytics. *Psychopharmacology* 225:839–851.

- Liu, Y., Zhao, D-M., Zui, Y-G., Tang, Z-H., Zhang, Z-H., Jiang, Y., y Shi, D-Y. 2011. Effects of low light on terpenoid indole alkaloid accumulation and related biosynthetic pathway gene expression in leaves of *Catharanthus roseus* seedlings. *Botanical Studies* 52: 191-196.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudara, P., Kaiser Ch.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L. y Darnell J. 2006. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Medica Panamericana, Argentina. Pp 1054.
- Logan, B.A., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T.N., y Adams, W.W. 1999. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. *Planta* 209, 213–220.
- Loomis, R.S., y Connor, D.J. 2002. *Ecología de cultivos. Productividad y manejo en sistemas agrarios*. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp 591.
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L. y Espinoza-Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión *Terra Latinoamericana* 22: 225-239.
- Lu, Ch., Hawkesford, M. J., Barraclough, P. B., Poulton, P. R., Wilson, I. D., Barker, G. L., y Edwards, K. J. 2005. Markedly different gene expression in wheat grown with organic or inorganic fertilizer. *Proceedings of the Royal Society B* 272: 1901–1908.
- Lucy, M., Reed, E., y Glick, B.R. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 1–25.
- Lugtenberg, B.J.J, Dekkers, L. y Guido, V.B. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* 39: 461–490.
- Machado, R. L. 2000. Preparación de tinturas para uso homeopático. pp. 61-70. *In*: R. Pinzón (ed.). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Convenio Andrés Bello. Bogotá. Colombia.
- Mader, S. 2008. *Biología* 9ª Ed. MacGraw Hill, México. pp 1040.

- Man, S. Gao, W., Wei, Ch., y Liu, Ch. 2012. Anticancer drugs from traditional toxic chinese medicines. *Phytotherapy Research* 26: 1449-1465.
- Marasco, R., Rolli, E., Vigani, G., Borin, S., Sorlini, C., Ouzari, H., y Zocchi, G. 2013. Are drought-resistance promoting bacteria cross-compatible with different plant models? . *Plant Signaling & Behavior* 8: 1559-2324.
- Marschner, H., 1993. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London. pp 645.
- Martínez, M.T., García, F., Hernández, M.J., Manzanera-Saura, J.T. y Garrigós, J.A. 2002. Los citostáticos, *Enfermería Global* 1:1-16.
- Martínez, P.I. 2000. Las plantas medicinales, *Revista Cubana de Oncología* 16: 66.
- Martinez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G., y Mora, M.L. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10:293–319.
- Matsuura, H.N., Rau, M.R., y Fett-Neto, A.G., 2013. Oxidative stress and production of bioactive monoterpene indole alkaloids: biotechnological implications. *Biotechnol Lett* DOI 10.1007/s10529-013-1348-6.
- Maxwell, K., y Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – A practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659–668.
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S., y Bharti, S., 2010. Chlorophyll a fluorescence study Revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:16–20.
- Memelink, J., Verpoorte, R. y Kijne, J.W. 2001. ORCANization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism. *TRENDS in Plant Science* 6: 212-219.
- Miñana, V. 2009. Drinking water in infants. Is there any ideal composition?. *Acta Paediatrica Española*. 67: 255-266.

- Mitrus, I., Bryndza, E., Sochanik, A., y Szala, S. 2012. Evolving models of tumor origin and progression 33: 911–917.
- Monge-Nájera, J., Gómez, F.P., y Rivas R.M. 2005. Biología General. Editorial Universidad Estatal a Distancia San José, Costa Rica. pp521.
- Moreno, P. R. H., Van der Heijden, R., y Verpoorte, R. 1995. Cell and cultures on *Catharanthus roseus*: A literature suvey. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42, 1-25.
- Mukherjee, A. K., Basu, S., Sarkar, N., y Ghosh, A.C., 2001. Advances in cáncer therapy with plant based natural products. Current Medicinal Chemistry 8: 1467–1486.
- Muni Ram, Patra, D., y Sushil Kumar. 1997. Nitrogen Fertilization of Palmarosa in Continuous Cropping, Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 5:1, 53-61.
- Muñoz, F 2002, Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado, Mundi-prensa, España. pp 365.
- Navarro, M., y M., C. 2005. Los productos naturales en la innovación farmacológica. Revista de Fitoterapia 5: 41-53.
- Newman, D. J., Cragg, G.M., y Snader, K. M. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. Journal Natural of Products 66: 1022-1037.
- Nor Hazwani, A., Rohanizah, A. R., y Ishak, M. 2010. *Catharanthus roseus* aqueous extract is cytotoxic to jurkat leukaemic T-cells but induces the proliferation of normal peripheral blood mononuclear cells. Tropical Life Sciences Research 21:101–113.
- Nunes. De M. J., Valle, P. A., von Poser, L. G. y Rech, S.B. 2009. Promotive effects of long-term fertilization on growth of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization. Industrial Crops and Products 30: 329–332
- Nunnery, J.K., Mevers, E., Gerwick, W.H. 2010. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. Current Opinion in Biotechnology. 21: 787-793.



