



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

T E S I S

RELACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON
LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
CULTIVOS *IN VITRO* DE *Tagetes lucida* Cav. (PERICÓN)

P r e s e n t a:

Q.F.B. AGUSTÍN MORENO LEÓN

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

Director de Tesis

DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Co-Directora de Tesis

DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ GARCÍA

Mayo, 2024. Morelia, Michoacán.



OFICIO DE FIRMAS ACEPTACIÓN TESIS



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis
Titulada: "RELACIÓN DEL PERFIL DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
CULTIVOS *in vitro* DE *Tagetes lucida* Cav. (PERICÓN)" presentado por el QFB. Agustín Moreno León con Número de
Matrícula 1166679H, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de
Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 30 de abril de 2024

COMITÉ SINDICAL

Dr. Rafael Salgado Garciglia
Director de Tesis

Dra. Alejandra Hernández García
Co directora

Dra. Martha Estrella García Pérez
Presidente

Dra. Berenice Yahuaca Juárez
Vocal I

Dr. Rafael Zamora Vega
Vocal 2

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia y la Dra. Alejandra Hernández García.



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis Padres y Hermana, por siempre apoyarme en este camino, aunque no lo comprendan del todo, por que al principio y al final de esta vida loca, quien siempre está contigo, es tu familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado. Así como al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por permitirme desarrollar toda la parte experimental.

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (No. Beca: 814735) y al Proyecto CIC/2022-2024/UMSNH/RSG.

A mis directores de tesis, el Dr. Rafael Salgado Garciglia y la Dra. Alejandra Hernández García por brindarme la oportunidad, confianza y herramientas necesarias para realizar esta investigación. Agradezco toda la ayuda y conocimiento compartido conmigo.

A los miembros del comité sinodal conformado por la Dra. Martha Estrella García Pérez, Dra. Berenice Yahuaca Juárez y el Dr. Rafael Zamora Vega, por sus aportaciones para mejorar esta investigación y ayudarme a crecer con sus observaciones y disponibilidad en cada uno de los seminarios.

A la Bióloga Yolanda Magdalena García Rodríguez, por su apoyo en la realización y descripción del análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas.

A la Bióloga Rosa Isabel Fuentes Chávez por la ayuda en la identificación de especie.

A la M.C. Kathia Yanelly Rodríguez Valdovinos por su apoyo técnico en la determinación de terpenos totales

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Vegetal: a Erika y Sol por siempre ayudarme a recordar cuando fue necesario, gracias por su paciencia y amistad.

A Karina, Kathia, Yola Aguilar, Atsiri, Christian, Miguel(pelón), Leo, Nadia, Brandon, Rodrigo y demás compañeritos por su amistad y hacer los momentos más amenos y divertidos en el laboratorio.

A mis compañeros de generación de la maestría por compartir momentos de convivencia sana y de pláticas muy amenas.

A mis amigas Yola y Luz por compartir esos momentos de felicidad, pero también por siempre estar cuando los días pueden llegar a ser grises, muchas gracias por su amistad y apoyo.

A mis asesores Dr. Rafa y Dra. Ale muchas gracias por aceptarme como parte de su familia académica, por los consejos y la sabiduría transmitida no solo de forma académica si no de sus vivencias, muchas gracias.

Agradezco a Rita y Darwin porque considerarme parte de su familia, todo este tiempo en Morelia, Nancy López y familia así también Nancy castro y familia, a todos los aprecio de todo corazón, muchas gracias.

Por último y no por eso menos importante, agradezco a mis padres, familiares más cercanos, a amigos y familiares que ya partieron de este plano físico, por todas las vivencias y sueños que alguna vez les platiqué, y que en este tiempo los puedo ver hechos realidad y por sobre todas las cosas, agradezco a Dios.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. <i>Tagetes lucida</i> CAV. (ASTERACEAE)	4
2.1.1. Principales compuestos volátiles del aceite esencial de <i>T. lucida</i>	6
2.1.2. Actividad biológica del aceite esencial de <i>T. lucida</i>	7
2.2. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS	9
2.2.1. Factores abióticos que afectan la producción de metabolitos secundarios	9
2.2.2. Factores ontogénicos que afectan la producción de metabolitos secundarios	11
2.2.3. Factores bióticos que afectan la producción metabolitos secundarios	12
2.3. EFECTO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
5.1. OBJETIVO GENERAL	16
5.1.1. Objetivos específicos	16
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
7. RESULTADOS	18
7.1. CAPÍTULO 1	18
Establecimiento <i>in vitro</i> y determinación del crecimiento de cultivos celulares (callos y suspensiones celulares), brotes y plántulas de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (pericón).	18
Resumen	18
Introducción	19
Materiales y métodos	21
Análisis estadístico	25
Resultados y discusión	25
Conclusiones	36
Referencias	37

7.2.	CAPÍTULO 2.....	44
	Perfil químico de aceites esenciales de cultivos <i>in vitro</i> (callos, suspensiones celulares, brotes y plántulas) de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (pericón) y su relación con la actividad antifúngica.	44
	Resumen	44
	Introducción.....	44
	Materiales y métodos.....	46
	Análisis estadístico.....	48
	Resultados y discusión.....	49
	Conclusiones	57
	Referencias	58
8.	DISCUSIÓN GENERAL	62
8.1.	ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS <i>IN VITRO</i> DE <i>Tagetes lucida</i>	62
8.2.	DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS <i>in vitro</i>	64
8.3.	CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN CULTIVOS <i>in vitro</i>	64
8.4.	ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE CULTIVOS <i>in vitro</i>	65
9.	CONCLUSIONES GENERALES.....	66
10.	LITERATURA GENERAL CITADA	67

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Actividad biológica de algunos compuestos de <i>Tagetes lucida</i>	8
Cuadro 2. Actividad antifúngica reportada de metil eugenol y estragol de diversas plantas....	8
Cuadro 3. Cultivos vegetales <i>in vitro</i> con una mayor producción del contenido de metabolitos secundarios y nuevos compuestos.....	14
Cuadro 4. Respuesta de morfogénesis en explantes (yemas apicales) de <i>Tagetes lucida</i> en la combinación BA/ANA a diferentes concentraciones, a los 28 días del cultivo.	27
Cuadro 5. Elección de medio de cultivo óptimo de suspensiones celulares de <i>Tagetes lucida</i> , mediante la selección de inóculo de acuerdo al peso y características morfológicas, obtenidas a los 15 días del cultivo en MS con 0.5 mg/L de ANA	29
Cuadro 6. Análisis de compuestos volátiles de extractos hexánicos de hojas y tallos de plantas de <i>Tagetes lucida</i> recolectadas in situ (E3, floración) y de cultivos <i>in vitro</i> (células en suspensión, callos, brotes y plántulas), identificados por CG-EM	54
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición antifúngica sobre <i>B. cinerea</i> , de extractos hexánicos de hojas y tallos de plantas in situ en cuatro estadios de desarrollo (E1, Brotación; E2, Desarrollo vegetativo; E3, Floración; E4, Senescencia) y de los cultivos <i>in vitro</i> (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas in vitro) de <i>T. lucida</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Plantas de <i>Tagetes lucida</i> Cav. durante su época de floración en el sitio de recolecta (Fotografía propia).....	5
Figura 2. Principales compuestos volátiles del aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i> (Elaboración propia).....	7
Figura 3. Semillas (A), ejemplar de herbario (B) y certificado de herborización (Folio 31380) (C) de <i>Tagetes lucida</i> Cav.....	22
Figura 4. Proceso para el establecimiento de células en suspensión de <i>T. lucida</i> a partir de callo: A), Callo de 15 días de cultivo; B) Matraces con diferentes cantidades de inóculo de callo; C) Matraces con células en suspensión en agitación orbital; D, Obtención de biomasa (células) por el método de filtración.....	24
Figura 5. Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> con la siembra de semillas de <i>Tagetes lucida</i> : germinación a los 7 días de cultivo (A) y desarrollo de plántulas a los 14 (B) y 28 días (C) de cultivo en MS con 0.05 mg/L de BA.....	26
Figura 6. Respuesta óptima de morfogénesis en yemas apicales de plántulas de <i>Tagetes lucida</i> a los 28 días del cultivo para la formación de callo (A) en 0.5 mg/L de BA, multiplicación de brotes (B) en 0.5 mg/L de BA, regeneración de plántulas (C) en 0.05 mg/L de BA, y suspensiones celulares en 0.5 mg/L de BA (D).....	28
Figura 7. Determinación de crecimiento de plántulas de <i>Tagetes lucida</i> : A) Peso fresco (g); B) Altura (cm). Durante 36 días de cultivo en MS con 0.05 mg/L de BA. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).....	30
Figura 8. Determinación de crecimiento de brotes de <i>Tagetes lucida</i> durante 36 días en MS con 0.5 mg/L de BA: A) Peso fresco (g); B), Altura (cm); C) Número de brotes. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).....	31
Figura 9. Determinación de crecimiento de callos de <i>Tagetes lucida</i> durante 36 días en MS con 0.5 mg/L de ANA: A) Peso fresco (g); B) Diámetro (cm). Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).....	33
Figura 10. Determinación de crecimiento en base a peso (g) de células en suspensión de <i>Tagetes lucida</i> , durante 28 días en MS con 0.5 mg/L de ANA: A) Peso fresco (g); B) Peso seco (g). Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).....	34

Figura 11.	Determinación de terpenos totales en extractos hexánicos de hojas y tallos de plantas de <i>T. lucida</i> recolectadas en su hábitat (<i>in situ</i>), en cuatro etapas de desarrollo: E1, Plántulas en brotación (5 a 20 cm de altura); E2, Plántulas en crecimiento vegetativo (20 a 30 cm de altura); E3, Plántulas en floración; E4, Plántulas en senescencia. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).....	50
Figura 12.	Determinación de terpenos totales en extractos hexánicos de suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas <i>in vitro</i> de <i>T. lucida</i> de muestras recolectadas durante la cinéticas de crecimiento (7, 14, 21 y 28 días). Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).....	52
Figura 13.	Cromatograma de compuestos volátiles del hidrodestilado de parte aérea de <i>Tagetes lucida</i>	55
Figura 14.	Crecimiento de micelio de <i>B. cinerea</i> en ensayos <i>in vitro</i> en PDA a los 8 días del cultivo, con la aplicación de hexano (Control -), los extractos de suspensiones celulares, callos, brotes, plántulas, hojas y tallos de los estadios E3 y E4 de <i>Tagetes lucida</i> , y Benomyl 50® como Control +.....	57

RESUMEN

Tagetes lucida (Asteraceae) es conocida como pericón o *yauhtli*, se caracteriza por la producción de aceite esencial, compuesto volátiles como terpenos y fenilpropanos, importantes por su actividad biológica antifúngica. El objetivo de esta investigación fue determinar la producción de terpenos totales, identificar y cuantificar los compuestos volátiles por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y relacionarlos con la actividad antifúngica *in vitro*. Se estudiaron extractos hexánicos obtenidos por maceración en frío de los cultivos *in vitro* (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas), comparados con los de hoja y tallo de cuatro estadios de plantas de *T. lucida in situ* (E1, brotación; E2, crecimiento vegetativo; E3, floración; E4, senescencia). El establecimiento *in vitro* de plántulas de *T. lucida* se consiguió con la siembra de semillas en medio Murashige y Skoog (MS) con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), obteniendo un 36% de germinación a los 7 días del cultivo con plántulas de 5 cm de altura, fuente de explantes (yemas axilares) para establecer los diferentes cultivos *in vitro* en MS con ácido naftalenacético (ANA) y BA en concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mg/L. A los 28 días del cultivo, se determinó el medio óptimo para la formación de callos (0.5 mg/L ANA), de brotes (0.5 mg/L BA), así como para el desarrollo de plántulas (0.05 mg/L BA). Las suspensiones celulares se establecieron a partir de callos friables en MS líquido con 0.5 mg/L de ANA, utilizando diferentes inóculos (0.5, 1, 2 y 5 g/50 mL) en condiciones de luz y oscuridad, eligiendo un inóculo de 1 g/50 mL y el óptimo crecimiento en luz. De cada sistema, se realizaron cinéticas de crecimiento, con la determinación de diferentes parámetros de crecimiento (peso fresco, p.f. y peso seco p.s. en g; altura, cm; o número de brotes). En plántulas se obtuvo 0.48 g (p.f.) a los 32 días, 6.4 veces más que el presentado al inicio del cultivo, con una altura máxima de 11.53 cm; en brotes, a los 28 días se consiguió 1.3 g (p.f.) con una altura promedio de 5.3 cm de altura; en callos a los 32 días, la biomasa máxima fue de 2.13 g (p.f.) con 3.3 cm de diámetro; y, en las suspensiones celulares, se obtuvieron 6.45 g (p.f.) a los 24 días, correspondiente a 0.4 g (p.s.). De acuerdo con estas cinéticas, a los 7, 14, 21 y 28 días, se determinó el contenido de terpenos totales, así como el perfil de volátiles por CG-EM, al final de la fase exponencial. Estos resultados se compararon con lo producido en hojas y tallos de plantas *in situ* en los diferentes estadios de crecimiento. En hojas y tallos del E4, el contenido de terpenos totales fue de 9 y 8.4 mg Eq. L/g e.s., respectivamente. En los cultivos *in vitro*, solamente en plántulas se obtuvo el mayor contenido (22.2 mg Eq. L/g e.s.) a los 28 días del cultivo. En suspensiones celulares, callos y brotes, el mayor contenido fue de 3.3 mg Eq. L/g e.s. Con el análisis por CG-EM se determinó el mayor contenido de metil eugenol (99.37%) con un menor contenido de estragol (0.18%) en hojas (E4); en los tallos de plantas del estadio E3, solo se detectó el metil eugenol con 67.53%. En los cultivos *in vitro*, solamente en brotes y plántulas se identificó al metil eugenol con 79.19% y 92.65%, respectivamente. En suspensiones celulares y callos no se detectó ningún compuesto volátil. Con los ensayos de actividad antifúngica, los extractos de hoja y tallo, presentaron los porcentajes más altos, con 63.3% y 74.7% en extractos de hojas de los estadios E3 y E4, así como un 53% en el extracto de tallo de estadio E3. Los extractos de los cultivos *in vitro* no mostraron actividad antifúngica. Con esta investigación se determinó la producción de terpenos en los cultivos *in vitro*, aunque no se detectaron para su identificación por CG-EM. La actividad antifúngica está relacionada con la presencia o contenido de los compuestos volátiles, solamente en los extractos de hoja y tallo de planta *in situ*, en los que el metil eugenol es el compuesto mayoritario.

Palabras clave: Actividad antifúngica, compuestos volátiles, cultivos *in vitro*, plantas *in situ*, *Tagetes lucida*.

ABSTRACT

Tagetes lucida (Asteraceae) is known as pericon or *yauhtli*, characterized by the production of essential oil, composed of volatiles such as terpenes and phenylpropanes, important for its biological antifungal activity. The aim of this research was to determine the production of total terpenes, identify and quantify volatile compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and relate them to antifungal *in vitro* activity. Hexanic extracts obtained by cold maceration of *in vitro* cultures (cell suspensions, callus, shoots and plantlets) were compared with those of leaves and stems at four stages of *T. lucida in situ* plants (E1, shooting; E2, vegetative growth; E3, flowering; E4, senescence). The *in vitro* establishment of *T. lucida* plantlets was achieved with the culture of seeds in Murashige and Skoog medium (MS) with 0.05 mg/L of benzyladenine (BA), obtaining 36% germination 7 days after culture with seedlings of 5 cm in height, source of explants (axillary buds) to establish the different *in vitro* cultures in MS with naphthaleneacetic acid (NAA) and BA in concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0 mg/L. At 28 days after culture, the optimal media for the formation of callus (0.5 mg/L ANA), shoots (0.5 mg/L BA), as well as for the development of plantlets (0.05 mg/L BA) was determined. Cell suspensions were established from friable callus in liquid MS with 0.5 mg/L ANA, using different inoculum (0.5, 1, 2 and 5 g/50 mL) under light and dark conditions, choosing an inoculum of 1 g/50 mL and optimal growth in light. Growth kinetics were performed for each system, with the determination of different growth parameters (fresh weight, f.w. or dry weight, d.w., in g; height, cm; or number of shoots). In plantlets, 0.48 g f.w. was obtained at 32 days, 6.4 times more than that presented at the beginning of the culture, with a maximum height of 11.53 cm; in shoots, 1.3 g f.w. was achieved at 28 days with an average height of 5.3 cm; in callus at 32 days, the maximum biomass was 2.13 g f.w. with a diameter of 3.3 cm; and, in cell suspensions, 6.45 g f.w. was obtained at 24 days, corresponding to 0.4 g d.w. According to these growth kinetics, at 7, 14, 21 and 28 days, the total terpene content was determined, as well as the volatile profile by GC-MS at the end of the exponential phase. These results were compared with those produced in leaves and stems of plants *in situ* at the different growth stages. In E4, leaves and stems, the total terpene content was 9 and 8.4 mg Eq. L/g d.w., respectively. *In vitro* cultures, only plantlets obtained the highest content (22.2 mg Eq. L/g d.w.) 28 days after culture. In cell suspensions, callus, and shoots, the highest content was 3.3 mg Eq. L/G d.w. With the GC-MS analysis, the highest content of methyl eugenol (99.37%) was determined with a lower content of estragole (0.18%) in leaves (E4); in the stems of E3 stage plants, only methyl eugenol was detected with 67.53%. In *in vitro* cultures, only in shoots and plantlets was methyl eugenol identified with 79.19% and 92.65%, respectively. No volatile compounds were detected in cell suspensions and callus. With the antifungal activity assays, leaf and stem extracts presented the highest percentages, with 63.3% and 74.7% in leaf extracts of stages E3 and E4, as well as 53% in stem extract of stage E3. Extracts from the *in vitro* cultures showed no antifungal activity. With this research, the production of terpenes in the cultures was determined *in vitro*, although they were not detected by GC-MS. Antifungal activity is related to the presence or content of volatile compounds only in leaf and stem extracts in *in situ* plants, in which methyl eugenol is the predominant compound.

Keywords: Antifungal activity, volatile compounds, *in vitro* cultures, *in situ* plants, *Tagetes lucida*.

1. INTRODUCCIÓN

La composición volátil de la parte aérea (hojas, tallos y flores) de *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae), ha sido estudiada en diversas investigaciones debido a su atractivo aroma a anís, constituido por distintos compuestos de tipo terpénico y fenilpropanoides volátiles, como el metileugenol, el estragol y el anetol, entre otros, considerados como componentes mayoritarios, que en conjunto son responsables de la actividad biológica que se le atribuye como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano, entre otras reportadas (Aquino *et al.*, 2002; Cicció, 2004; Céspedes *et al.*, 2006; Gutiérrez-Gaitén *et al.*, 2018). En nuestro grupo de trabajo, se ha reportado actividad antifúngica de *T. lucida*, contra el hongo *Botrytis cinerea*, responsable de la enfermedad “moho gris” en diversas plantas, principalmente en frutillas (Fulgencio-Negrete, 2013; Cázarez-Chávez, 2017).

Los monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides, generalmente componen el aceite esencial de esta planta y de muchas de las especies aromáticas, el cual es producido y almacenado en tricomas glandulares y otras estructuras secretoras como tejidos especializados difundidos principalmente en la superficie de órganos bien diferenciados como tallos, hojas y flores, por lo que ejercen una función ecológica fundamental en la planta y son los responsables de la actividad biológica (Bakkali *et al.*, 2008; Zitzelsberger y Buchbauer, 2015; Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

La variación de metabolitos secundarios, entre ellos, los que componen a los aceites esenciales, se debe a diversas causas como: genética de la especie, fenología, ubicación geográfica, clima, precipitación, tipo de suelo, temperatura y cuando están expuestas a factores bióticos (microorganismos patógenos y herbívoros) y abióticos (sequía, bajas y altas temperaturas, alta intensidad de luz, entre otros) (García-Rodríguez *et al.*, 2001; Verpoorte *et al.*, 2002; Zarate-Escobedo *et al.*, 2018). Aunado a esto, la explotación comercial está basada en la recolección de material en su hábitat natural, frecuentemente incluyendo la raíz, lo que ha provocado que muchas plantas estén amenazadas o en peligro de extinción (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007). Debido a esto, es necesario realizar estudios sobre la producción de compuestos secundarios como los volátiles, en sistemas que puedan controlarse los factores antes mencionados para determinar

el contenido y tipo de compuestos de manera uniforme y utilizar alguno de estos cultivos para la obtención de compuestos durante todo el año sin la recolecta extensiva, una alternativa ante esta problemática es el cultivo de tejidos vegetales (cultivos *in vitro*) (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

Se debe destacar que para la producción de compuestos volátiles a partir de cultivos *in vitro* es necesario monitorear la biosíntesis de éstos, para favorecer las condiciones idóneas para su producción en altos rendimientos, así como una adecuada elección de las metodologías analíticas que permitan una extracción eficiente de los componentes de interés, persistiendo la actividad biológica en estudio. En este sentido, en diversas plantas aromáticas cultivadas *in vitro* se han realizado estudios para la obtención y la caracterización de compuestos volátiles como *Santolina chamaecyparissus* (Ahuja *et al.*, 2005), *Mentha piperita* (Chakraborty y Chattopadhyay, 2008), *Thymus vulgaris* (Affonso *et al.*, 2009), *Camellia sinensis* (Grover *et al.*, 2012) y *Plectranthus ornatus* (Passinho-Soares *et al.*, 2013), entre otras más, con los que se ha demostrado que diversos factores afectan la producción de volátiles, como la diferenciación de los tejidos, las condiciones y medios de cultivo, así como las etapas de crecimiento *in vitro* (Zhu *et al.*, 2000).

Uno de los factores en cultivos *in vitro* que influye en la producción de metabolitos secundarios, son los reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo, ya que estos estimulan la división (citocininas) y elongación (auxinas) celular, así como la diferenciación e indiferenciación celular, que se relaciona con cambios en la producción de metabolitos secundarios (Akula y Ravishankar, 2011; Ramawat, 2021).

Los cultivo indiferenciados como los callos y las células en suspensión pueden producir un alto contenido de metabolitos secundarios, pero con una menor variedad de estos, los brotes, raíces y plántulas (cultivos diferenciados), pueden producir no solo una mayor cantidad de metabolitos sino biosintetizar por rutas metabólicas más complejas (Verpoorte *et al.*, 2002). Esto se debe a la compartimentalización en los tejidos vegetales, como ocurre con los aceites esenciales, que una vez sintetizados, éstos se transportan a compartimentos que son estructuras en donde se almacenan para su posterior uso, como para la atracción de polinizadores, o defensa de las plantas a diferentes tipos de estrés (Prins *et al.*, 2010).

Es por ello, que la actividad biológica está relacionada con la producción de compuestos, un gran contenido y tipos de éstos, que representan las diversas propiedades como la antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, entre otras. En diversas investigaciones de cultivos *in vitro* se ha demostrado lo anterior, como lo reportado en guayaba (*Psidium guajava*), donde se encontraron veintitrés nuevos compuestos que en la planta cultivada de forma convencional no están presentes; también en la orquídea *Rhyncho스테le rossii* se reportó una mayor cantidad de escopoletina *in vitro* que en la planta silvestre, importante en la actividad biológica de los extractos de esta especie, ya que mostró una mayor respuesta como antioxidante y antifúngico (Capote *et al.*, 2009; Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2020).

Aunque se sugieren diversos métodos de extracción de los aceites esenciales o compuestos volátiles de éstos, como el arrastre de vapor, la hidrodestilación, extracción o maceración con disolventes no polares a temperatura ambiente o con calentamiento (45 - 60 °C), así como de métodos de atrapamiento de volátiles como *headspace*, microextracción de fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) y extracción de fluidos supercríticos, entre otros, la extracción con hexano es ampliamente utilizada cuando se dispone de baja cantidad de biomasa, además de extraer compuestos de bajo y alto peso molecular contenidos en el aceite esencial, sin que haya una alta pérdida por descomposición de los componentes volátiles (Handa *et al.*, 2008; Pavón-Reyes *et al.*, 2017; Arafa *et al.*, 2020; Ashaari *et al.*, 2021).

La identificación y cuantificación de los componentes volátiles de un aceite esencial se realizan principalmente con la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), debido a su sistema de alta sensibilidad, que combina una óptima capacidad de separación e identificación cuantitativa y cualitativa de compuestos individuales volátiles presentes en una muestra, para lo que se requiere una pequeña cantidad de muestra (Sharapin, 2000).

Con el propósito de relacionar el contenido y tipos de metabolitos del aceite esencial de *T. lucida* en cultivos celulares (células en suspensión y callos), brotes y plántulas *in vitro*, con la actividad antifúngica, el objetivo de esta investigación fue determinar la relación del perfil de compuestos volátiles del aceite esencial de *T. lucida* con la actividad antifúngica de cultivos indiferenciados (callos y suspensiones celulares) y diferenciados (brotes y plántulas)

2. ANTECEDENTES

2.1. *Tagetes lucida* CAV. (ASTERACEAE)

La familia Asteraceae se encuentra distribuida en todo el mundo y se le considera cosmopolita, su nombre proviene del latín y significa estrella por sus flores que tienen esta forma, se describe de acuerdo a su porte por plantas arbóreas erectas trepadoras y rastreras; sus hojas por lo general suelen ser alternas u opuestas simples lobuladas o dentadas, las flores contienen inflorescencias unidas en un capítulo con muchas o pocas flores pequeñas a diminutas, sus semillas suelen ser oleaginosas sin endospermo y con una germinación epigea o sobre el suelo. Es la más grande de la flora de México por su número de géneros y especies, actualmente está dividida en 45 tribus (Funk *et al.* 2009), cuenta con 417 géneros y 3,113 especies, de las cuales 24 contienen especies nativas en México, entre los géneros con más de 20 especies está *Tagetes*, que conforma 27 especies, de las cuales 15 son endémicas (Villaseñor, 2016; Villaseñor, 2018).

El género *Tagetes* en México presenta una distribución comprendida desde el suroeste de Estados Unidos hasta Argentina. El género está representado por plantas aromáticas, herbáceas anuales o perennes y subarborescentes; con hojas opuestas en la base de la planta y alternas en la porción superior, simples, pinnadas o pinnatisectas. Diversos autores (Rzedowski, 2001; Villarreal-Quintanilla, 2003; Villarreal-Quintanilla y Villaseñor 2004; Villarreal-Quintanilla *et al.* 2008), describen a *Tagetes* con numerosas glándulas distribuidas en los nomofilos y en las brácteas de las cabezuelas. Presentan inflorescencias en forma de capítulos heterógamos, raramente homógamos, solitarios o agrupados en cimas. Flores marginales liguladas pistiladas, flores del disco infundibuliformes a tubulosas perfectas, variables en número. Corolas amarillas, anaranjadas o blancas. México se considera el centro de diversificación de *Tagetes* (Díaz-Cedillo y Serrato-Cruz 2011; Villaseñor 2016).

Las especies de *Tagetes* son importantes por la producción de metabolitos secundarios, por lo que son utilizadas en la industria agrícola, alimenticia, cosmética y medicinal, entre otras. Algunos de ellos presentan actividad biológica sobre varios organismos patógenos (Dharmagadda *et al.* 2005; Romagnoli *et al.*, 2005; Céspedes *et al.*, 2006; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2006; Serrato-Cruz *et al.*,

2008; Barajas-Pérez *et al.*, 2011). El 10% de las especies de *Tagetes* son consideradas como importantes en la etnobotánica mexicana (García-Sánchez *et al.*, 2012, Serrato-Cruz, 2014; Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Dentro de las especies más conocidas o utilizadas están *T. lucida*, *T. erecta*, *T. patula*, *T. micrantha*, *T. lunulata* y *T. tenuifolia*.

Tagetes lucida Cav. (Familia Asteraceae, Orden Asterales, Tribu Tageteae) es una planta que habita en diversas regiones de México, es conocida como pericón, hierbanís, y santa maría en México, Guatemala, Honduras y Costa Rica, entre otros países, en donde se usa como parte de su medicina tradicional (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Por su olor agradable a anís, su aceite esencial se emplea en la industria de las fragancias, sabores, en la fabricación de jabones, detergentes y como precursor de la síntesis orgánica para formulaciones farmacéuticas (Gutiérrez-Gaitén *et al.*, 2018). Aunque *T. lucida* es una planta perenne, su desarrollo mayormente es en los meses de agosto a diciembre en diversas regiones de Michoacán, presenta hojas verde brillantes, opuestas, simples, sésiles, elípticas a lanceoladas de 4 a 10 cm de largo y 0.5 a 2 cm de ancho, con inflorescencias amarillas, con varios tallos erectos desde la base de hasta 1 m de altura, poco ramificados. Es una planta común en la vegetación secundaria derivada de bosques de encino, de pino y de los tropicales caducifolios, tanto en Guanajuato, como en Querétaro y en el norte de Michoacán, en altitudes de 800-2700 m. Es una especie con amplia distribución desde el norte de México (ej., Guanajuato, Querétaro, Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán) hasta El Salvador y Honduras (Villarreal, 2003) (Figura 1).



Figura 1. Plantas de *Tagetes lucida* Cav. durante su época de floración en el sitio de recolecta (Fotografía propia).

2.1.1. Principales compuestos volátiles del aceite esencial de *T. lucida*

Las plantas del género *Tagetes* son buenas productoras de aceites esenciales pero el contenido de terpenos y fenilpropanoides varía de acuerdo a diversos factores (bióticos y abióticos). En general, sus especies producen aceites esenciales compuestos con un mayor contenido de terpenos y de fenilpropanos.

El análisis del contenido y tipo de compuestos volátiles del aceite esencial de *T. lucida* se ha realizado por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masa, y se ha reportado que existe variación tanto en la composición como en la concentración de los principales compuestos, debido principalmente a la región geográfica en donde se recolecta la planta y a diversos factores como la altitud, el tipo de suelo y las condiciones medioambientales donde habita o se cultiva.

Guzmán y Manjarrez (1962) reportaron al estragol (80%) y al metil eugenol (20%) como los mayoritarios en plantas cultivadas, pero Bicchi *et al.* (1997) obtuvo un 33.9 % de estragol, 24.3 % de metil eugenol y 23.8 % de anetol, en plantas de *T. lucida* cultivadas en Guatemala. Ciccio (2004) reportó un 97.3 % de estragol en plantas de *T. lucida* de Costa Rica (Ciccio, 2004). Otras investigaciones han demostrado esta variación, sobre todo en el contenido del compuesto mayoritario estragol (Regalado *et al.*, 2011).

En México, en un estudio realizado con diversas poblaciones de la zona norte y sur del Estado de México, se presentó la variación de acuerdo a la ubicación geográfica, al clima, a la precipitación, al tipo de suelo y a la temperatura, factores que afectan la producción de estos compuestos en general en el sitio donde habita o se cultiva la planta. En promedio, los compuestos mayoritarios en 14 poblaciones de plantas recolectadas de *T. lucida*, fueron el estragol, el metil eugenol, el metil isoeugenol, el β -ocimeno, el acetato de geranilo, el nerolidol, el cariofileno, el β -mirceno, el β -cubebeno, el germacreno y el elixeno (Zarate-Escobedo *et al.*, 2018) (Figura 2).

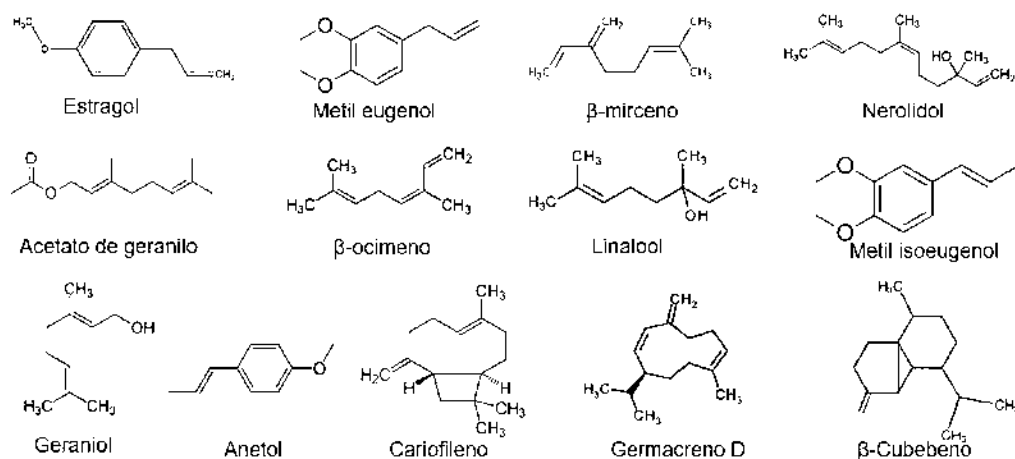


Figura 2. Principales compuestos volátiles del aceite esencial de *Tagetes lucida* (Elaboración propia).

2.1.2. Actividad biológica del aceite esencial de *T. lucida*

El aceite esencial tiene actividad biológica como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano, entre otras, principalmente por el contenido de compuestos terpénicos y fenilpropanoides volátiles, como el metil eugenol, el estragol y el anetol, pero además de los flavonoides quercetagina y patuletina, y las cumarinas herniarina, dimetilalil éter de 7-hidroxicumarina, entre otros (Ciccio, 2004; Céspedes *et al.*, 2006; Gutiérrez-Gaitén *et al.*, 2018). Los constituyentes fenólicos han demostrado tener un significativo efecto antioxidante (Aquino *et al.*, 2002) (Cuadro 1).

Debido al contenido de los principales terpenos y fenilpropanoides, se ha reportado actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de géneros diversos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Sclerotium* (Céspedes *et al.*, 2006; Barajas-Pérez *et al.*, 2011; Salehi *et al.*, 2018). Estos compuestos como el metil eugenol y el estragol, se encuentran en diversas plantas medicinales, de las que se ha reportado actividad antifúngica, entre ellas que se encuentra *Tagetes lucida* (Cuadro 2). En nuestro grupo de trabajo, se ha estudiado el efecto fungicida del aceite esencial de *T. lucida*, demostrando su actividad sobre diversos hongos como *Botrytis cinerea*, hongo causal del moho gris en plantas y frutos de fresa, así como otras frutillas como zarzamora, frambuesa y arándano (Céspedes *et al.*, 2006; Fulgencio-Negrete, 2013; Cázarez-Chávez, 2017).

Cuadro 1. Actividad biológica de algunos compuestos de *Tagetes lucida*.

Actividad	Compuestos	Modelo Experimental	Referencias
Antiinflamatoria	Cumarinas	Ratones con edema auricular inducido	Monterrosas Brisson <i>et al.</i> , 2019
Antibacteriana	Aceite esencial (metil eugenol, estragol, linalool y geraniol)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HIM-MR01	Torres Martínez <i>et al.</i> , 2022
	Constituyentes fenólicos	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Villa Silva <i>et al.</i> , 2020
Antifúngica	Aceite esencial (metil eugenol, estragol, linalool)	<i>Botrytis cinerea</i>	Fulgencio-Negrete, 2013
Antioxidante	Aceite esencial (estragol y metil eugenol)	ABTS	Muñoz Acevedo <i>et al.</i> , 2009
	Constituyentes fenólicos	DPPH	Aquino <i>et al.</i> , 2002
Antidepresiva	Extracto etanólico de hojas	Ratas	Guadarrama-Cruz <i>et al.</i> , 2008

Cuadro 2. Actividad antifúngica reportada de metil eugenol y estragol de diversas plantas.

Planta	Compuesto Activo	Hongo	Referencia
<i>Ocimum basilicum</i>	Estragol	<i>Botrytis fabae</i> <i>Uromyces fabae</i>	Oxenham <i>et al.</i> , 2005
<i>Piper divaricatum</i>	Metil eugenol	<i>F. solani f. sp. Piperis</i>	Da Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Tagetes lucida</i>	Metil eugenol Estragol	<i>Botrytis cinerea</i>	Fulgencio-Negrete, 2013
<i>Ocimum selloi</i>	Estragol	<i>Moniliophthora perniciosa</i> <i>C. Gloeosporioides</i> <i>Alternaria alternata</i>	Costa <i>et al.</i> , 2015
<i>Boesenbergia pulcherrima</i>	Metil eugenol	<i>Fusarium oxysporum</i>	Park <i>et al.</i> , 2020
<i>Syszygium aromaticum</i> <i>Pimenta dioica</i>	Metil eugenol	<i>Fusarium verticillioides</i>	Achimón <i>et al.</i> , 2021

2.2. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN PLANTAS

Con diversas investigaciones se ha demostrado que la variación en el contenido y tipo de compuestos en aceites esenciales de plantas se debe a la especie, al órgano o parte de la planta, a las etapas de desarrollo (vegetativo y floración), así como a la ubicación geográfica y a las condiciones climáticas, y nutricionales, esos son factores bióticos, abióticos y etapas fenológicas de la planta que pueden afectar o modificar la producción de metabolitos secundarios y esto es debido a una respuesta de adaptación al entorno ecosistémico, que llega a modificar o alterar su morfología, fisiología y bioquímica dependiendo de estos factores (Vogel y Berti 2003; Muñoz-Concha *et al.*, 2004; Akula y Ravishankar, 2011; Jaafar *et al.*, 2012 Nezhadali *et al.*, 2014; Torres-Martínez *et al.*, 2014; Carreón-Abud *et al.*, 2015 Aqeel *et al.*, 2023).

2.2.1. Factores abióticos que afectan la producción de metabolitos secundarios

Se han encontrado diferencias en la concentración y composición de metabolitos secundarios dependiendo de las condiciones medioambientales donde habita la planta, ya que depende del clima, del tipo de suelo, de la temperatura, de la humedad, de la intensidad de luz y del periodo de horas luz, de la altitud y de la región geográfica (Jakobsen y Olsen, 1994; García-Rodríguez *et al.*, 2001; Verpoorte *et al.*, 2002; Santacoloma-Varón y Granados, 2010).

El clima. Este factor tiene una función importante en la producción de metabolitos secundarios ya que no es controlable y determina la variación en el contenido y tipo compuestos de aceites esenciales, lo que puede afectar el crecimiento vegetal (Figueiredo *et al.*, 2008 Aqeel *et al.*, 2023).

Región geográfica. También con este factor se ha determinado la variación en la producción de compuestos tanto en el tipo como en la concentración de metabolitos secundarios, en la que mayormente la altitud es la que causa esta variación, como lo ya antes mencionado para *T. lucida* recolectada en dos zonas del Estado de México, igual a lo obtenido en *Lipia alba* recolectada en diferentes zonas de Francia, en la que la variación de los compuestos volátiles del aceite esencial se debió a los quimiotipos analizados, en los que prevalecen algunos de los metabolitos

secundarios mayoritarios pero existe una diferencia en la concentración de éstos (Hennebelle *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008; Raal *et al.*, 2011, Linde *et al.*, 2016; Zarate-Escobedo *et al.*, 2018).

El suelo. Se ha encontrado una diferencia en la producción de compuestos con respecto al suelo donde habitan las plantas, lo que puede deberse a la abundancia o escasez de algunos minerales que aportan las moléculas necesarias para la producción de metabolitos, ejemplos de esto se han encontrado en especies de *Tthymus* spp (*T. hirtus*, *T. capitatus*, *T. ciliatus* y *T. algeriensis*) recolectadas en la zona noreste de Argelia en seis diferentes regiones, encontrando dos quimiotipos principales, uno con alto contenido de timol y el otro con α -pineno, prevaleciendo el quimiotipo de timol, esto se relacionó con las concentraciones de arcilla en el suelo de las diferentes regiones (Gherairia *et al.*, 2022). En el estudio con *T. lucida*, con una recolecta de 14 poblaciones en el Estado de México, en el que se demostró la variación de los compuestos del aceite esencial, se relacionó con el tipo de suelo ya que se determinaron seis tipos (feozem, cambizol, planosol, luvisol, vertisol y regosol), en los quimiotipos que produjeron más geranil acetato como compuesto mayoritario, prevaleció el vertisol (Santacoloma-Varón y Granados, 2010; Zarate-Escobedo *et al.*, 2018; Boaro *et al.*, 2019).

La humedad y precipitación. Estos dos factores están ligados ya que a mayor precipitación existe una mayor humedad y en algunas investigaciones, esta relación se ha determinado como responsable de la variación del contenido de compuestos secundarios como en *Tithonia diversifolia*, una planta que habita en Brasil, que produce un mayor contenido de metabolitos primarios en época de lluvias (azúcares y nucleósidos) y una mayor producción de metabolitos secundarios (lactonas y sesquiterpenos) en época de sequía (Sampaio *et al.*, 2016). El estrés hídrico puede inducir la producción y almacenamiento de compuestos secundarios, como los terpenos que se acumulan en plantas arbustivas y herbáceas (Zobayed *et al.*, 2005; Ferreira, 2007; Akula y Ravishankar, 2011; Jaafar *et al.*, 2012).

La luz. Es un factor muy importante que influye en la producción de metabolitos secundarios, ya que la intensidad de luz, el fotoperiodo, la relación entre las horas de luz y de oscuridad, pueden llegar a afectar el crecimiento de las plantas y afectar de forma positiva o negativa en la producción

y acumulación de metabolitos secundarios. Hay estudios que han encontrado una relación positiva entre el aumento de intensidad de luz y el tipo de luz, con el nivel de compuestos fenólicos como taninos y flavonoides, la producción de vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus* aumenta utilizando luz UV-B, ambos metabolitos son empleados en el tratamiento contra la leucemia (Zhang *et al.*, 2002; Binder *et al.*, 2009; Santacoloma-Varón y Granados, 2010; Akula y Ravishankar, 2011; Yang *et al.*, 2018; Rai *et al.*, 2024).