- Ober, D. y Kaltenecker, E. 2009. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 70:1687–1695.
- Ocampo, RA 2002, Situación actual del comercio de plantas medicinales en América Latina, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 1: 35-40.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2003. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Catalogación por la Biblioteca de la OMS.
- Overby, A., Zhao, Ch., y Chen D. 2014. Plant phytochemicals: potential anticancer agents against gastric cancer. *Current Opinion in Pharmacology*. 19:6–10.
- Pahlow, M. 1994. El gran libro de las plantas medicinales. Salud a través de las fuerzas curativas de las plantas. Everest. España. ISBN-13: 978-8424121051.
- Papazisis, K.T., Geromichalos, G.D., Dimitriadis, K.A. y Kortsaris, A.H. 1997. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods* 208: 151–158.
- Parmar, N., y Dufresne, J. 2011. Beneficial interactions of plant growth promoting rhizosphere microorganisms. In: Singh A *et al* (eds) Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol, soil biology, vol 28. Springer, Berlin, pp 27–42.
- Pasquali, G., Giancarlo, Goddijn O. J. M., de Waal, A., Verpoorte, R., Schilperoort, R. A. Hoge, J. H. C. y Memelink, J. 1992. Coordinated regulation of two indole alkaloid biosynthetic genes from *Catharanthus roseus* by auxin and elicitors. *Plant Molecular Biology* 18: 1121-1131.
- Paul, M.J., y Foyer, C.H. 2001. Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52: 1383– 1400.
- Pérez, A.J.A., García, M. E., Enríquez, Q. J. F., Quero, C.A.R., Pérez, P.J. y Hernández G.A. 2004. A growth analysis, specific leaf area and leaf nitrogen concentration in “mulato” grass (*Brachiaria híbrida* cv) *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 42: 447-458 (In Spanish).

- Porta-Casanellas, J., López-Acevedo, R.M. y Roquero de Laburu, C. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 929 pp.
- Pozo, M.,J., y Azcón-Aguilar, C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10:393–398.
- Rai, A., Smita, S.S., Singh, A. K., Shanker, K., y Nagegowda D. A. 2013. Heteromeric and homomeric geranyl diphosphate synthases from *Catharanthus roseus* and their role in monoterpene indole alkaloid biosynthesis. *Molecular Plant* 6:1531–1549.
- Rao, E. V. S. P., Gopinath, C.T., Rao, R. S. G., y Ramesh, S. 1999. Agronomic and distillation studies on rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in a Semi-Arid Tropical Environment *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 6:25-30.
- Rao, S.R., y Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 20:101–153.
- Rashid, S., Charles, T.C, y Glick B.R. 2012. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology* 61: 217– 224.
- Rebrikov, D. V. y Trofimov, D. Y. 2006. Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 455–463.
- Richter, E. 2015. Biomonitoring of human exposure to arylamines. *Frontiers in Bioscience- Elite* 7: 222-238.
- Rodríguez, E.J. 1978. *Oncología médica*, Ed. Marín, Barcelona, España pp. 228.
- Rodríguez, H, y Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319–339.
- Rodríguez, J.C. 2008, Quimioterapia antineoplásica en animales domésticos, REDVET, Revista electrónica de Veterinaria 9: 1-30.