La temperatura. Este es uno de los factores medioambientales y climáticos que más influyen en la producción de metabolitos secundarios, la variación de la temperatura puede afectar de forma positiva o negativa en el crecimiento y desarrollo de las plantas, la temperatura alta puede inducir la senescencia de las hojas y por ende la producción o almacenamiento de metabolitos secundarios en éstas, se sabe que una alta en la temperatura podría mejorar la producción de compuestos en general en las plantas, en la biosíntesis de alcaloides se estimula a altas temperaturas. En *Papaver somniferum*, una baja en la temperatura disminuye o restringe la producción de alcaloides como la morfina (Bernáth y Tétényi, 1979), por el contrario, en raíces de soya (*Glycine max*) a temperaturas bajas (10 °C), existe una mayor producción de flavonoides e isoflavonoides como la genisteína. En temperaturas promedio altas (climas cálidos), se ha observado que se produce un mayor contenido de terpenos en *Quercus rubra* y *Q. alba*, existiendo una mayor emisión de isopreno en climas fríos (Hanson y Sharkey, 2001; Janas *et al.*, 2002; Akula y Ravishankar, 2011; Yang *et al.*, 2018).

2.2.2. Factores ontogénicos que afectan la producción de metabolitos secundarios

Se han encontrado diferencias en la concentración y composición de metabolitos secundarios dependiendo de la etapa de desarrollo o de la edad de la planta (desarrollo de órganos o factores ontogénicos). La variación en el contenido y tipos de metabolitos secundarios depende del desarrollo de las plantas, como la etapa de germinación, de plántula, etapa juvenil, etapa de maduración o floración y fructificación, senescencia y muerte, en cada una de estas etapas existe una diferencia en la biosíntesis y acumulación de metabolitos tanto secundarios como primarios (alcaloides, fenoles, terpenos, glucósidos cianogénicos, enzimas y proteínas defensivas).

Un ejemplo es lo que anteriormente se describió para la morfina en *P. somniferum*, en la que su producción depende de la etapa de desarrollo. Esto mismo ocurre en la producción de aceites esenciales, fenoles y saponinas, así como de la actividad biológica de *Astragalus compactus*, y en *Ocimum sanctum*, en la que hay una disminución de metil eugenol y eugenol, durante el desarrollo de sus hojas (Barton, 2007; Elger *et al.*, 2009; Barton y Koricheva, 2010; Morariu y Caulet, 2011; Verma y Shukla, 2015).

2.2.3. Factores bióticos que afectan la producción metabolitos secundarios

Los mecanismos de defensa que han desarrollado las plantas, son muy variados y entre ellos está la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antioxidante, utilizados por las plantas como defensa contra microorganismos (hongos y bacterias), nemátodos y herbívoros (insectos y animales superiores pequeños), estos factores son denominados bióticos (Bennett y Wallsgrove, 1994; Wink, 2015).

Herbivoría. Las plantas utilizan defensas morfológicas, químicas y bioquímicas como la producción de mezclas de metabolitos secundarios, principalmente volátiles, que interfieren en el proceso de crecimiento y de reproducción, así como en el comportamiento de los insectos y otros herbívoros patógenos que atacan a las plantas. Se ha determinado una estrecha relación entre la herbivoría y la concentración y composición de metabolitos secundarios de las plantas, ya que dependiendo de la diversidad de fauna del lugar donde habita una planta, podría o no producirse un cierto tipo de metabolitos, como las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que al tener un sabor desagradable para sus herbívoros patógenos los repelen, pero otros son tóxicos con función insecticida. También, la producción de este tipo de compuestos por la planta evita la oviposición, e incluso tienen la función de atraer a insectos depredadores de herbívoros y alertar a las demás plantas de su alrededor para comenzar a producir metabolitos que sirvan como defensa (señal de alerta), de igual forma produce metabolitos como los terpenoides para atraer a los insectos polinizadores (Marvier, 1996; Camarena Gutiérrez, 2009; Farha-Rehman *et al.*, 2010; Walters, 2011; War *et al.*, 2019 ; Khare *et al.*, 2020).

Microorganismos patógenos. La producción de ciertos metabolitos secundarios por las plantas es inducida cuando es atacada por bacterias u hongos, los que una vez que los reconoce, se

desencadena la producción de metabolitos secundarios de defensa, bajo un mecanismo relacionado con la regulación del estrés oxidativo en las células vegetales de la planta atacada. En el caso de la familia Brassicaceae, algunas de sus especies producen glucosinolatos que tienen actividad antimicrobiana (Wink, 1988; Akula y Ravishankar, 2011; Rejeb *et al.*, 2014; Isah, 2019; Khare *et al.*, 2020)

2.3. EFECTO DEL CULTIVO *IN VITRO* EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES Y LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El cultivo de células, tejidos, órganos y plántulas *in vitro* es considerado una tecnología prometedora para la producción de metabolitos secundarios (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011), por lo que el conocimiento de los factores que influyen en la síntesis y acumulación de éstos, se ha investigado en diversos estudios como alternativa para la producción en masa de metabolitos secundarios de alto valor (Canter *et al.*, 2005). De esta manera, los cambios en el perfil químico de metabolitos secundarios, como los volátiles de aceites esenciales, se han observado en algunas plantas o tejidos cultivados *in vitro*, demostrando con ello el efecto de las condiciones y medios de cultivo, así como el nivel de diferenciación (Ibrahim, 2022).

En hojas de zábila (*Aloe vera*), se obtuvo una mayor producción de aloína, uno de los principales metabolitos, en callos y hojas de plántulas *in vitro*, que en hojas de plantas silvestres (Matos-Acurero, 2011). Esta variación, tanto del perfil como del contenido de compuestos secundarios, se relacionan con cambios en la actividad antioxidante, como se señaló recientemente en cultivos *in vitro* de la orquídea *Rhynchochilus rossii* (Gutiérrez-Sánchez *et al.*, 2020). En plantas micropropagadas de *Spilanthes acmella* se encontró el espilantol, un insecticida producido en las flores de una planta *in situ*, así como el N-isobutil-2E,4Z,8Z,10E-dodecatetraenamida, un potente larvicida producido en plántulas micropropagadas, que no está presente en la planta *in situ* (Leng *et al.*, 2011).

En la búsqueda de producción de fitoesteroides que son compuestos que tienen actividad biológica como antidiabéticos y anticancerígenos, éstos se produjeron en líneas de suspensiones celulares de *Catharanthus roseus*, así como la producción de campesterol y β -sitosterol en cultivos celulares de *Tabernaemontana montana*, *Apium graveolens* y *Morinda citrifolia*, reportando que la producción de

estos fitoesteroides depende de la etapa de diferenciación celular como de la edad del cultivo celular (Dyas *et al.*, 1994; Verpoorte *et al.*, 2002; Saiman *et al.*, 2014; Miras-Moreno *et al.*, 2016).

En cultivos *in vitro*, los reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) tienen influencia en la producción y modificación del perfil químico de los metabolitos secundarios, el ácido jasmónico o jasmonato, es un regulador que induce la producción de alcaloides, fitoalexinas, terpenoides, fenoles, cumarinas y e incluso se ha visto que puede promover la biosíntesis de otros reguladores de crecimiento como la auxina endógena (ácido indol-3-acético, AIA). En cultivos *in vitro* de *Onosma paniculatum* se encontró, que este regulador promueve la producción de shikonina y sus derivados (Kovač *et al.*, 2003; Akula y Ravishankar, 2011; Robin *et al.*, 2020). En general, la producción de metabolitos secundarios ocurre tanto en cultivos indiferenciados (callos y suspensiones celulares) y diferenciados (brotes, raíces y plántulas), pero depende de la especie, de las condiciones de cultivo y del nivel de diferenciación. Hay diversos ejemplos que demuestran una alta producción de compuestos en cultivos *in vitro*, incluso de compuestos que no se producen o no están presentes en las plantas *in situ* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cultivos vegetales *in vitro* con una mayor producción del contenido de metabolitos secundarios y nuevos compuestos.

PLANTA	CULTIVO IN VITRO	COMPUESTOS	REFERENCIA
<i>Psidium guajava</i> (Guayaba)	Brotes (MS 2 mg/L BA)	23 nuevos compuestos (Triterpenos, saponinas y ácidos fenólicos)	Capote <i>et al.</i> , 2009
<i>Aloe vera</i> (Sábila)	Callos (MS 0.5 mg/L 2,4-D y 0.1 mg/L Kin) Hojas de plántulas (MS 0.5 mg/L 2,4-D y 5 mg/L Kin)	Aloína	Matos-Acurero, 2011
<i>Tanacetum parthenium</i> (Matricaria)	Brotes (MS 0.5 mg/L ANA y 1 mg/L Kin)	Compuestos fenólicos Partenólida	Nieto Trujillo <i>et al.</i> , 2017

<i>Rhynchosele rossii</i> (Orquídea)	Plántulas	Escopoletina Quercetina Ácidos cinámicos	Gutiérrez- Sánchez <i>et al.</i> , 2020
---	-----------	--	---

3. JUSTIFICACIÓN

Los cultivos *in vitro* de plantas son una herramienta biotecnológica que permite una rápida proliferación de diferentes tejidos, tanto indiferenciados (callos y células en suspensión) como diferenciados (brotes y plántulas) en condiciones aséptica controladas. Con esta técnica se obtiene la producción de metabolitos secundarios, incluidos los aceites esenciales, con fines de determinar la influencia de las condiciones de los cultivos vegetales *in vitro* en las variaciones de la cantidad y composición de estos aceites esenciales, como se ha reportado en cultivos *in vitro* de diversas plantas aromáticas medicinales.

En estas investigaciones se ha observado una relación directa entre el perfil de los compuestos volátiles de los aceites esenciales y la actividad biológica. Debido a que no hay publicaciones sobre la composición del aceite esencial obtenido de cultivos *in vitro* (callos, células en suspensión, brotes y plántulas) de *T. lucida*, y es necesario determinar la relación del perfil de los compuestos volátiles de los diferentes cultivos con la actividad biológica, en específico con la actividad antifúngica.

4. HIPÓTESIS

El perfil de compuestos volátiles del aceite esencial de *Tagetes lucida* depende del tipo de cultivo *in vitro* (cultivos celulares, brotes y plántulas) y se relaciona directamente con la actividad antifúngica.

5. OBJETIVOS

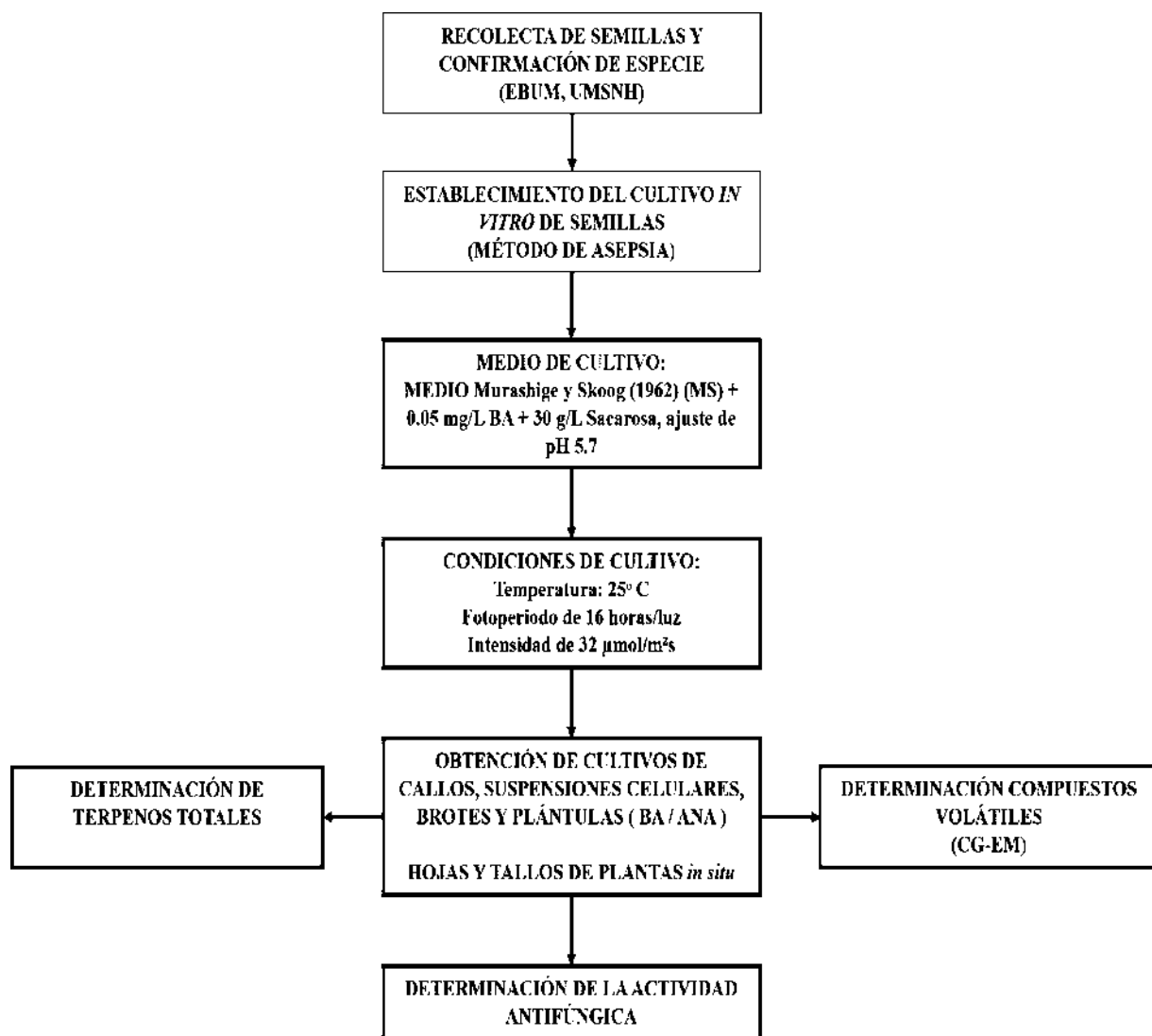
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre el perfil de compuestos volátiles con la actividad antifúngica de cultivos celulares, brotes y plántulas *in vitro* de *T. lucida*.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Establecer cultivos *in vitro* de pericón (*T. lucida*) a partir de la siembra de semillas.
2. Evaluar las condiciones y medios de cultivo para obtener cultivos celulares (callos y suspensiones celulares), brotes y plántulas *in vitro* de *T. lucida*, variando la concentración y tipos de reguladores de crecimiento (auxinas/citocininas).
3. Determinar el crecimiento (cinéticas de crecimiento) y el contenido de terpenos totales en los cultivos *in vitro* (callos y suspensiones celulares, brotes y plántulas), así como de hojas y tallos de plantas recolectadas *in situ* de *T. lucida*.
4. Identificar y cuantificar los compuestos volátiles de cultivos *in vitro* (callos y suspensiones celulares, brotes y plántulas), así como de hojas y tallos de plantas recolectadas *in situ* de *T. lucida*.
5. Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de los cultivos celulares, brotes y plántulas *in vitro* de *T. lucida*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. CAPÍTULO 1.

Establecimiento *in vitro* y determinación del crecimiento de cultivos celulares (callos y suspensiones celulares), brotes y plántulas de *Tagetes lucida* Cav. (pericón).

Resumen

Tagetes lucida (Asteraceae) es una planta muy utilizada en el sector agrícola alimentario y farmacéutico, debido a que produce aceites esenciales con propiedades terapéuticas atribuidas a sus componentes volátiles como los terpenos y fenilpropanos. Comúnmente es conocida como pericón o *yauhtli* y su perfil químico varía por la fenología y por factores bióticos y abióticos. Los cultivos *in vitro* son una alternativa para estudiar la producción de sus aceites esenciales en un ambiente controlado, en los que los reguladores de crecimiento tienen una función importante en los procesos de diferenciación y dediferenciación celular, también involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios como los volátiles. El objetivo de este trabajo es determinar la relación del efecto de los reguladores de crecimiento con la diferenciación celular durante el establecimiento de los cultivos de callos y de suspensiones celulares, brotes y plántulas de *T. lucida*, para posteriormente determinar la producción de compuestos volátiles y su relación con la actividad antifúngica. El establecimiento *in vitro* de plántulas de *T. lucida* se logró con la siembra de semillas en medio Murashige y Skoog (MS) con 0.05 mg/L de benciladenina (BA). A los 7 días de la siembra se obtuvieron plántulas de 5 cm de altura, consiguiendo un 36% de germinación y a los 28 días, éstas fueron fuente de explantes (yemas axilares) que fueron cultivados en medio MS con ácido naftalenacético (ANA) y BA en concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0, solos o combinados. A los 28 días del cultivo, se determinaron los medios óptimos para la formación de callos (0.5 mg/L ANA), de brotes (0.5 mg/L BA), así como para desarrollo de plántulas (0.05 mg/L BA) y se consiguió el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos friables, los mismos que se inocularon en medio MS líquido más 0.5 mg/L de ANA, utilizando diferentes inóculos (0.5, 1, 2 y 5 g/50 mL) en condiciones de luz y oscuridad, para elegir el óptimo inóculo y condición de cultivo para con éstas realizar cinéticas de crecimiento. De cada sistema, se determinaron parámetros de crecimiento (peso fresco, p.f. en g; altura, cm; o número de brotes) para cada tipo de cultivo *in vitro*. Con los resultados de estas cinéticas de crecimiento durante 36 días, se observó un crecimiento exponencial en todos los cultivos, en plántulas se obtuvo 0.48 g (p.f.) a los 32 días, 6.4 veces más que el presentado al inicio del cultivo, con una altura máxima de 11.53 cm; en brotes, a los 28 días se alcanzó 1.3 g (p.f.) con una altura promedio de 5.3 cm de altura; en callos a los 32 días, la biomasa máxima fue de 2.13 g (p.f.) con 3.3 cm de diámetro; y, en las suspensiones celulares, se obtuvieron 6.45 g (p.f.) a los 24 días, correspondiente a 0.4 g (p.s.). De acuerdo a estas cinéticas, es perspectiva realizar la cuantificación de terpenos totales, durante tres etapas de cada cinética (tiempo inicial, fase exponencial y al inicio de fase estacionaria), así como el perfil de volátiles por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) al inicio de los cultivos y al final de la fase exponencial.

Palabras clave: Brotes, callos, compuestos volátiles, plántulas, suspensiones celulares, *Tagetes lucida*.

Introducción

Las plantas producen metabolitos secundarios (alcaloides, compuestos fenólicos, glúcidos y terpenos) como parte de sus mecanismo de defensa, la producción de éstos está ligada a distintos factores en el medio ambiente donde crecen las plantas, los que pueden ser abióticos (luz solar, nutrientes del suelo, humedad, temperatura y pH, entre otros) y bióticos (herbívoros, parásitos y microorganismos patógenos). Los metabolitos secundarios les sirven a las plantas para atraer a polinizadores, como reguladores de crecimiento y reguladores de poblaciones tanto de plantas (alelopatía) como de microorganismos, dentro de esta última actividad se encuentra la actividad bactericida y antifúngica (Vogel y Berti 2003; Muñoz-Concha *et al.*, 2004; Nezhadali *et al.*, 2014; Torres-Martínez *et al.*, 2014; Carreón-Abud *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018; Isah, 2019; Espinosa-García, 2022).

Desde la antigüedad, las plantas han sido empleadas en la medicina tradicional por nuestros ancestros (Yang *et al.*, 2018; Isah, 2019; Espinosa-García, 2022) y en la actualidad son importantes no solo en la medicina e industria farmacéutica como medicamentos y precursores de medicamentos, sino también en la industria agrícola, con gran potencial como alternativa para evitar o disminuir el uso de plaguicidas químicos sintéticos, que afectan el medio ambiente y que son dañinos en la salud humana. Hoy en día se sabe que aproximadamente el 5% de las plantas consideradas como superiores tienen alguna propiedad medicinal y esto se debe a sus componentes bioactivos (Aquino *et al.*, 2002; Cicció, 2004; Céspedes *et al.*, 2006; Sharifi-Rad *et al.*, 2017; Gutiérrez-Gaitén *et al.*, 2018; Chiocchio *et al.*, 2021; Wawrosch y Zotchev, 2021; Espinosa-García, 2022). Sin embargo, la producción de los metabolitos secundarios puede variar en contenido y tipos de compuestos dependiendo de la especie, órgano o parte de la planta, etapas de desarrollo, ubicación geográfica, condiciones climáticas y nutricionales; ejemplos de esto se han reportado para diversas especies vegetales como *Menta piperita*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Digitalis purpurea*, *Salvia officinalis*, *Satureja macrostema*, *Arnica montana*, entre muchas más (Vogel y Berti 2003; Muñoz-Concha *et al.*, 2004; Nezhadali *et al.*, 2014; Torres-Martínez *et al.*, 2014; Carreón-Abud *et al.*, 2015).

Para el estudio de la producción de compuestos vegetales bajo condiciones controladas y determinar cómo éstas pueden incidir en la variación del contenido y producción, los cultivos *in vitro* son una alternativa, ya que se mantienen en condiciones de asepsia y bajo el control de luz,

temperatura, pH y nutrientes (Dodds y Roberts, 1995; Thorpe, 2007; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Wawrosch y Zotchev, 2021). Diversos reportes indican que existe diferencia en la producción de compuestos en las plantas o cultivos *in vitro* con las plantas cultivadas de forma convencional, tales son los casos como *Psidium guajava* (guayaba) donde se encontraron 23 nuevos compuestos no reportados en los estudios de las plantas cultivadas de forma convencional, pertenecientes a triterpenos, saponinas y ácidos fenólicos (Capote *et al.*, 2009). En *Aloe vera* se reportó una mayor cantidad de aloína en cultivos *in vitro* que de forma convencional (Matos-Acurero, 2011); así mismo, en *Tanacetum parthenium*, la concentración de compuestos *in vitro* varía dependiendo del tipo de tejido, ya que se reportó una mayor producción en plántula en comparación a raíces, dependió del tiempo de cultivo, y de la concentración de los reguladores de crecimiento, es decir, del grado de diferenciación celular (Nieto Trujillo *et al.*, 2017).

Tagetes lucida Cav. es una especie de la familia asterácea, una de las familias más grandes y diversas, estudiada en el ambiente científico, debido a la variabilidad en el contenido y composición del aceite esencial que las especies de esta familia producen, con un contenido alto de terpenos, cumarinas y fenilpropanos, y sobre todo por la alta bioactividad de estos compuestos como las propiedades antipiréticas, antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas, entre otras (Emerenciano *et al.*, 2006; Bessada *et al.*, 2015). El género *Tagetes* cuenta con aproximadamente 27 especies en México y las más conocidas son *Tagetes erecta* (flor de cempasúchil) y *Tagetes patula* (clavel de moro o damasquina), muy utilizadas en la industria no solo por su atractivo ornamental, sino que también se extraen diferentes metabolitos, principalmente pigmentos. *T. lucida* es una hierba considerada como maleza que produce un alto contenido de aceite esencial (Marotti *et al.*, 2004), cuyos compuestos son responsables de la actividad antibacteriana, antioxidante y antifúngica (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2009; Fulgencio-Negrete, 2013; Torres Martínez *et al.*, 2022).

Los cultivos *in vitro* de la mayoría de especies de *Tagetes* se han establecido a partir de la siembra de semillas y tejidos vegetativos como hojas y tallos, utilizando el medio basal de Murashige y Skoog (1962) y combinaciones de citocininas como benciladenina (BA) y auxinas como el ácido indolacético (AIA) o el ácido naftalenacético (ANA), en diferentes concentraciones. Como fuente de explantes, en la mayoría de los trabajos se emplean plántulas de tres semanas de edad, obtenidas *in vitro* a partir de semillas (Osman *et al.*, 2012; Majumder *et al.*, 2014; Zapata *et al.*, 2022). Los métodos de desinfección son cruciales durante la fase del establecimiento *in vitro*, para disminuir

la contaminación. Existen diferentes métodos de desinfección para algunas especies de *Tagetes*, en los que se utiliza etanol absoluto o al 70% e hipoclorito de sodio y Tween 20, en diferentes concentraciones y tiempos de exposición tanto de semillas como explantes, los que finalmente son enjuagados con aguas estéril para su cultivo *in vitro* en un área estéril (campana de flujo laminar) (Zapata *et al.*, 2022).

La callogénesis es promovida por una proporción de concentraciones de auxina y citocinina, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ANA son inductores frecuente de callos. La brotación múltiple está influenciada también por la relación y tipo de auxina/citocinina, aunque las mejores respuestas se han registrado utilizando ácido indolacético (AIA), ANA, BA y cinetina (KIN). El genotipo también es importante, ya que una relación de reguladores del crecimiento puede inducir brotes en una especie o variedad, pero en otra puede generar diferentes respuestas como callos o raíces. Con 15 mg/L de BA y 1.75 mg/L de AIA se obtuvo el mayor número de brotes en ápices de *T. erecta* (Miranda-Ham *et al.*, 2016), aunque en *T. patula* la concentración óptima es de 10 mg/L (Osman *et al.*, 2012); Munshi *et al.* (2021) reportaron un 90% de formación de callo en segmentos de hoja de *T. erecta* cultivados en MS con 5.0 mg/L de BA y 2.5 mg/L de ANA, con un alto porcentaje (80%) de formación de brotes en MS con 1.0 mg/L de BA y 0.5 mg/L de KIN. Las plantas fueron regeneradas, con la formación de raíces, en MS con 1.0 mg/L de ácido indol butírico (AIB). Karjee *et al.* (2020) en explantes de yema floral de *T. patula* cultivados en MS con 1.0 mg/L de BA con 0.5 mg/L de KIN y 1.0 mg/L de AIA, obtuvieron una óptima formación de brotes (3.67/explante).

En este capítulo se presentan los resultados del establecimiento *in vitro* de *T. lucida* con la siembra de semillas y se evaluó la variación de la concentración de auxinas (ANA, AIB) y citocininas (BA) para obtener el cultivo de callos, suspensiones celulares, formación y multiplicación de brotes, así como la formación de plántulas. Así mismo, se realizaron cinéticas de crecimiento para determinar los tiempos óptimos de crecimiento como el peso (g), altura (cm) y el número de brotes.

Materiales y métodos

Material biológico. Las semillas fueron recolectadas de plantas crecidas en su hábitat, en los alrededores de la presa de Cointzio, municipio de Morelia, Michoacán (19°37'46.6''N - 101°14'48.8''O), en el mes de septiembre de 2021 (Figura 3A). Éstas fueron sometidas a secado a temperatura ambiente previo el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Se confirmó su

clasificación taxonómica mediante la herborización de partes de la planta (Figura 3B), en el Herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (EBUM) (No. Folio 31380), bajo la asesoría y supervisión de la Biol. Rosa Isabel Fuentes Chávez (Figura 3C).



Figura 3. Semillas (A), ejemplar de herbario (B) y certificado de herborización (Folio 31380) (C) de *Tagetes lucida* Cav.

Condiciones de cultivo y medios de cultivo. Para los cultivos *in vitro* en medio semisólido, se utilizaron frascos de cultivo de vidrio de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo, con tapa tipo magenta. Para las suspensiones celulares se utilizaron matraces de diferentes volúmenes, dependiendo de la experimentación. Tanto para el establecimiento *in vitro* como para los cultivos de callo, suspensiones celulares, brotes y plántulas, la incubación se realizó en condiciones de cuarto de cultivo: 25° C de temperatura, un fotoperiodo de 16 horas/luz, lámparas de luz blanca fluorescente con una intensidad de 32 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Se utilizó el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), usando soluciones concentradas (stocks), mantenidas en refrigeración o congelación. Todas las sales son de Meyer® (México); las vitaminas, myo-inositol, glicina y los reguladores de crecimiento (benciladenina, BA; ácido α -naftalenacético, ANA), son de Sigma-Aldrich® (México). La sacarosa y agar son de Bioxón®, México.

Establecimiento del cultivo *in vitro*. El establecimiento *in vitro* se realizó con la siembra de semillas, las que fueron tratadas con un método de asepsia ya establecido previamente en nuestro grupo de trabajo para diversas plantas medicinales, utilizando detergente neutro e hipoclorito de sodio comercial como soluciones de asepsia (Villa-Patricio, 2012) que consistió en lo siguiente: 100 semillas fueron inmersas por 15 minutos en detergente neutro con 5 g/L del fungicida comercial Tecto60® (Tiabendazol 60), para posteriormente ser enjuagadas con agua corriente; después fueron tratadas con etanol al 70% por dos min, para ser sumergidas finalmente en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% (1.2% de cloro activo) con 5 g/L de Tecto60® por 20 min. Previo al cultivo *in vitro*, las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril en una campana de flujo laminar y se cultivaron tres semillas por frasco de cultivo con medio MS suplementado con 0.05 mg/L de benciladenina (BA), 7 g/L de agar y 30 g/L de sacarosa, con un ajuste de pH de 5.7. Se evaluó la eficiencia del método de asepsia como porcentaje de contaminación bacteriana o fúngica, el porcentaje de germinación y el tiempo de inicio de la formación de la plántula, durante los primeros 14 días del cultivo. Las plántulas obtenidas fueron cultivadas cada 28 días en mismo medio de establecimiento, las que fueron utilizadas como fuente de explantes (yemas apicales) para la obtención de callos, brotes y formación de plántulas micropropagadas.

Obtención de cultivos de callos, brotes y plántulas. Para obtener la respuesta de indiferenciación y diferenciación *in vitro*, se cultivaron segmentos de hojas, tallos y yemas en medio MS con diferentes concentraciones (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mg/L) de BA y ANA (solos o en combinación) y se determinó el medio de cultivo con la óptima relación BA/ANA para cada tipo de cultivo, evaluando cada 7 días, el porcentaje de respuesta, tamaño del callo, número y tamaño de brotes, así como la altura de las plántulas, obteniendo cada respuesta como porcentaje.

Establecimiento de las suspensiones celulares. Para obtener las suspensiones celulares se realizó un cultivo previo masivo de callo, en medio líquido MS con 0.5 mg/L de ANA, medio óptimo para el crecimiento y desarrollo de éstos, a los 15 días del cultivo, se recolectaron para iniciar el cultivo de las suspensiones celulares, los callos presentaron un crecimiento de 2.5 cm de diámetro, de color verde y disgregables (Figura 4A). Para esto, se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml a los que se agregó 50 mL de medio MS líquido con 0.5 mg/L de ANA, los que se llevaron a

esterilidad en autoclave previo a su uso. La siembra se realizó en campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad (Figura 4B), utilizando inóculos de 0.5, 1, 2, 2.5 y 5 g (p.f.) de los callos previamente recolectados el mismo día del experimento, los matraces inoculados se llevaron a cuarto de cultivo y se pusieron en movimiento en un agitador orbital (100 rpm) en dos condiciones (luz y de oscuridad) (Figura 4C). Después de 15 días, para la obtención del peso de la biomasa celular, las suspensiones de cada matraz se filtraron, se pesaron y en base a las características de los agregados celulares y a la biomasa obtenida (Figura 4D), se escogió el inóculo y mejor condición de cultivo para realizar las cinéticas de crecimiento y establecer suspensiones celulares para posteriores estudios.

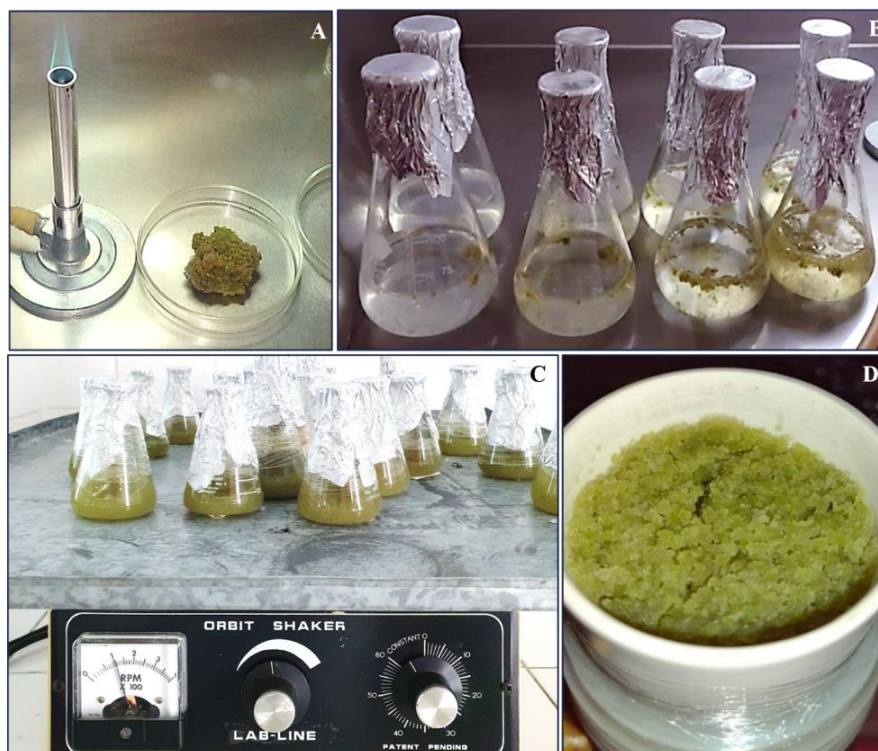


Figura 4. Proceso para el establecimiento de células en suspensión de *T. lucida* a partir de callo: A), Callo de 15 días de cultivo; B) Matraces con diferentes cantidades de inóculo de callo; C) Matraces con células en suspensión en agitación orbital; D, Obtención de biomasa (células) por el método de filtración.

Cinéticas de crecimiento de plántulas, brotes, callos y suspensiones celulares. Se realizaron cinéticas de crecimiento para cada uno de los cultivos *in vitro*, se evaluaron los diferentes parámetros de crecimiento cada 4 días, durante 36 días. Los parámetros que se determinaron en

plántula y brotes fue el peso fresco (g), altura de brotes (cm) y número de brotes; para callos se determinó el tamaño en diámetro (cm) y peso fresco (g); y en suspensiones celulares, se obtuvo peso fresco y peso seco (g), utilizando el método de filtración en embudo con vacío. Cada sistema *in vitro* fue cultivado en MS con su respectiva concentración de la combinación BA/ANA, con un inóculo inicial establecido para cada cultivo.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar. Se usó un número de muestra de $n=5$ y se realizó un análisis de varianza de una vía, Las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Resultados y discusión

Establecimiento de cultivos *in vitro* de pericón (*T. lucida*) a partir de la siembra de semillas

Con la rutina de asepsia utilizada, se logró el establecimiento *in vitro* de semillas de *T. lucida*, obteniendo solamente un 10% de contaminación, la germinación inició a los 7 días (Figura 5A) y aunque el porcentaje de germinación fue bajo (36%), se consiguió el desarrollo de plántulas de 2.5 cm a los 14 días del cultivo (Figura 5B) y de hasta 4 cm de altura a los 28 días del cultivo (Figura 5C).

De las cien semillas cultivadas *in vitro*, 36 mostraron un óptimo desarrollo con una altura de 4 cm, presentando hasta tres nudos con la formación de tres pares de hojas, que fueron utilizadas para iniciar los estudios para la inducción de formación de callo, brotación múltiple y regeneración de plántulas.

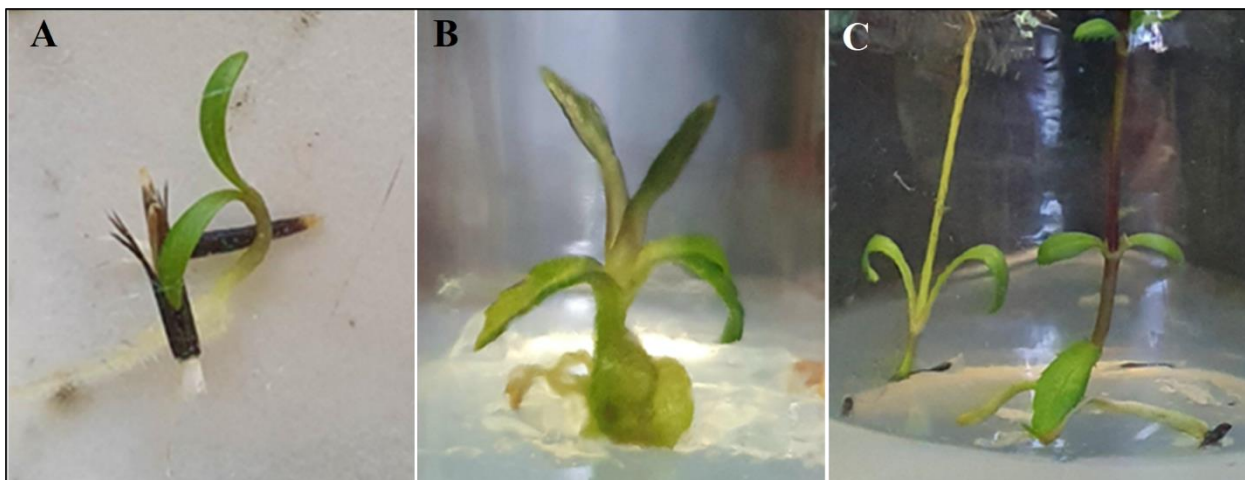


Figura 5. Establecimiento del cultivo *in vitro* con la siembra de semillas de *Tagetes lucida*: germinación a los 7 días de cultivo (A) y desarrollo de plántulas a los 14 (B) y 28 días (C) de cultivo en MS con 0.05 mg/L de BA.

La contaminación del 10% fue solo por hongos, considerando como óptima la rutina de asepsia utilizada, ya que en semillas de nurite (*Satureja macrostema*) y de *Ageratina jocotepecana*, se reportaron porcentajes de contaminación similares (10-15%) (Villa-Patricio, 2012; Anguiano-Aguilar, 2021). El bajo porcentaje de germinación puede deberse a la especie o bien al tiempo después de la recolecta (9 meses), ya que Acosta de la Luz *et al.* (2010) obtuvieron nula germinación en semillas recién recolectadas y Rosales-Zamora (1995) reportó que los porcentajes de germinación están en función del almacenamiento.

Inducción de formación de callos, multiplicación de brotes y regeneración de plántulas *in vitro*

Con las distintas concentraciones y combinaciones de BA/ANA, se realizó la siembra de explantes provenientes de plántulas de *T. lucida* de 28 días de cultivo *in vitro* en MS con 12 tratamientos, para elegir la relación BA/ANA con respuesta óptima para callo, brotes y plántulas, determinada a los 28 días del cultivo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Respuesta de morfogénesis en explantes (yemas apicales) de *Tagetes lucida* en la combinación BA/ANA a diferentes concentraciones, a los 28 días del cultivo.

TRATAMIENTO	BA/ANA (mg/L)	CALLO (%)	BROTES (%)	PLÁNTULAS
1	0/0	10 ^c	0 ^c	90 ^b
2	0.05/0	0 ^d	0 ^c	100 ^a
3	0.1/0	50 ^b	50 ^b	0 ^c
4	0.5/0	0 ^d	100 ^a	0 ^c
5	1/0	50 ^b	0 ^c	0 ^c
6	5/0	50 ^b	50 ^b	0 ^c
7	0.1/0.1	50 ^b	50 ^b	0 ^c
8	0.5 /0.5	50 ^b	0 ^c	0 ^c
9	1/1	50 ^b	50 ^b	0 ^c
10	0/0.1	50 ^b	0 ^c	0 ^c
11	0/0.5	100 ^a	0 ^c	0 ^c
12	0/1	50 ^b	0 ^c	0 ^c

Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Debido a las diversas respuestas en la formación de callo, brotes y plántulas, se seleccionaron tres tratamientos, uno para la óptima formación y crecimiento de callos (T11, 0.5 mg/L de ANA), otro para la mayor producción de brotes (T4, 0.5 mg/L de BA) y el óptimo para la regeneración y desarrollo de plántulas (T2, 0.05 mg/L de BA). En algunos tratamientos se obtuvo la formación de callos, pero en forma incipiente con bajo crecimiento (T5, T8, T10 y T12), o la formación de callo con la presencia de brotes (T3, T6, T7 y T9), y aunque se obtuvo la formación de plántulas en los tratamientos T1 y T2, en el primero se formó callo en la base, con poca formación de raíces, a diferencia de las plántulas obtenidas en T2, donde hubo la formación óptima de raíces (Cuadro 4).

A los 28 días del cultivo de los explantes, los callos del tratamiento T11 (0.5 mg/L de ANA) alcanzaron 2 cm de diámetro, fueron friables (fácil de disgregarse) y de color amarillo-verdoso (Figura 6A); el mayor número de brotes fue de 21 brotes/explante y estos fueron de 1 cm de altura (Figura 6B); las plántulas micropropagadas alcanzaron los 7 cm con hasta 5 nudos con 10 pares de hojas y 1 raíz principal con 6 raíces secundarias/plántula (Figura 6C).



Figura 6. Respuesta óptima de morfogénesis en yemas apicales de plántulas de *Tagetes lucida* a los 28 días del cultivo para la formación de callo (A) en 0.5 mg/L de BA, multiplicación de brotes (B) en 0.5 mg/L de BA, regeneración de plántulas (C) en 0.05 mg/L de BA, y suspensiones celulares en 0.5 mg/L de BA (D).

Establecimiento de cultivo de suspensiones celulares de Tagetes lucida. Se obtuvieron suspensiones celulares con diferencias en los agregados celulares que estuvieron en condiciones de luz, las células tomaron un color verde, indicativo de la presencia de clorofila y en condiciones de oscuridad los agregados celulares fueron de color amarillento con aglomerados celulares más grandes que los observados en las suspensiones cultivadas en luz. Debido a estas características, se eligió como mejor condición de cultivo, la agitación a 100 rpm en presencia de luz, y con el uso de 1g de inóculo, ya que, con éste, se observaron agregados celulares de un tamaño medio y fue donde se obtuvo el mayor peso fresco con 11 veces más el peso inicial (Cuadro 5, Figura 6D).