- Rojas-Espinoza, O. 2006. Inmunología (de memoria). Editorial Medica Panamericana. México. pp 489.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Paré, P.W., y Kloepper, J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100:4927–4932.
- Saharan, B.S., y Nehra V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research 21: 1-30.
- Saidana, D., Braham, M., Boujnah, D., Ben Mariem, F., Ammari, S., Ben El Hadj, S., 2009. Nutrient stress, ecophysiological, and metabolic aspects of olive tree cultivars. Journal Plant Nutrition 32, 129–145.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Rio, L.C. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Preferencias. Journal of Experimental Botany 52:2115–2126.
- Sander, G. W. 2009. Quantitative analysis of metabolic pathways in *Catharanthus roseus* hairy roots metabolically engineered for terpenoid indole alkaloid overproduction. Graduate Theses and Dissertations. pp 10820.
- Sarabia, O.M., Madrigal, P.R., Martínez, T.M., y Carreón, A.Y. 2010, Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Biológicas 12:65-71.
- SAS Institute Inc. 2006. The SAS system for windows, ver. 9.0. SAS Institute Inc, Cary,
- Scherf, U., Ross, D.T., Waltham, M., Smith, L.H., Lee, J.K., Tanabe, L., Kohn, K.W., Reinhold, W.C., Myers, T.G., Andrews, D.T., Scudiero, D.A., Eisen, M.B., Sausville, E.A., Pommier, Y., Botstein, D., Brown, P.O., y Weinstein, J.N. 2000. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. Nature Genetics 24:236-44.

- Secretaría de Salud. 2011. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección Gneral de Epidemiología.
- Seigler, D., S. 2002. Plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers. United States of America ISBN 0-412-01981-7.
- Shakir, T., Coulibaly, A.Y., y Kehoe, P.G. 2013. An exploration of the potential mechanisms and translational potential of five medicinal plants for applications in Alzheimer's disease. *American Journal of Neurodegenerative Disease* 2: 70-88.
- Shanks, J. V. 2005. Phytochemical engineering: combining chemical reaction engineering with plant science. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 51: 2-7.
- Sharma, P., Padh, H., y Shrivastava, N. 2013. Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. *Engineering in Life Sciences* 13: 62-75.
- Shoemaker, R.H. 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* 6:813-823.
- Shrivastara, S., Egamberdieva, D., y Varma, A. 2015. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. pp. 1-16. In: D. Egamberdieva, S. Shrivastara, y A.Varma (Eds.). *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*. Springer.
- Simons, M., Permentier, H. P., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A., y Lugtenberg, B. J. J. 1997. Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:102-106.
- Singh, V., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Pati, P.K. 2015. Evaluation and selection of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *PLoS ONE* 10: e0118860.

- Stevens, D., A., Calderon, L., Martinez, M., Clemons, K., V., Wilson, S., J., y Selitrennikoff, C., P. 2002. Zeamatin, clotrimazole and nikkomycin Z in therapy of a *Candida vaginitis* model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 361–364.
- Sturz, A.V., Christie, B.R., y Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19:1-30.
- Tavira, M.C., Ortega, G.A., Dávila, G.I., Estrada, M.S., y Meneses, A.A. 2009. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40:35-46.
- Taylor, S.E., y Kirwan, J.M. 2011. Ovarian cancer: current management and future directions. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine* 22: 33-37.
- Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., De R, Saxena, A.K., Nautiyal, C.S., Mittal, S., Tripathi, A.K., Johri, B.N. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89:136–150.
- Trejo, T.G., y Rodríguez, M.M. 2007, La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia* 32:669-674.
- Ucrós, E.M. 2004. El cáncer. Aspectos básicos sobre su biología clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento. Ministerio de Protección Social, Instituto Nacional de Cancerología.
- Udeigwe, T.K., Teboh, J.M., Eze, P.N., Stietiya, H., Kumar, V., Hendrix, J., Mascagni, H. J., Ying, T., y Kandakji, T. 2015. Implications of leading crop production practices on environmental quality and human health. *Journal of Environmental Management* 151: 267-279.
- Van der Fits, L., y Memelink, J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297.
- Van Der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijs, W., Hallared, D., Verpoorte, R. 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* 11:607–628.