De acuerdo a los estudios en suspensiones celulares, la morfología celular está ligada a una mayor o menor producción de metabolitos secundarios, tanto en concentración como en la composición, según sea el tamaño de los agregados celulares y la diferenciación celular. Con agregados celulares más grandes y células con cloroplastos (verdes), en general se ha demostrado una mayor producción de diferentes tipos de metabolitos secundarios, ya que, con la presencia de cloroplastos, el metabolismo celular es más complejo y puede llevar a un mayor contenido de compuestos, siendo lo contrario en agregados celulares pequeños y con un nivel mayor de indiferenciación (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007; Sánchez-Calvo y Alvarenga-Venutolo, 2015).

Cuadro 5. Elección de medio de cultivo óptimo de suspensiones celulares de *Tagetes lucida*, mediante la selección de inóculo de acuerdo al peso y características morfológicas, obtenidas a los 15 días del cultivo en MS con 0.5 mg/L de ANA.

Inóculo inicial (g/50 mL)	Agregados celulares (Luz)	Agregados celulares (Oscuridad)	Peso (g) (Luz)	Peso (g) (Oscuridad)
0.5	90% ^a	100% ^a	6.7 ^b	5.3 ^c
1	65% ^b	75% ^b	11.0 ^a	8.6 ^a
2	35% ^c	50% ^c	7.3 ^b	6.4 ^b
5	15% ^d	25% ^d	4.2 ^c	7.8 ^a

Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Cinéticas de crecimiento de cultivos *in vitro* de *T. lucida*

Para obtener las cinéticas de crecimiento de cada uno de los cultivos *in vitro*, se obtuvo el peso fresco de plántulas, brotes, callos, y suspensiones celulares, así como el tamaño (cm) y el número de brotes de las plántulas y ápices en brotación, el diámetro (cm) de callos, y peso seco (g) en suspensiones celulares.

Cinéticas de crecimiento en plántulas. Las plántulas mostraron un crecimiento continuo durante 32 días del cultivo, tanto en peso fresco (p.f.) como en altura (cm), alcanzando a este tiempo, un peso fresco de 0.48 g, 6.4 veces más que el presentado al tiempo inicial del cultivo, incluso mayor al obtenido a los 28 días, no habiendo diferencias significativas con este valor (Figura 7A). A los 36 días, el peso disminuyó debido a que las plántulas mostraron un decaimiento del crecimiento, debido a la falta de nutrientes del medio de cultivo, mostrando un peso de 0.2 g (p.f.).

A los 32 días, las plántulas también consiguieron una altura máxima, con 11.53 cm, con diferencia significativa con la alcanzada a los 28 días (9 cm) y 36 días (10 cm) (Figura 7B). El tiempo máximo de crecimiento, tomando en cuenta estos parámetros, se requiere de 32 días para que las plántulas alcancen su máximo crecimiento.

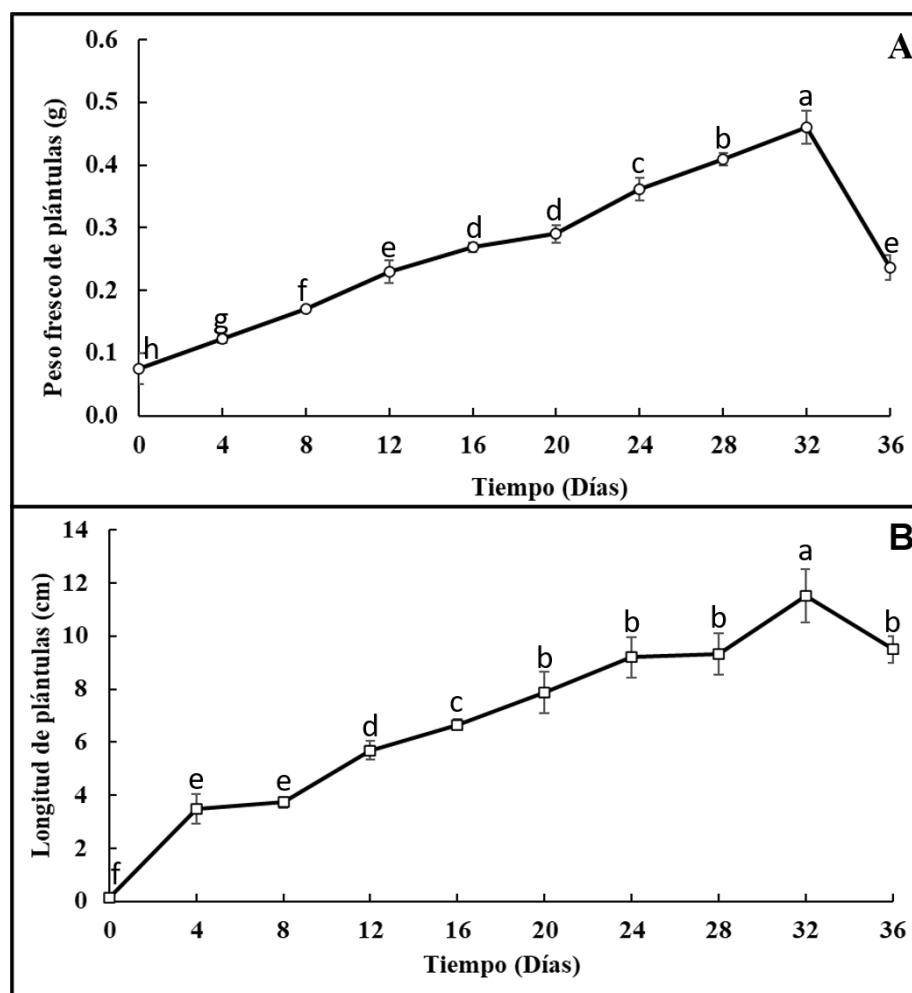


Figura 7. Determinación de crecimiento de plántulas de *Tagetes lucida*: A) Peso fresco (g); B) Altura (cm). Durante 36 días de cultivo en MS con 0.05 mg/L de BA. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Cinéticas de crecimiento en brotes. Durante el cultivo de brotes, el crecimiento observado tuvo un comportamiento similar al de las plántulas, mostrando un crecimiento continuo a lo largo de la determinación, tanto de peso fresco como de la altura de los brotes (Figura 8). La ganancia de biomasa (peso fresco) inició en forma exponencial hasta los 16 días, alcanzando 1.3 g a los 28 días, valor que no mostró diferencia significativa con el observado a los 24 días, con 1.2 g (p.f.), multiplicando 13 veces el peso del cultivo inicial.

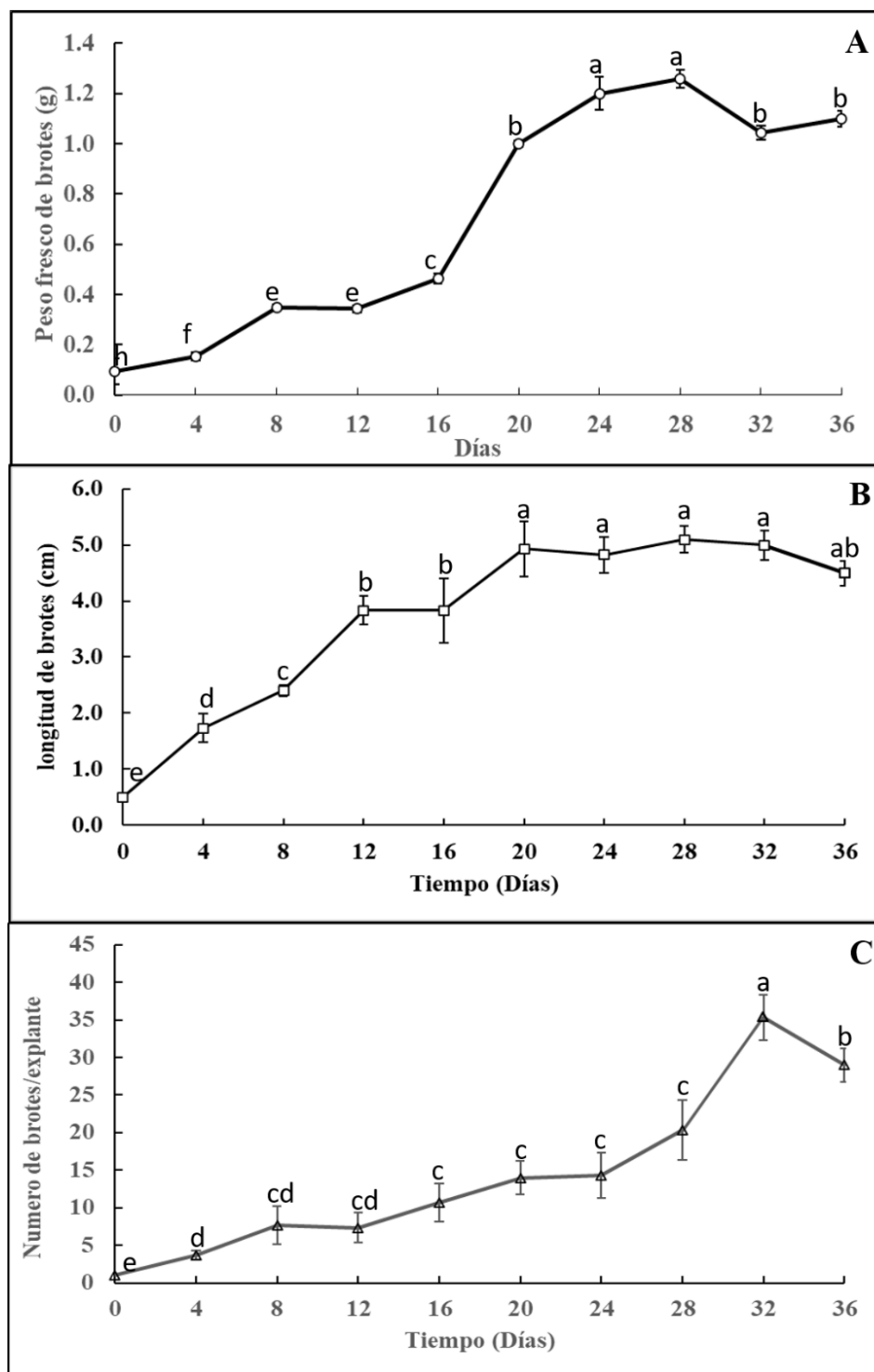


Figura 8. Determinación de crecimiento de brotes de *Tagetes lucida* durante 36 días en MS con 0.5 mg/L de BA: A) Peso fresco (g); B), Altura (cm); C) Número de brotes. Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

A partir de los 32 días, el crecimiento disminuyó con valores de 1 y 1.1 g (p.f.) a los 32 y 36 días, respectivamente (Figura 8A). La ganancia de altura en brotes tuvo un comportamiento exponencial a partir del T0 hasta los 12 días, alcanzando 3.8 cm, observando un aumento a partir de los 20 días, obteniendo el máximo valor a los 28 días con 5.1 cm, aunque no se observaron diferencias significativas entre los 20 y los 36 días del cultivo (Figura 8B), esta ganancia de altura fue 10.2 veces más que el inóculo inicial.

El número de brotes por explante mostró también un aumento desde los primeros cuatro días del cultivo, produciendo 3.7 brotes/explante, doblando este valor a los 8 días con 7.7 brotes/explante y a los 24 días con 14.3 brotes/explante, llegando a una máxima producción a los 32 días con 35.3 brotes/explante, un valor con diferencia significativa respecto a los demás días. A los 36 días el número de brotes disminuyó (Figura 8C).

Cinética de crecimiento de callos. La respuesta de crecimiento en callos de *T. lucida* también tuvo un comportamiento continuo en el parámetro de peso fresco (g) del tiempo inicial, alcanzando los 1.12 g a los 20 días, con un aumento de 1.9 g a los 24 y obteniendo el máximo crecimiento a los 28 y 32 días, con 2.13 y 2.04 (p.f.), respectivamente, con diferencias significativas con los días continuos (32 y 36 días) (Figura 9A). Este máximo peso fue 10.8 veces más que el peso fresco al tiempo inicial.

En cuanto a la determinación del diámetro del callo, éste mostró también un crecimiento continuo desde los 4 días, tiempo en el que desarrolló con 1.1 cm, el cual aumentó en forma exponencial hasta los 28 días, alcanzando los 3.2 cm de diámetro, aunque el máximo valor fue mostrado a los 32 días con 3.3 cm de diámetro, 6.5 veces más que el obtenido en el tiempo inicial, sin diferencia significativa con el valor observado a los 28, pero si con el de los 36 días del cultivo (Figura 9B).

Cinéticas de crecimiento de suspensiones celulares. La respuesta de crecimiento en suspensiones celulares tuvo un comportamiento continuo en peso fresco (g) y peso seco (g) con respecto al tiempo inicial en los primeros 12 días, alcanzando 5.8 g (p.f.), tiempo en el cual se mantuvo baja la ganancia de peso, no habiendo diferencias significativas desde los 12 hasta los 24 días, aunque

el valor máximo se obtuvo a los 24 días con 6.45 g (p.f.), con diferencia significativa al valor obtenido a los 28 días (Figura 10A). Este valor fue 8.55 veces más que el peso del inoculo inicial.

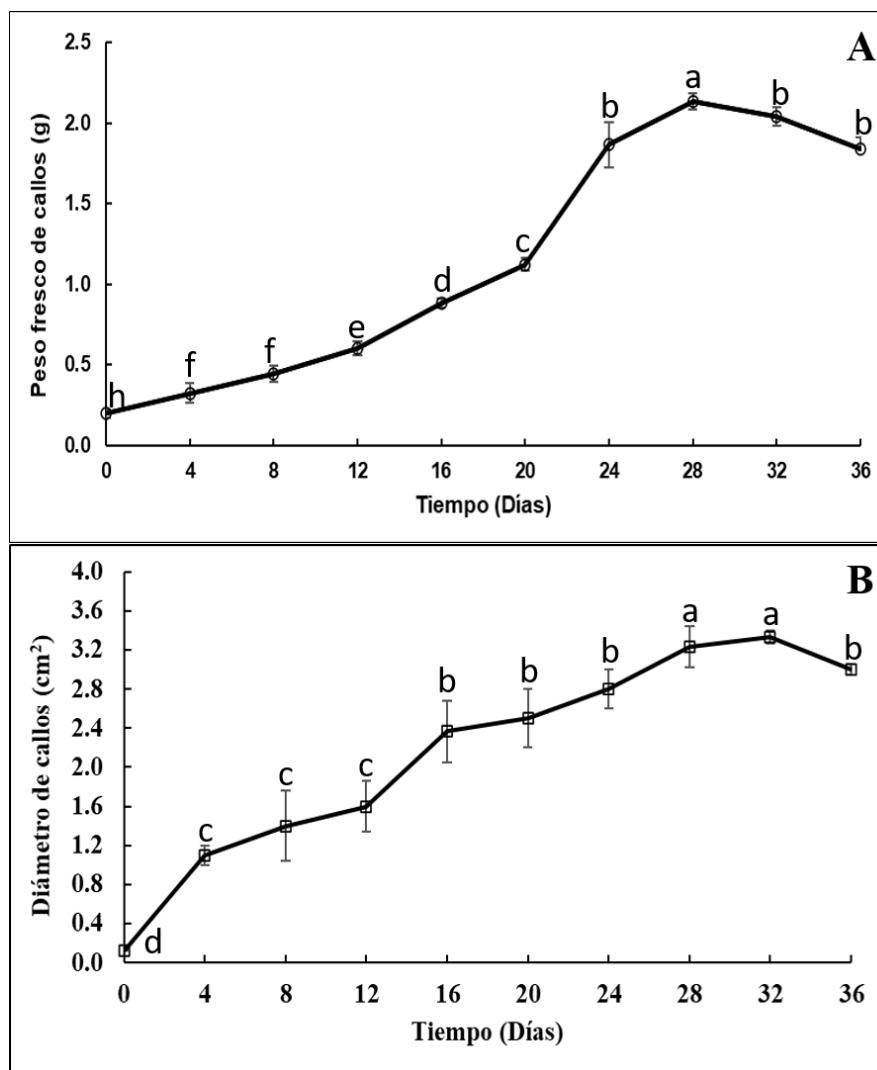


Figura 9. Determinación de crecimiento de callos de *Tagetes lucida* durante 36 días en MS con 0.5 mg/L de ANA: A) Peso fresco (g); B) Diámetro (cm). Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Con respecto a los resultados en peso seco, el comportamiento fue similar al observado con la determinación del peso fresco, con un crecimiento exponencial hasta los 12 días, obteniendo un peso de 0.4 g existiendo una diferencia significativa con respecto a anteriores tiempos de

determinación. Los valores de peso seco desde los 12 hasta los 28 días, fueron similares sin mostrar diferencias significativas entre ellos, siendo el valor máximo a los 12 días, siendo 11.6 veces mayor que el peso del inóculo inicial. Sin embargo, aunque no hubo diferencia significativa con el peso mostrado a los 28 días (0.32 g p.s.), pudo verse un ligero decrecimiento, lo cual puede indicar muerte celular debido a la falta de nutrientes (Figura 10B).

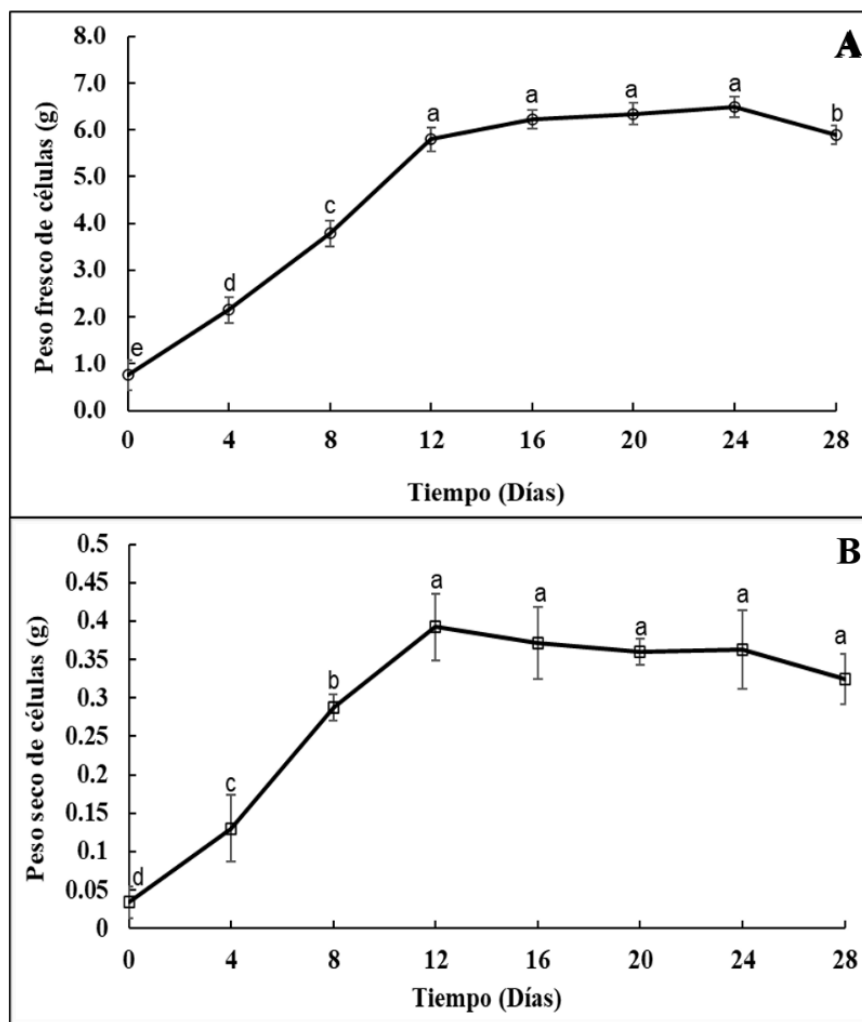


Figura 10. Determinación de crecimiento en base a peso (g) de células en suspensión de *Tagetes lucida*, durante 28 días en MS con 0.5 mg/L de ANA: A) Peso fresco (g); B) Peso seco (g). Letras distintas indican que existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

El crecimiento celular en los cultivos *in vitro* está ligado a factores como el tipo de explante el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, la luz, entre otros factores, que puede afectar el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación y el metabolismo celular. Los requerimientos de cada sistema celular son diferentes para cada uno. Los reguladores de crecimiento tienen una función de las más importantes en la respuesta *in vitro*, ya que la concentración utilizada en los medios de cultivo para inducir las diferentes respuestas de morfogénesis, depende del tipo de explante, de la edad de éste o de la fenología de la planta fuente y de la especie vegetal (Laguna-Ibarra *et al.*, 2019; Miladinova-Georgieva *et al.*, 2022).

En el caso de *Tagetes lucida* para poder regenerar la planta a partir de semillas primero se llevó a cabo un método de asepsia el cual es importante, ya que es un paso crucial para establecer el cultivo *in vitro*, sin que los microorganismos como bacterias y hongos, interfieran en el crecimiento del explante (Padhi y Singh, 2017). Las semillas se cultivaron en medio de cultivo MS y una vez obtenida las plántulas con la adición de 0.05 g/L de BA, se realizaron subcultivos a partir de yemas apicales, produciendo una cantidad mayor de material vegetal para utilizar como explantes, que dieron origen a los diferentes cultivos como los brotes (0.5g/L BA), los callos (0.5 g/L ANA) y de éstos, se obtuvieron las suspensiones celulares en medio líquido (0.5 g/L ANA).

En las suspensiones celulares se observó que debido a la diferencia en la cantidad de inóculo, utilizado en los matraces, se produjeron agregados celulares más grandes o más pequeños y esto a su vez podría afectar la producción de metabolitos secundarios para obtener una mayor o menor cantidad de éstos. El crecimiento en luz (células verdes) y en oscuridad (células cloróticas), que se observó durante el cultivo, se sabe que afecta la producción de metabolitos secundarios. Un inóculo (1g p.f. en condiciones de luz) se eligió de los 8 tratamientos(luz/oscuridad) (0.5, 1, 2 y 5 g) que se efectuaron, debido a que fue con el que se obtuvo un mayor contenido de biomasa y con características óptimas como células verdes y agregados celulares con un tamaño intermedio, para producir metabolitos secundarios (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007; Sánchez-Calvo y Alvarenga-Venutolo, 2015).

Con las cinéticas de crecimiento realizadas para cada uno de los cultivos *in vitro* de *T. lucida*, se determinaron las diferentes fases de crecimiento, así como el tiempo en el que obtuvieron el mayor

crecimiento. Nieto-Trujillo *et al.* (2021) establecieron a partir de semillas cultivos *in vitro* de *Arnica montana* con el que obtuvieron un sistema *in vitro* similar al realizado en la presente investigación, consiguiendo suspensiones celulares a las que realizaron cinéticas de crecimiento que se llevaron a cabo durante 30 días, donde se pudieron distinguir tres fases, la fase de adaptación, una logarítmica (3-15 días) y una fase estacionaria de (15 a 30 días). En las cinéticas de crecimiento de los distintos cultivos de tejidos vegetales que se obtuvieron de *T. lucida*, con los siguientes parámetros que se determinaron, como peso (g), altura (cm) y número de brotes contra el tiempo (días), se observaron estas distintas y características fases, sobre todo la fase exponencial y estacionaria. Con esto, los resultados demuestran un óptimo crecimiento en todos los cultivos *in vitro*, ya que se alcanzaron los valores máximos de crecimiento. Con estas cinéticas de crecimiento se determinó el tiempo óptimo de subcultivo de cada sistema celular en los cuales posteriormente se realizará la extracción del aceite esencial para la evaluación de los compuestos terpénicos totales, la cuantificación e identificación de los compuestos volátiles, y la actividad antifúngica de cada uno de ellos.

Conclusiones

Se establecieron los cultivos *in vitro* de *Tagetes lucida* por la siembra de semillas, logrando el desarrollo de plántulas, utilizadas como fuente de explantes para los estudios de obtención de los diferentes cultivos (callos, brotes y plántulas).

Se seleccionaron los medios óptimos para la inducción de callos, multiplicación de brotes, regeneración y desarrollo de plántulas, con la adición de diferentes concentraciones de BA y ANA. Se establecieron las suspensiones celulares a partir de callo, las que mostraron un óptimo crecimiento en condiciones de agitación orbital con 100 rpm, en presencia de luz.

Mediante la realización de las cinéticas de crecimiento para cada uno de los cultivos *in vitro*, se determinaron los tiempos de cultivo con los valores máximos de cada uno de los parámetros medidos, como el peso fresco y altura para plántulas, número y longitud en brotes, así como el peso fresco y diámetro en callos, y el peso fresco y seco en células en suspensión.

Referencias

- Acosta de la Luz, L., Hechevarría Sosa, I. y Rodríguez Ferradá, C. (2010).** Estudios preliminares para el establecimiento del cultivo de *Tagetes lucida* Cav. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(1).
- Amin, S., Kaloo, Z.A. Singh, S. y Altaf, T. (2013).** Micropropagation of medicinally important plant species of family *asteraceae* – a review. *International Journal of Recent Scientific Research*, 4(8), 1296–1303. URL: <https://recentscientific.com/micropropagation-medicinally-important-plant-species-family-asteraceae-%E2%80%93-review>
- Anguiano-Aguilar, R. (2021).** Micropropagación por organogénesis directa a partir de yemas apicales de *Ageratina jocotepecana* B.L. Turner. Tesis Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 46p.
- Aquino R., Cáceres A., Morelli S. y Rastrelli L. (2002).** An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *J Nat Prod*; 65(12):1773-1776. DOI: 10.1021/np020018
- Arratia, J. y Aguirre, J. (2013).** Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), 98–108. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1405-888x\(13\)72081-3](https://doi.org/10.1016/s1405-888x(13)72081-3)
- Belarmino, M.M., Abe, T., Sasahara, T. (1992).** Callus Induction and Plant Regeneration in African marigold (*Tagetes erecta* L.). *Japanese Journal of Breeding*, 42(4), 835–841. DOI: <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.42.835>
- Benítez-García, I., Vanegas-Espinoza, P. E., Meléndez-Martínez, A. J., Heredia, F. J., Paredes-López, O. y Del Villar-Martínez, A. A. (2014).** Callus culture development of two varieties of *Tagetes erecta* and carotenoid production. *Electronic journal of biotechnology: EJB*, 17(3), 107–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.01.004>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M. y Oliveira, M. B. P. P. (2015).** Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>
- Blanco-Hernández, R., Ruíz -Ramos, M., Sánchez-Rodríguez, M. A. y Mendoza-Núñez, V. M. (2004).** *Lipoperóxidos, actividad antioxidante y factores Prooxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus Tipo 2.* *Bioquímica*, 29(4), 118-125.
- Capote, A., Pérez-Alonso, N., Pérez, A., Wilken, D., Gerth, A., Müller-Kuhrt, L. y Jiménez, O. (2009).** Efecto del cultivo in vitro en el perfil metabólico de *Psidium guajava* L. *Biotecnología vegetal*, 9(1). URL: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/306>

- Carreón-Abud, Y., Torres-Martínez, R., Farfán-Soto, B., Hernández-García, A., Ríos-Chávez, P., Bello-González, M. Á. y Salgado-Garciglia, R. (2015).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases the content of volatile terpenes and plant performance in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(4), 273-279.
- Cassells, A. C., Walsh, C., Belin, M., Cambornac, M., Robin, J. R. y Lubrano, C. (1999).** Establishment of a plantation from micropropagated *Arnica chamissonis* a pharmaceutical substitute for the endangered *A. montana*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 56(2), 139–144. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1006224215503>
- Céspedes, C. L., Ávila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J. C. y Salgado-Garciglia, R. (2006).** Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3521–3527. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf053071w>
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A. K., y Bisaria, V. S. (2002).** Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE*, 7(3), 138–149. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf02932911>
- Cicció, J. F. (2004).** A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 52(4), 853–857.
- Dodds, J. H. y Roberts, L. W. (1985).** *Experiments in plant tissue culture*. International Potato Center.
- Espinosa-García, F. J. (2022).** The role of phytochemical diversity in the management of agroecosystems. *Botanical Sciences*, 100(Special), S245–S262. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.3075>
- Espinoza, P. E. V., Benítez-García, I., Peralta, A. L. L., Paredes-López, O. y Del Villar-Martínez, A. A. (2017).** Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Plant Biotechnology (Tokyo, Japan)*, 34(4), 187–192. DOI: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.1120a>
- Fulgencio-Negrete, R. (2013).** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (nurite, santa maría y toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 85 p.
- Gutiérrez-Gaitén, Y., Scull-Lizama, R., García-Simón, G. y Montes-Álvarez, A. (2018).** Evaluación farmacognóstica, fitoquímica y biológica de un extracto hidroalcohólico de *Tagetes lucida* Cavanilles. *Rev Cub Plantas Med*; 23(2):1-7.

- Harbage, J. F. (2001).** Micropropagation of *Echinacea angustifolia*, *E. pallida*, and *E. purpurea* from Stem and Seed Explants. *HortScience: A Publication of the American Society for Horticultural Science*, 36(2), 360–364. DOI: <https://doi.org/10.21273/hortsci.36.2.36>
- Kaur, R., Kashyap, A., Majeed, S., Chauhan, N. S. y Bhardwaj, S. B. (2010).** In vitro Propagation and Conservation of *Inula racemosa* Hook. f. an Endangered Medicinal Plant of Temperate Origin. *Journal of Advanced Laboratory Research in Biology*, 1(1), 67–70. URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/188610041.pdf>
- Kumar, A., Raghava, S. P. S., Singh, S. K., y Misra, R. L. (2007).** Factors affecting in vitro culture initiation and shoot multiplication in male sterile African marigold (*Tagetes erecta* L.) lines. *The Indian journal of horticulture*, 64(1), 67–72. URL: <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijh&volume=64&issue=1&article=016>
- Laguna-Ibarra, Y., Jhonny, C.-L., Carmen, T.-A. y Olivera-Gonzales, P. (2019).** Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de *Senecio Calvus* (Asteraceae), Planta Medicinal Altoandina, Endémica Del Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 21(2), 111–121. DOI: <https://doi.org/10.18271/ria.2019.455>
- López-Cruz, J. (2017).** *Análisis de la señalización medida por la pared celular y el estrés oxidativo en la interacción planta-patógeno* [Universidad de València]. URL: https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/63815/Tesis%20Doctoral_%20Jaime%20L%C3%B3pez%20CruzRev%20Jaime-DEF%2829-11-2017%29PDF.pdf?sequence=1
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. y Ontiveros, Y. (2004).** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(1), 39–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>
- Majumder, J., Singh, K. P., Singh, S. K., Prasad, K. V. y Verma, M. (2014).** In vitro morphogenesis in marigold using shoot tip as explant. *Indian Journal of Horticulture*, 71(1), 82–86. URL: <https://www.researchgate.net/publication/273382147> In vitro morphogenesis in marigold using shoot tip as explant
- Matos-Acurero A. (2011).** Producción de aloína en callos y hojas de brotes de zábila (*Aloe vera* L.) regenerados *in vitro*. *Bioagro*; 23(2):79-86 ISSN 1316-3361
- Miranda-Ham, M., Castro-Concha, L. A., Avilés-Berzunza, E. y GodoyHernández, G. (2006).** Plant regeneration from shoot apex-derived calluses of marigold (*Tagetes erecta* L.). *HortScience*, 41(6), 1518–1520.
- Misra, P. y Datta, S. K. (2001).** Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant: Journal*

of the Tissue Culture Association, 37(4), 466–470. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0082-2>

Molero-Paredes, T. y Vilorio, M. (2020). Características morfológicas y producción de aloína de plantas poliploides de *Aloe vera* (L.) Burm. F. (Asphodelaceae). *Bioagro-*, 33(1), 41–50. DOI: <https://doi.org/10.51372/bioagro331>

Munshi, J., Baksha, R., Rahaman, M., Huque, N., Zinat, E. y Momtaz, N. (2021). In Vitro plant regeneration from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 56(2), 69–74. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjsir.v56i2.54313>

Muñoz-Acevedo, A., González, M. C., Rodríguez, J. D. y Moya, Y. S. D. (2019). New chemovariety of *Lippia alba* from Colombia: Compositional analysis of the volatile secondary metabolites and some *in vitro* biological activities of the essential oil from plant leaves. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X1986290. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578x19862905>

Muñoz-Acevedo, A., Kouznetsov, V. V. y Stashenko, E. E. (2009). Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-Anetol o estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 287-294.

Muñoz-Concha, D., Vogel, H. y Razmili, I. (2004). Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Revista chilena de historia natural*, 77(1), 43-50.

Nezhadali, A., Nabavi, M., Rajabian, M., Akbarpour, M., Pourali, P. y Amini, F. (2014). Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2), 87–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.05.001>

Nieto-Trujillo, A., Buendía-González, L., García-Morales, C., Román-Guerrero, A., Cruz-Sosa, F. R. y Estrada-Zúñiga, M. E. (2017). Phenolic compounds and parthenolide production from in vitro cultures of *Tanacetum parthenium*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(2), 371-383. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10112300>

Nikam, S. L. y Khan, S. J. (2014). In-vitro callus induction in leaf explants of *Tagetes erecta*, L. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(4). URL: http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/3806_pdf.pdf

Osman, H. A., El-Gindi, A. Y., El-Kazzaz, A. A., Taha, H. S., Youssef, M. M., Ameen, H. H. y Lashein, A. M. (2008). Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*: 1 - In vitro studies on callus induction from marigold plants *Tagetes erecta* L. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 36(1/2), 19-32. URL: <https://scholar.google.com/scholar?cluster=15055461253986720242&hl=en&oi=scholar>

- Osman, H. A., Taha, H. S., Youssef, M. M. A., El-Gindi, A. Y., Ameen, H. H. y Lashein, A. M. S. (2012).** Establishment of *T. erecta* and *T. patula* suspension cultures. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(6), 436-441. URL: <https://www.ajbasweb.com/old/ajbas/2012/June/436-441.pdf>
- Padhi, M. y Singh, S. P. (2017).** Surface sterilization for reducing microbial contamination in in vitro propagation of lasora (*Cordia myxa* roxb.) using nodal segments. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 6(8), 836-842. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.608.106>
- Perales Aguilar, L., Silos Espino, H., Lorenzo, L., Montero, V., Perales, C. y Flores Benítez, S. (2016).** Propagación in vitro de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales, *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 7(2) 375-386. ISSN 2007-0934. URL: <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas>.
- Petrova, M., Zayova, E., Geneva, M., Dimitrova, L., Vitkova, A. y Stanilova, M. (2021).** Multiplication and conservation of threatened medicinal plant *Arnica montana* L. by in vitro Techniques. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 86(1), 57-65. URL: <https://hrcak.srce.hr/255028>
- Rahman, M. M. y Bhadra, S. K. (2011).** Development of protocol for in vitro culture and rapid propagation of *Wedelia chinensis* (Osbeek.) Merr. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(11), 2387-2392 URL: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/2C1A92922607>
- Rather, M. A., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Qayoom, M., Akbar, S., Masood, A., Rasool, R., Wani, S. H. y Qurishi, M. A. (2012).** Comparative GC-FID and GC-MS analysis of the mono and sesquiterpene secondary metabolites produced by the field grown and micropropagated plants of *Artemisia amygdalina* Decne. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(3), 885-890. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0886-6>
- Riaz, M., Ahmad, R., Rahman, N. U., Khan, Z., Dou, D., Sechel, G. y Manea, R. (2020).** Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes Patula* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 255(112718), 112718. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112718>
- Sajjad, Y., Jaskani, M. J., Ashraf, M. Y., Qasim, M. y Ahmad, R. (2014).** Response of morphological and physiological growth attributes to foliar application of plant growth regulators in gladiolus “white prosperity”. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 51(1), 123-129; URL: <https://pakjas.com.pk/papers/2250.pdf>
- Sánchez-Calvo, L. y Alvarenga-Venutolo, S. (2015).** Callus formation of cell suspensions in *Uncaria tomentosa* (cat's claw). *Revista Tecnología en Marcha*, 28(1), 105. DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v28i1.2195>
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M.R., Ademiluyi, A.O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi,**

- S.A. e Iriti, M. (2017).** Biological activities of essential oils: from plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*. 22(1):70.
- Sreelekshmi, R., Swapna, T. S. y Siril, E. A. (2023).** In vitro secondary metabolite production for sustainable utilization of endangered medicinal plants. En *Sustainable Development and Biodiversity* (pp. 451–471). Springer Nature Singapore. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-19-5841-0_18
- Thorpe, T. A. (2007).** History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Torres-Martínez R., Bello-González M.Á., Molina-Torres J., Ramírez-Chávez E., García-Rodríguez Y., Fulgencio-Negrete R., García-Hernández A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M., Lara-Chávez B.N. y Salgado-Garciglia R. (2014).** Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq. *Rev. Mex. Ciencias Forest.*, 5(21):122-134.
- Torres-Martínez, R., Moreno-León, A., García-Rodríguez, Y. M., Hernández-Delgado, T., Delgado-Lamas, G. y Espinosa-García, F. J. (2022).** *Tagetes lucida* Cav. essential oil and the mixture of its main compounds are antibacterial and modulate antibiotic resistance in multi-resistant pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 75(2), 210–223. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.13721>
- Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2007).** La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669–674.
- Tyub, S., Ahmad Dar, S., Maqbool Lone, I., Hussain Mir, A. y Kamili, A. N. (2021).** A robust in-vitro protocol for shoot multiplication of *Echinacea angustifolia*. *Current Plant Biology*, 28(100221), 100221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100221>
- Vanegas-Espinoza, P. E., Ramos-Viveros, V., Rios-Salomé, L. B., Orbe-Rogel, J. C., Paredes-López, O., Cruz-Hernández, A. y Del Villar-Martínez, A. A. (2012).** Analysis of callus development and transient expression in *Tagetes erecta*. *Acta horticulturae*, (937), 963–968. DOI: <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.937.119>
- Vogel, H., y Berti, M. (2003).** Como producir plantas medicinales y aromáticas de calidad. *Ministerio de Agricultura*. Santiago, Chile. URL: <https://bibliotecadigital.ciren.cl/items/02f6eef6-10ed-4e2d-a583-c0b924a382e8>
- Wawrosch, C. y Zotchev, S. B. (2021).** Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6649–6668. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>
- Xu, L.-W., Chen, J., Qi, H.-Y. y Shi, Y.-P. (2012).** Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, 4(2), 103–117. DOI: <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-6384.2012.02.004>

- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F. y Wang, Q. (Eds.). (2018).** Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 23(4). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zapata, C., Serrato, M., Rodríguez, J. y Guerra, D. (2021).** *In vitro* morphogenesis in genus *Tagetes*: A review. *Horticultura Argentina*, 41(104), 200–216. URL: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s18519342/82y7uuffa>

7.2. CAPÍTULO 2.

Perfil químico de aceites esenciales de cultivos *in vitro* (callos, suspensiones celulares, brotes y plántulas) de *Tagetes lucida* Cav. (pericón) y su relación con la actividad antifúngica.

Resumen

En la presente investigación se realizó la determinación del contenido de terpenos totales, así como la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de los aceites esenciales obtenidos con maceración en frío con hexano, de cada uno de los cultivos *in vitro* de *T. lucida* (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas), lo que se comparó con lo producido en hojas y tallos de plantas recolectadas *in situ* en diferentes etapas de crecimiento (E1, brotación; E2, crecimiento vegetativo; E3, floración; E4, senescencia). Lo anterior, con el fin de relacionar el tipo y contenido de los compuestos volátiles con la actividad antifúngica. Un contenido de 9 y 8.4 mg Eq. L/g e.s. fue obtenido en hojas y tallos de planta *in situ* en la etapa E4, respectivamente. En los cultivos *in vitro*, solamente en plántulas se obtuvo el mayor contenido desde los 7 días de cultivo (12.2 mg Eq. L/g e.s.) hasta un máximo valor de 22.2 mg Eq. L/g e.s. a los 28 días del cultivo. En suspensiones celulares, callos y brotes, el mayor contenido fue de 3.3 mg Eq. L/g e.s. Con el análisis por CG-EM se determinó que en hojas de plantas *in situ* en E3, se obtuvo el mayor contenido de metil eugenol (99.37%) con un menor contenido de estragol (0.18%) y cariofileno (0.2%), pero se identificó la presencia del eugenol (0.11%) y el t-elemeno (0.14%); en los tallos de plantas del estadio E3, solo se detectó el metil eugenol con 67.53%. En los cultivos *in vitro*, solamente en brotes y plántulas se identificaron al metil eugenol con 79.19% y 92.65%, respectivamente. En plántulas *in vitro*, además se determinó la presencia de cis- β -ocimeno (0.83%) y cis- β -farneseno (0.57%). En suspensiones celulares y callos no se detectó ningún compuesto volátil. Con los ensayos de actividad antifúngica, los extractos de hoja y tallo, presentaron los porcentajes más altos, con 63.3% y 74.7% en extractos de hojas de los estadios E3 y E4, así como un 53% en el extracto de tallo de estadio E3. Los extractos de los cultivos *in vitro* no mostraron actividad antifúngica. Con esta investigación se determinó la producción de terpenos en los cultivos *in vitro*, aunque no se detectaron para su identificación por CG-EM. La actividad antifúngica está relacionada con la presencia o contenido de los compuestos volátiles, solamente en los extractos de hoja y tallo de planta *in situ*, en los que el metil eugenol es el compuesto mayoritario.

Palabras clave: Compuestos volátiles, cultivos *in vitro*, hojas, *Tagetes lucida*, tallos, terpenos.

Introducción

Tagetes lucida Cav. es una hierba considerada como maleza, que habita en diversas regiones de México, pertenece a la familia Asteraceae, es conocida como pericón, hierbanís, *yauhtli* y santa maría en México, Guatemala, Honduras y Costa Rica, entre otros países, en donde se usa como

parte de su medicina tradicional (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Por su olor agradable a anís, su aceite esencial se emplea en la industria de las fragancias, sabores, en la fabricación de jabones, detergentes y como precursor de la síntesis orgánica para formulaciones farmacéuticas (Gutiérrez-Gaitén *et al.*, 2018). El aceite esencial de *T. lucida* tiene diferentes propiedades biológicas como actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana, entre otras, principalmente por el contenido de compuestos terpénicos y fenilpropanoides, como el metil eugenol, el estragol y el anetol, pero además de los flavonoides quercetagina y patuletina, y las cumarinas herniarina, dimetilalil éter de 7-hidroxicumarina), entre otros (Ciccio, 2004; Céspedes *et al.*, 2006; Gutiérrez-Gaitén *et al.*, 2018).