- van Iersel, M.W., Beverly, R.B., Thomas, P. A., Latimer, J.G., y Mills, H. A. 1998. Fertilizer effects on the growth of impatiens, petunia, salvia y vinca plug seedlings. *Hort Science* 33:678-682.
- van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology* 119:243–254.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3: research0034.1-0034.11.
- Vega-Ávila, E., Velasco-Lezama, R., y Jiménez-Estrada, M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica* 31: 97-111.
- Velineni, S., y Brahmprakash, G.P. 2011. Survival and phosphate solubilizing ability of *Bacillus megaterium* in liquid inoculants under high temperature and desiccation stress. *Journal of Agricultural Science and Technology* 13:795–802.
- Velthof, G.L., Oudendag, D.A., Witzke, H.P., Asman, W.A.H., Klimont, Z., y Oenema, O. 2009. Integrated assessment of nitrogen emission losses from agriculture in EU-27 using MITERRA-EUROPE. *Journal of Environmental Quality* 38:1-16.
- Verma, A., Laasko, I., Seppänen-Laakso, T., Huhtikangas, A., y Riekkola, M.-L., 2007. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. *Molecules* 12: 1307–1315.
- Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N., Lavakush, y Singh, V. 2010. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *International Journal of Agricultural Research* 5:954–983.
- Verma, P., Mathur, A.K., Srivastava, A., y Mathur, A., 2012. Emerging trends in research on spatial and temporal organization of terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*: a literature update. *Protoplasma* 249:255–268.

- Vesper, S. J. 1987. Production of pili (Fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Applied and environmental microbiology*. 53: 1397-1405.
- Vessey, J.,K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586.
- Vincent, J.M., 1970. A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vries, W., Kro,s J., Reinds, G.J., y Butterbach-Bahl, K. 2011. Quantifying impacts of nitrogen use in European agriculture on global warming potential. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3:291–302.
- Walker, N. J. 2002. A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.
- Weller, D.M., Raaijmakers, J.M., Gardener, B.B., y Thomashow, L. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40:309–348.
- Westoby, M., Warton, D. y Reich, P. B.2000. The Time Value of Leaf Area *The American Naturalist* 155: 649-656.
- Wiesner, C., Tovar, S., Díaz, M., Pardo, C. 2004. El cáncer - Aspectos básicos sobre su prevención, diagnóstico y tratamiento. Ministerio de la Protección Social - Instituto Nacional de Cancerología E.S.E. pp 67.
- Wright, I. J. y Cannon, K. 2001. Relationships between leaf lifespan and structural defences in a low-nutrient sclerophyll flora. *Functional Ecology* 15: 351-359.
- Yang, X.S., Wu, J., Ziegler, T.E., Yang, X., Zayed, A., Rajani, M.S., Zhou, D., Basra, A.S., Schachtman, D.P., Peng, M., Armstrong, Ch. L., Caldo, R.A., Morrell, J.A., Lacy, M., y Staub, J.M. 2011. Gene expression biomarkers provide sensitive indicators of in planta nitrogen status in maize. *Plant Physiology*. 157:1841–1852.

- Yin-Yin, S., Sogand Z., Wei-Guang, S., Soek-Ying, N., Chay-Hoon, T., y Hwee-Ling, K. 2014. Ethnobotanical survey of usage of fresh medicinal plants in Singapore. *Journal of Ethnopharmacology* 155: 1450–1466.
- Zaefarian, F., Vahidzadeh, S., Rahdari, P., Rezvani, M., y Ghani-Zadeh, H. 2012. Effectiveness of plant growth promoting rhizobacteria in facilitating lead and nutrient uptake by little seed canary grass. *Brazilian Journal of Botany* 35:241-248.
- Zamani, Z., Zeinali, H., Masood Sinaki, J. y Madani, H. 2014. Effect of nitrogen and phosphorous fertilizers on the yield and secondary metabolites of medicinal plant *Rubia tinctorum* L. under saline conditions. *Iranian Journal of Plant Physiology*. 4: 949-955.
- Zdor, R.E. y Anderson, A.J. 1992. Influence of root colonising bacteria on the defence responses of bean. *Plant and Soil* 140: 99-107.
- Zeng, S., Liu, Y., Wu, M., Liu, X., y Shen, X., Liu, C., Wang, Y. 2014. Identification and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization and Its Applications in *Lycium*. *PLoS ONE* 9: e97039.
- Zhang, M., Nyborg, M., y Malhi, S.S. 1998. Comparison of controlled-release nitrogen fertilizers on turfgrass in a moderate temperature area. *HortScience* 33: 1203-1206.
- Zubek, S., Mielcarek, S., y Turnau, K. 2012. Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 22:149-56.