El cultivo de células, tejidos, órganos y plántulas *in vitro* es considerado una tecnología prometedora para la producción de metabolitos secundarios (Gounaris, 2010; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Murthy *et al.*, 2014), por lo que el conocimiento de los factores que influyen en la síntesis y acumulación de éstos, se ha investigado en diversos estudios como alternativa para la producción de metabolitos secundarios de alto valor (Canter *et al.*, 2005). De esta manera, los cambios en el perfil químico de los diferentes compuestos que se producen, como los volátiles de aceites esenciales, se han observado en algunas plantas o tejidos cultivados *in vitro*, demostrando con ello el efecto de las condiciones y medios de cultivo, así como el nivel de diferenciación.

En cultivos *in vitro* de romero (*Rosmarinus officinalis*) (Jain *et al.*, 1991), de lavanda (*Lavandula* spp.) (Gonzalves y Romano, 2013), de tomillo (*Thymus caespitius*) (Mendes *et al.*, 2013) y de *Caryopteris* spp, entre otras especies aromáticas, se ha analizado el contenido de aceites esenciales tanto de callos, suspensiones celulares, brotes, como de plántulas (Zhu *et al.*, 2000). Aunque pocas son las investigaciones dirigidas hacia el análisis de factores que afectan el contenido y variación de los componentes de aceites esenciales en cultivos *in vitro*, se ha demostrado el efecto de las condiciones y medios de cultivo, así como el nivel de diferenciación, como lo reporta Matos-Acurero (2011) en callos y hojas de plántulas *in vitro* de sábila (*Aloe vera*), y Gutiérrez-Sánchez *et al.* (2020) en los cultivos *in vitro* de la orquídea *Rhynchoetele rossii*. Esta variación, tanto del perfil como del contenido de compuestos secundarios, se relacionan con diferentes actividades biológicas como la antimicrobiana y la actividad antioxidante (Gutiérrez-Sánchez *et al.* 2020). En la orquídea *Rhynchoetele rossii* se ha reportado una mayor actividad biológica debido a que presenta una mayor cantidad de compuestos obtenidos en cultivos *in vitro*, debido a sus metabolitos mayoritarios como escopolamina, quercetina y ácido cinámico (Gutiérrez-Sánchez *et*

al., 2020).

Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *T. lucida* son responsables de la actividad antifúngica (Muñoz-Acevedo *et al.*, 2009; Fulgencio-Negrete, 2013; Torres Martínez *et al.*, 2022). Específicamente se ha comprobado esta actividad contra hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *F. sporotrichum*, *F. moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Botrytis cinerea* (Céspedes *et al.*, 2006; Fulgencio-Negrete, 2013). Dentro de estos, *B. cinerea* es un hongo fitopatógeno que ataca a más de 200 especies vegetales, como plantas ornamentales, árboles, frutales y hortalizas, causando la enfermedad de moho gris en frutos, tallos y hojas, y debido a que tiene múltiples reservorios, es difícil de eliminar por lo que se han empleado fungicidas químicos sintéticos de una forma desmesurada, por tal motivo este hongo ha adquirido resistencia a estos fungicidas, lo que causa grandes pérdidas en la industria agroalimentaria (Nakajima y Akutsu, 2014).

En la presente investigación se realizó el análisis del perfil químico y cuantificación de compuestos volátiles de los diferentes tipos de cultivos *in vitro* (callos, suspensiones celulares, brotes y plántulas) de *T. lucida*, para relacionar el tipo y contenido de los compuestos volátiles con la actividad antifúngica.

Materiales y métodos

Obtención del aceite esencial de los cultivos *in vitro*. Los aceites esenciales se obtuvieron por el método de maceración en frío por 5 días (10°C), utilizando hexano como disolvente en una proporción 1 a 10 (10 ml de disolvente por gramo de tejido, peso fresco). Se recolectó material vegetal de los diferentes tejidos obtenidos *in vitro* de *T. lucida* (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas.) en cuatro etapas correspondientes del crecimiento *in vitro* de cada cultivos (a los 0, 7, 14 y 21 días). Como estudio comparativo, se analizó el perfil de compuestos volátiles de la parte aérea (tallos y hojas) de plantas de *T. lucida*, recolectadas en su hábitat, en los alrededores de la presa de Cointzio, municipio de Morelia, Michoacán (19°37'46.6''N - 101°14'48.8''O), en cuatro diferentes etapas de crecimiento: E1, brotación; E2, crecimiento y desarrollo vegetativo; E3, floración; y, E4, senescencia. Cada macerado fue filtrado por dos veces, utilizando papel filtro Whatman No.1 y se concentró a presión reducida (al vacío) en rotavapor a 50°C para obtener el aceite esencial, el que posteriormente se resuspendió en hexano a una concentración de 10 mg/mL.

Determinación de terpenos totales. La determinación de terpenos totales se realizó mediante el método reportado por Ghorai *et al.* (2012) con modificaciones, utilizando una concentración de cada aceite esencial de 1 mg/mL. El método constó en analizar 100 µL de muestra (aceite esencial), adicionando 300 µL de cloroformo y mezclando en vortex; para posteriormente agregar 100 µL de ácido sulfúrico concentrado, para finalmente incubar las muestras durante 90 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez que se observó la separación de fase (color rojizo), ésta fue obtenida y llevada a otro tubo, al que se le adicionó 450 µL de metanol para leer la absorbancia en celda de cuarzo en espectrofotómetro (UV/VIS VELAB-VE51000UV). El contenido de terpenos totales se determinó empleando una curva de linalool $A_{558} = 0.041 [\text{Linalool}] - 0.0408$, $r = 0.9665$, que se obtuvo a partir de una curva de concentración con siete concentraciones de linalool (1 – 30 mg/mL). El total de terpenos se expresó en miligramos equivalentes de linalool por gramo de extracto seco (mg Eq L/g e.s.).

Determinación de compuestos volátiles por CG-EM. La identificación de los componentes volátiles de cada aceite esencial de los cultivos *in vitro* de *T. lucida*, así como de los de hojas y tallos de plantas, recolectadas en su hábitat, se llevó a cabo mediante inyección en el cromatógrafo de gases Agilent HP6890 acoplado a un detector selectivo de masas Agilent HP5973, con el método reportado por Torres Martínez *et al.* (2014). Se inyectó un volumen de 3 µL de muestra con división de flujo (50:1) a una temperatura de 250 °C con helio como gas acarreador, con un flujo en columna de 1 mL/min en una columna capilar no polar HP5MS Agilent (25m x 0.25 mm x 0.25 µm). El programa de la temperatura en el horno inició a 50 °C por 5 min, aumentando a 5 °C/min llegando a 280 °C por un tiempo de 1 min y aumentó a 25 °C/min hasta 300 °C por 3 min. Las condiciones usadas en el detector selectivo de masas fueron: voltaje de ionización por impacto electrónico a 70 eV; temperatura de la interface a 250 °C, modo SCAN y en un rango de masas de 50-550m/z. La señal del detector fue procesada en el programa *Enviromental ChemStation* (Agilent Technologies), con este programa se identificación de forma automática los compuestos analizados comparándolos con la Biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST11). Se aceptó solo la identificación de los espectros que concordaban por arriba del 90% y su pureza de pico fuera de 1 compuesto. Los compuestos mayoritarios se identificaron por inyección de estándares comerciales (Sigma-Aldrich) (Adams, 2007).

La concentración de cada compuesto se cuantificó con el método de estándar interno usando una solución de tetradecano de concentración conocida (0.125 mg/mL). Esta concentración fue referida al peso seco de tejido presente en cada una de las muestras.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{ÁREA pico} \times 0.125 \text{ mg tetradecano}}{\text{AREA tetradecano}}$$

Las concentraciones relativas se reportaron en el porcentaje del contenido (%) de la muestra.

Determinación de la actividad antifúngica contra el hongo *Botrytis cinerea*. La determinación de la actividad antifúngica se llevó a cabo por medio de bioensayos con el método de difusión en pozos *agar well diffusion assay*, utilizando cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) (Magaldi *et al.*, 2004), que consiste en hacer pozos en el medio de cultivo con una pipeta Pasteur como sacabocado y verter en éstos, 100 µL de cada aceite esencial de los diferentes tejidos obtenidos, para posteriormente colocar discos de micelio (0.5 cm de diámetro) del hongo en estudio. Como control positivo en los bioensayos, se utilizó el fungicida comercial Benomyl 50® (10 mg/mL), para considerarlo como 100 % de inhibición; como control negativo se utilizó hexano, ya que los compuestos volátiles se encuentran inmersos en este solvente. La incubación de los bioensayos se realizó a 25 ± 2 °C y los resultados se reportaron como el porcentaje de inhibición, determinando el crecimiento micelial (mm) cada 24 h, de acuerdo a la fórmula reportada por Rutiaga (2001):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(\text{crecimiento de control} - \text{crecimiento de tratamiento})}{\text{crecimiento de control}} \times 100$$

Análisis estadístico

En experimentos de actividad antifúngica, los resultados se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar, con un número de muestra de $n=6$, realizando un análisis de varianza de una vía. Las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Los resultados del contenido de compuestos se realizaron con una $n=3$. Se utilizó el programa estadístico JMP8.

Resultados y discusión

Para la producción de compuestos de origen vegetal de alta importancia, se recomiendan los cultivos *in vitro*, los celulares o indiferenciados (callos y suspensiones celulares) y los diferenciados como brotes, raíces y plántulas. En este contexto, la shikonina, la berberina, las saponinas triterpénicas de *Panax ginseng*, los taxanos y los polisacáridos de *Polianthes tuberosa*, debido a su óptima producción, son los que potencialmente pudieron llegar a ser producidos comercialmente, pero actualmente no hay sistemas por estas técnicas que sean comercializados (Georgiev *et al.*, 2009), debido a que el contenido de éstos es muy bajo, si se compara que lo que acumula la planta completa y no es costeable su producción (Bonfill *et al.*, 2013).

Sin embargo, la alternativa para la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro*, no solo se realiza con este fin, sino también para desarrollar estudios que determinen los diversos factores involucrados en la biosíntesis *in vitro*, y determinar las condiciones óptimas y el tipo de cultivo, para conseguir el abastecimiento de compuestos durante todo el año, de forma homogénea y de esta manera, apoyar en evitar la sobreexplotación de plantas silvestres productoras de metabolitos secundarios (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

Es por ello que, en la presente investigación, se realizó la determinación del contenido de terpenos totales, el contenido y la identificación de los compuestos volátiles mayoritarios, en los cultivos *in vitro* de *T. lucida* y en hojas y tallos de plantas *in situ*.

Contenido de terpenos totales

Se evaluó el contenido de terpenos totales de los extractos hexánicos obtenidos de hoja y tallo de las cuatro etapas fenológicas de *T. lucida* recolectada en campo, así como de los cultivos vegetales obtenidos (callos, suspensiones celulares, brotes y plántulas) *in vitro* de esta misma planta. Los resultados muestran un contenido total de terpenos en un rango de 4.7 a 9.6 mg Eq. L/g e.s. en los extractos de hoja de plantas *in situ*, con el mayor contenido en las hojas de plantas en etapa de floración (E3) (9.6 mg Eq. L/g e.s.) y en etapa de senescencia (E4) (9 mg Eq. L/g e.s.), sin

diferencias significativas entre éstos, pero si con los demás valores obtenidos de este mismo tipo de extracto (Figura 11).

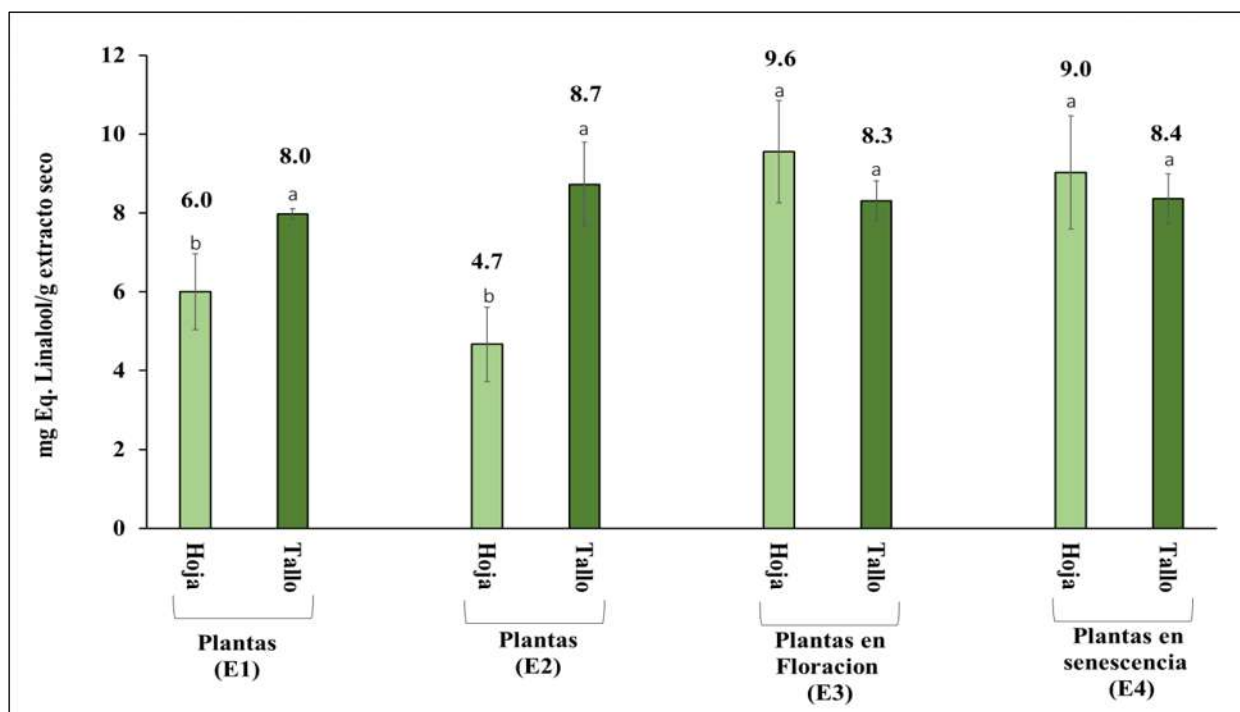


Figura 11. Determinación de terpenos totales en extractos hexánicos de hojas y tallos de plantas de *T. lucida* recolectadas en su hábitat (*in situ*), en cuatro etapas de desarrollo: E1, Plántulas en brotación (5 a 20 cm de altura); E2, Plántulas en crecimiento vegetativo (20 a 30 cm de altura); E3, Plántulas en floración; E4, Plántulas en senescencia. Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Sin embargo, en los extractos de tallo, el rango fue de 8 a 8.7 mg Eq. L/g e.s., sin diferencias significativas entre los valores de cada estadio. Estos valores demuestran que la producción de terpenos en plantas *in situ* de *T. lucida* muestra variaciones durante su desarrollo en hojas, presentando un contenido creciente desde la brotación hasta la floración, manteniéndose durante la senescencia. En tallos, el mayor contenido de terpenos totales se alcanza en el estadio de brotación (E1) y se mantiene en una concentración similar hasta la senescencia (E4) (Figura 11).

Tanto en hojas como en tallos en plantas del E3 y E4, el contenido de terpenos es igual ya que no existen diferencias significativas, con valores que van de 8.3 a 9.6 mg Eq. a L/g e.s.

En cuanto a la producción de terpenos en los cultivos *in vitro* de *T. lucida* (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas), el contenido fue diferente en cada uno de los cultivos y durante los diferentes tiempos de la recolecta de muestras. El mayor contenido se presentó en plántulas con una producción ascendente de 12.2 a 22.2 mg Eq. L/g e.s., siendo este último valor el mayor a los 28 días, en comparación a lo observado en los otros tipos de cultivos, mostrando diferencia significativa (Figura 12). Desde los 7 días, el contenido de terpenos totales de plántulas *in vitro* es mayor al obtenido en hojas y tallos, recolectados de plantas *in situ*, acumulando hasta 22.2 mg Eq. L/g e.s., 2.3 veces más que el contenido en hojas de plantas durante la floración (E3). En algunos cultivos *in vitro* vegetales se producen mayores rendimientos de la producción de compuestos bioactivos, al compararse con las plantas completas (Georgiev *et al.*, 2009).

En los demás cultivos, los valores máximos fueron en un rango de 2 a 3.3 mg Eq. L/g e.s., con 2.7 mg y 2.4 mg a los 14 y 21 días, respectivamente, en suspensiones celulares; 2 mg a los 28 días en callos; y, 3.3 y 2.6 mg en brotes, a los 21 y 28 días, respectivamente. Aunque estos valores son hasta 10 veces más bajos que los producidos por las plántulas *in vitro*, pueden ser considerados óptimos, de acuerdo a lo reportado en investigaciones realizadas con cultivos *in vitro* de otras especies vegetales productoras de aceites esenciales o de compuestos volátiles. En cultivos celulares (callos y suspensiones celulares) de *Salvia miltiorrhiza*, la producción de uno de sus terpenos mayoritarios, la tanshinona es de 0.2 mg/g e.s.; lo mismo ha sido observado en cultivos *in vitro* de *Taxus baccatum*, que producen 0.0132 mg/mL de paclitaxel y 0.0046 mg/mL de baccatina III (Bonfill *et al.*, 2013); así también como en callos de *Citrus grandis*, que solamente acumulan 0.0036 mg/g e.s. de limoneno y 0.007 mg/g e.s. de linalool (Norulaini *et al.*, 2003).

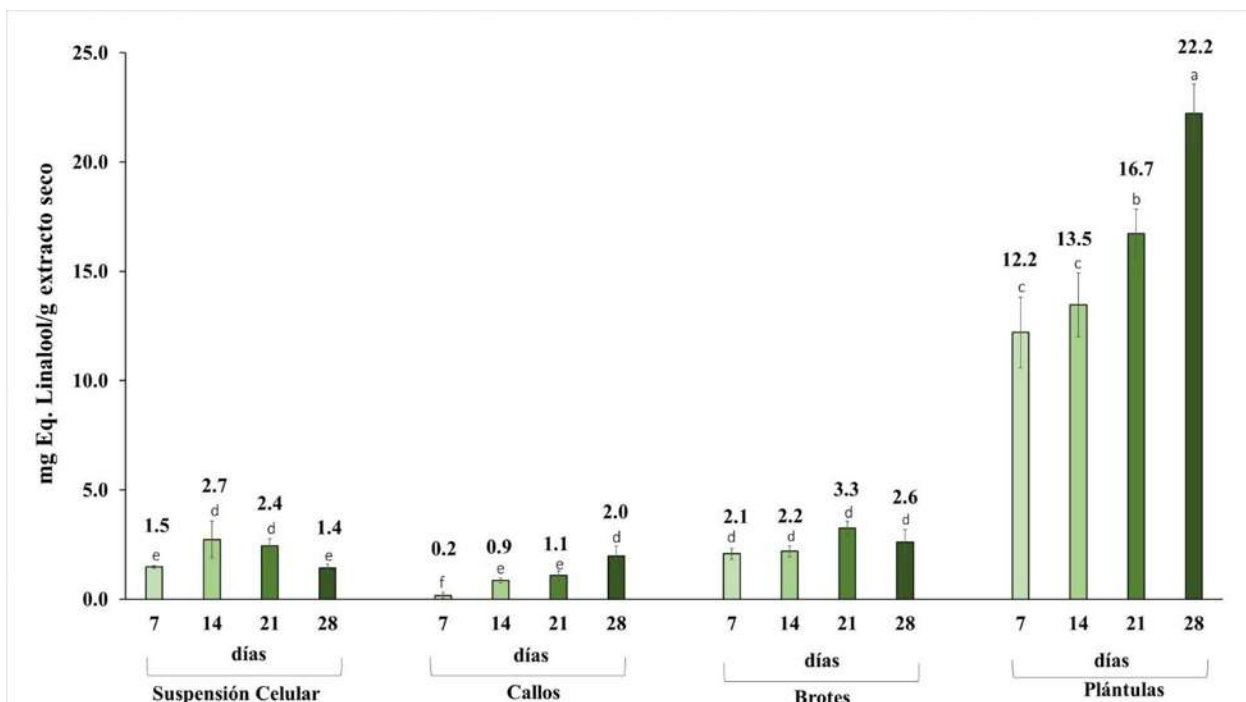


Figura 12. Determinación de terpenos totales en extractos hexánicos de suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas *in vitro* de *T. lucida* de muestras recolectadas durante la cinéticas de crecimiento (7, 14, 21 y 28 días). Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Los reportes indican que la producción de metabolitos secundarios *in vitro* es generalmente mayor en los tejidos diferenciados, como brotes, raíces y plántulas, que en los cultivos indiferenciados, o a veces no acumulan en absoluto, aunque esto no siempre se cumple. Un ejemplo es lo observado con el compuesto antipalúdico, la artemisinina, producido por *Artemisia annua*, que se acumula en cultivos indiferenciados, mientras que solo se han detectado trazas en cultivos de brotes (Liu *et al.*, 2006).

En la presente investigación se determinó una relación directa en la producción de terpenos totales con la diferenciación celular, ya que, en células en suspensión y callos, el contenido fue más bajo, si se compara con lo determinado en plántulas, aunque en brotes, la acumulación no fue dependiente de la diferenciación, con una producción similar a lo mostrado en los cultivos celulares indiferenciados (Figura 12). En cuanto a la acumulación de terpenos totales durante el crecimiento de los cultivos *in vitro*, en células en suspensión, la acumulación fue a los 14 y 21 días, en callos a los 28 días, en brotes y en plántulas a los 21 y 28 días, que corresponden a la fase

exponencial cercana al inicio de la fase estacionaria o a la fase estacionaria, de acuerdo en lo reportado en el Capítulo 1 (Figuras 7, 8, 9 y 10).

Identificación y contenido de compuestos volátiles

Con el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), del contenido del aceite esencial obtenido por maceración con hexano, tanto de hoja y tallo de planta *in situ*, así como de los cultivos *in vitro* de *T. lucida*, se obtuvo una muy baja resolución de los compuestos volátiles presentes, los que se presentan con su tiempo de retención, identificación y contenido (%), en el cuadro 6. Con fines de comparación y verificación de la veracidad del método analítico, en la primera columna se presentan los tiempos de retención de cada uno de los compuestos identificados y cuantificados en porcentaje del contenido, del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de la parte aérea (hojas, tallos e inflorescencias) de *T. lucida*, mostrando la presencia de 15 compuestos, considerando como mayoritarios al metil eugenol (47.89%) y al estragol (27.94%), así como los compuestos terpénicos β -pineno, cis- β -ocimeno, linalool y germacreno D. Estos compuestos están representados en el cromatograma típico que se muestra en la figura 13.

En hoja de plantas *in situ* del estadio E3, en el que se obtuvo el mayor contenido de terpenos totales, solamente se detectó el metil eugenol como mayoritario (99.37%) con un menor contenido de estragol (0.18%) y, cariofileno (0.2%), pero se identificó la presencia del eugenol (0.11%) y el α -elemeno (0.14%), no presentados en parte aérea; en los tallos de plantas del estadio E3, solo se detectó el metileugenol con 67.53% (Cuadro 6). En suspensiones celulares y callos de *T. lucida*, no se detectó ningún compuesto volátil, sin embargo, en brotes solo se identificó como presente al metil eugenol con 79.19% y en plántulas *in vitro*, el metil eugenol fue mayoritario (92.65%), pero además con la presencia de cis- β -ocimeno (0.83%) y cis- β -farneseno (0.57%) (Cuadro 6). El metil eugenol, el compuesto fenilpropano mayoritario reportado para *T. lucida*, se identificó en los diferentes extractos, a excepción de los cultivos indiferenciados (callos y suspensiones celulares), lo que valida el método de análisis realizado y se sugiere que el no haber encontrado los compuestos volátiles en este tipo de cultivos, así como la baja presencia en hojas,

tallos, brotes y plántulas, se debe al sistema de extracción, ya que no se dispuso del suficiente material vegetal.

Cuadro 6. Análisis de compuestos volátiles de extractos hexánicos de hojas y tallos de plantas de *Tagetes lucida* recolectadas *in situ* (E3, floración) y de cultivos *in vitro* (células en suspensión, callos, brotes y plántulas), identificados por CG-EM.

Tiempo de retención (min)	Compuesto	Contenido (%)						
		Planta <i>in situ</i>			Cultivos <i>in vitro</i>			
		Planta (parte aérea)	Hoja	Tallo	Suspensiones celulares	Callos	Brotes	Plántulas
8.25	β-Pineno	8.06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9.83	cis-b-Ocimeno	5.61	nd	nd	nd	nd	nd	0.83
11.31	Linalool	3.35	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14.27	Estragol	27.94	0.18	nd	nd	nd	nd	nd
18.38	Eugenol	nd	0.11	nd	nd	nd	nd	nd
19.02	Geraniol acetato	0.26	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19.30	β-Elemeno	0.23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19.83	Metil eugenol	47.89	99.37	67.53	nd	nd	79.19	92.65
20.13	Cariofileno	0.91	0.20	nd	nd	nd	nd	nd
20.95	cis-β-Farneseno	0.68	nd	nd	nd	nd	nd	0.57
21.66	Germacreno D	2.35	nd	nd	nd	nd	nd	nd
21.94	t-Elemeno	nd	0.14	nd	nd	nd	nd	nd
22.01	Elixeno	1.15	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22.21	β-Himacaleno	0.24	nd	nd	nd	nd	nd	nd
22.60	α-Cadineno	0.52	nd	nd	nd	nd	nd	nd
23.48	β-Bisaboleno	0.59	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25.32	t-Cadinol	0.22	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Sin embargo, estos resultados indican la producción de compuestos volátiles en los sistemas diferenciados como brotes y plántulas, en los que se identificó el metil eugenol, el mayoritario de los extractos de *T. lucida*. Este resultado es acorde a lo reportado en otras investigaciones como lo reportado en callos de *Solanum quitoense* que no tuvieron la capacidad de sintetizar y acumular compuestos volátiles al igual que en la planta intacta. En esta última investigación, los autores reportaron que la mayoría de los compuestos identificados en los cultivos de callos de *S. quitoense*, no se presentan en los tejidos *in vivo*; observaciones similares encontradas en cultivos *in vitro* de *Santolina chamaecyparissus* y *Carum copticum* (Lockwood *et al.*, 2002; Ahuja *et al.*, 2005; Duarte-Hernández *et al.*, 2014).

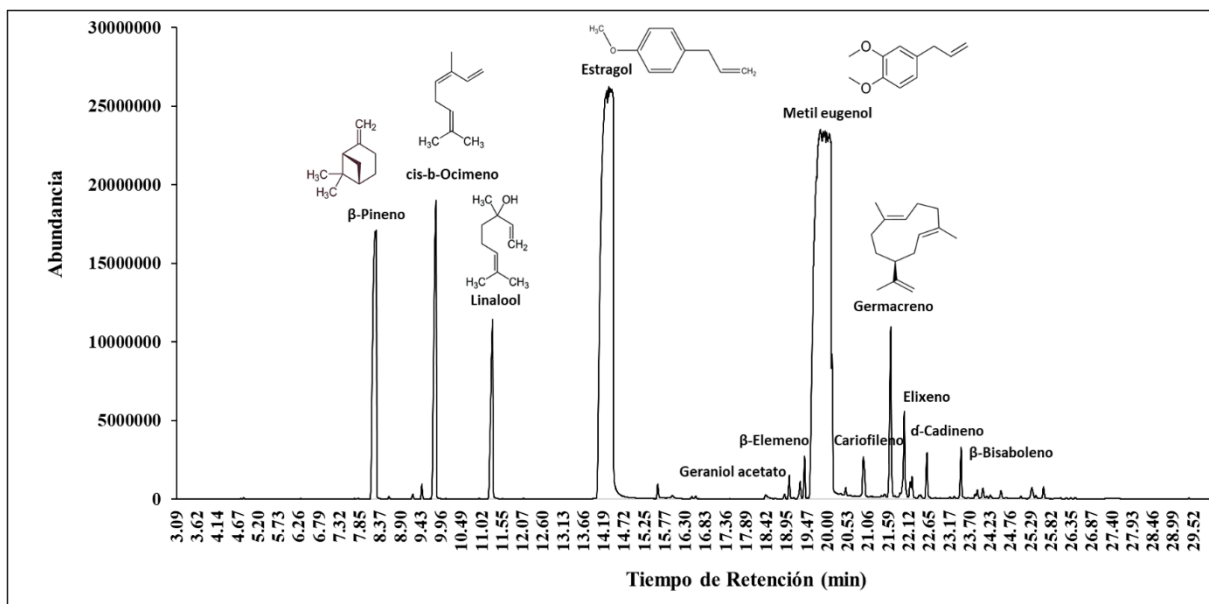


Figura 13. Cromatograma de compuestos volátiles del hidrodestilado de parte aérea de *Tagetes lucida*.

Lo anterior se relaciona con los procesos de diferenciación celular, que son requeridos para la síntesis y acumulación de compuestos volátiles. Se debe destacar que para la producción de compuestos volátiles a partir de cultivos *in vitro* es necesario monitorear la biosíntesis de estos compuestos, para favorecer las condiciones idóneas para su producción en altos rendimientos, así como una excelente elección de las metodologías analíticas que permiten una extracción eficiente de los componentes de interés (Brown *et al.*, 1987; Alonzo *et al.*, 2001).

Actividad antifúngica contra el hongo *Botrytis cinerea*

Se evaluó la actividad antifúngica con los extractos hexánicos de hojas y tallos de plantas recolectadas *in situ* de cada estadio (E1, E2, E3 y E4) y de cada uno de los cultivos *in vitro* (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas), utilizando Benomyl 50® como control positivo (10 mg/mL) y hexano como control negativo. Los extractos de los cultivos *in vitro* de *T. lucida* no mostraron actividad antifúngica, lo que se relacionó directamente con la baja o nula producción de compuestos secundarios, no observados con el análisis por CG-EM (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentajes de inhibición antifúngica sobre *B. cinerea*, de extractos hexánicos de hojas y tallos de plantas *in situ* en cuatro estadios de desarrollo (E1, Brotación; E2, Desarrollo vegetativo; E3, Floración; E4, Senescencia) y de los cultivos *in vitro* (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas *in vitro*) de *T. lucida*.

Tratamiento	Inhibición (%)
Control (-) Hexano	0 ^d
Suspensión Celular	0 ^d
Callos	0 ^d
Brotes	0 ^d
Plántula	0 ^d
Hoja E3	63.3 ± 24 ^b
Hoja E4	74.7 ± 0.25 ^a
Tallo E3	53 ± 1.43 ^c
Tallo E4	0 ^d
Control (+) Benomyl 50	0 ^d

Letras distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$, $n=6$, prueba de Tukey).

En este cuadro se presentan resultados de la actividad antifúngica (%) obtenidos por los extractos de hoja y tallo, con los valores más altos, con 63.3% y 74.7% en extractos de hojas de los estadios E3 y E4, así como un 53% en el extracto de tallo de estadio E3.

En la figura 14 se muestran los anteriores resultados con el crecimiento de micelio o la inhibición de éste, en *B. cinerea*, en los que claramente se observa la nula actividad antifúngica de los cultivos *in vitro* (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas) de *T. lucida*, similares al resultado con el control negativo. Así mismo, se muestra la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* con los extractos de hoja de los estadios E3 y E4, así como del de tallo E3, con la inhibición del 100% con el fungicida comercial Benomyl 50.

Este resultado se relaciona con la presencia de los compuestos volátiles identificados y cuantificados por CG-EM, ya que solo en aquellos extractos en los que se obtuvieron compuestos volátiles, se determinó actividad antifúngica. Aunque, en los diferentes extractos, tanto de los cultivos *in vitro* y de planta *in situ*, el contenido de terpenos totales no tuvo una relación directa con esta actividad biológica.

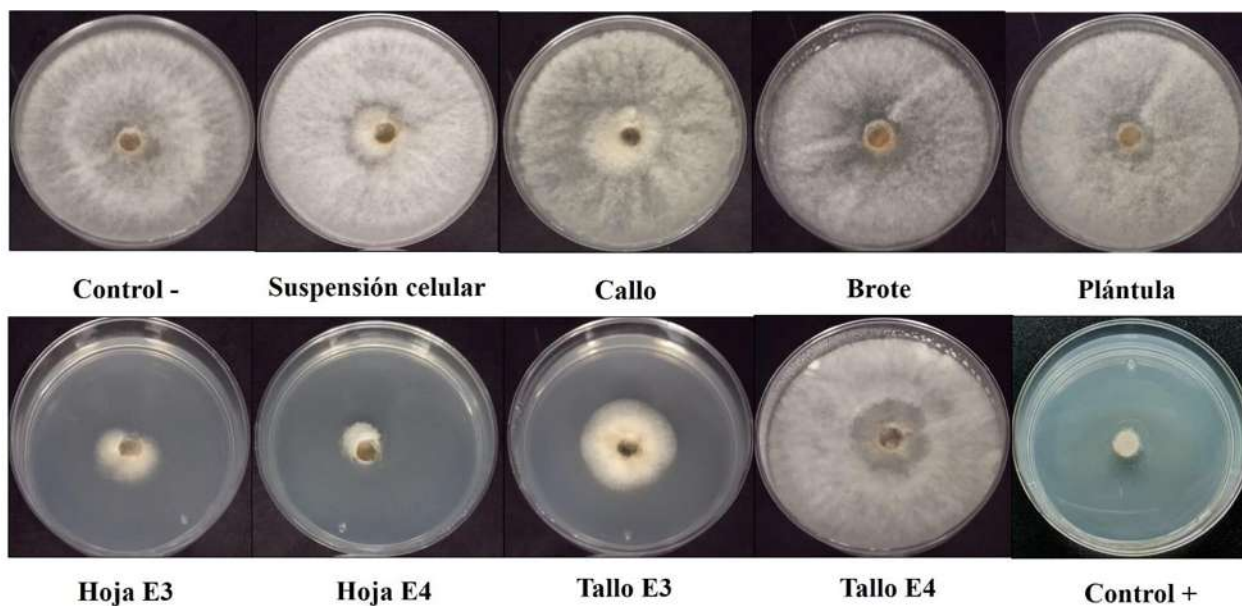


Figura 14. Crecimiento de micelio de *B. cinerea* en ensayos *in vitro* en PDA a los 8 días del cultivo, con la aplicación de hexano (Control -), los extractos de suspensiones celulares, callos, brotes, plántulas, hojas y tallos de los estadios E3 y E4 de *Tagetes lucida*, y Benomyl 50® como Control +.

Conclusiones

El mayor contenido de terpenos totales se obtuvo en las plántulas *in vitro*, con valores mayores a los mostrados por lo otros cultivos *in vitro* (células en suspensiones, callos y brotes), y lo obtenido en hojas y tallos de plantas de *T. lucida*, recolectadas *in situ*.

El compuesto volátil metil eugenol fue identificado y cuantificado tanto en los extractos de hoja y tallo de plantas *in situ*, así como en brotes y plántulas *in vitro*, no así en los cultivos indiferenciados (callos y suspensiones celulares).

La actividad antifúngica solo se obtuvo con los extractos en los que los compuestos volátiles estuvieron presentes en mezcla, no así con solo la presencia del metil eugenol.

Referencias

- Abdulhafiz, F., Mohammed, A., Reduan, M. F. H., Kari, Z. A., Wei, L. S. y Goh, K. W. (2022).** Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(11), 104161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104161>
- Adams, R. P. (2017).** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA: Texensis Publishing.
- Ahuja, A., Bakshi S.K., Sharma S.K., Thappa R.K., Agarwal S.G., Kichlu S.K., Paul R. y Kaul M.K. (2005).** Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flav & Fragrance J*; 20(4): 403-406.
- Alonzo, G., Saiano F., Tusa N. y Fatta del Bosco, S. 2001.** Analysis of volatile compounds released from embryogenic cultures and somatic embryos of sweet oranges by head space SPME. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 66(1), 31-34.
- Açıkgöz, M. A. (2020).** Establishment of cell suspension cultures of *Ocimum basilicum* L. and enhanced production of pharmaceutical active ingredients. *Industrial Crops and Products*, (148)112278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112278>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M. y Oliveira, M. B. P. P. (2015).** Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. *Industrial Crops and Products*, 76, 604–615. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.073>
- Bonfill, M., Malik, S., Mirjalili, M.H., Goleniowski, M., Cusido, R. y Palazón, J. (2013).** Production and genetic engineering of terpenoids production in plant cell and organ cultures. In: Ramawat, K., Mérillon, JM. (eds) *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_123
- Brown, J. T., Hegarty, P. K., Charlwood, V. B., (1987).** The toxicity of monoterpenes to plant cell cultures. *Plant Science*, 48(3), 195-201.
- Brown, J. T. y Charlwood, B. V. (1986).** The accumulation of essential oils by tissue cultures of *Pelargonium fragrans* (Willd.). *FEBS Letters*, 204(1), 117–120. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81397-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81397-7)
- Canter, P.H., Thomas, H. y Ernst, E. (2005).** Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotech*;23(4): 180-185.
- Céspedes, C. L., Ávila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J. C. y Salgado-Garciglia, R. (2006).** Antifungal and antibacterial activities of mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3521–3527. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf053071w>

- Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L. y Poli, F. (2021).** Plant secondary metabolites: An opportunity for circular economy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 495. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26020495>
- Ciccio, J. F. (2004).** A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 52(4), 853–857.
- Duarte-Hernández, A. M., Núñez, K. M., Pacheco, J. C. y Martínez, J. J. (2014).** Compuestos Volátiles Producidos in Vitro por Callos de *Solanum quitoense* Lam. (Solanaceae). *Ciencia en Desarrollo*, 5(1), 49-54.
- Efferth, T. (2019).** Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering (Beijing, China)*, 5(1), 50–59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- El-Shenawy, M. A., Baghdadi, H. H. y El-Hosseiny, L. S. (2015).** Antibacterial activity of plants essential oils against some epidemiologically relevant food-borne pathogens. *The Open Public Health Journal*, 8(1), 30–34. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874944501508010030>
- Emerenciano, V. P., Cabrol-Bass, D., Ferreira, M. J. P., Alvarenga, S. A. V., Brant, A. J. C., Scotti, M. T. y Barbosa, K. O. (2006).** Chemical evolution in the Asteraceae. The oxidation– reduction mechanism and production of secondary metabolites. *Natural Product Communications*, 1(6), 495-507. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578x0600100612>
- Espinosa-García, F. J. (2022).** The role of phytochemical diversity in the management of agroecosystems. *Botanical Sciences*, 100(Special), S245–S262. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.3075>
- Fernández, M. D. S., Hernández-Ochoa, F., Carmona-Hernández, O., Luna-Rodríguez, M., Barrientos-Salcedo, C., Asselin, H. y Lozada-García, J. A. (2020).** Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the in vitro fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista mexicana de fitopatología: la revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, 39(1). DOI: <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-6>
- Fulgencio-Negrete R. (2013).** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (nurite, santa maría y toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 85 p.
- Ghorai, N., Ghorai, N., Chakraborty, S., Gucchait, S., Saha, S. K. y Biswas, S. (2012).** Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, linalool as standard reagent. *Protocol Exchange*. DOI: <https://doi.org/10.1038/protex.2012.055>
- Gounaris, Y. (2010)** Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile

isolates. *Flavour Fragr. J.*, 25:367–386.

- Gutiérrez-Gaitén, Y., Scull-Lizama, R., García-Simón, G. y Montes-Álvarez, A. (2018).** Evaluación farmacognóstica, fitoquímica y biológica de un extracto hidroalcohólico de *Tagetes lucida* Cavanilles. *Rev. Cub. Plantas Med.*, 23(2):1-7.
- Gutiérrez-Sánchez, A., Monribot-Villanueva, J.L., Cocotle-Ronzón, Y., Martínez-Cruz, N.S. y Guerrero-Analco, J.A. (2020).** Phenolic profile and antioxidant activity from wild and in vitro cultivated *Rhynchosstele rossii* (Orchidaceae). *Acta Bot Mex*; 127: e1665. 1-11 DOI: 10.21829/abm127.2020.1665
- Isah, T. (2019).** Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>.
- Liu, C., Zhao, Y. y Wang, Y. (2006).** Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1), 11–20. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0452-0>
- Lockwood, G. B., Asghari, G. y Hakimi, B. (2002).** Production of essential oil constituents by cultured cells of *Carum copticum* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(6), 456-458.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. y Ontiveros, Y. (2004).** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(1), 39–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>
- Malinowska, M., Sikora, E. y Ogonowski, J. (2013).** Production of triterpenoids with cell and tissue cultures. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4), 731-735.
- Marotti, M., Piccaglia, R., Biavati, B. y Marotti, I. (2004).** Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research*, 16(5), 440–444. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698767>.
- Matos-Acurero, A. (2011).** Producción de aloína en callos y hojas de brotes de sábila (*Aloe vera* L.) regenerados *in vitro*. *Bioagro*; 23(2):79-86.
- Mendes, M. D., Figueiredo, A. C., Oliveira, M. M. y Trindade, H. (2013).** Essential oil production in shoot cultures versus field-grown plants of *Thymus caespitius*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 113:341–351.
- Muñoz-Acevedo, A., Kouznetsov, V. V. y Stashenko, E. E. (2009).** Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 287-294.
- Nakajima, M. y Akutsu, K. (2014).** Virulence factors of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology: JGPP*, 80(1), 15–23. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0492-0>

- Norulaini, N., Abdul, N., Rahmani, Z. y Moho, O. A. K. (2003).** Influence of elicitor availability on limonene and linalool accumulation from *Citrus grandis* cell cultures. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 39-49.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., Cabi, E. y Kaya, Y. (2023).** Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 14. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1132555>
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. (2011).** Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 11(4). URL: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255>
- Rutiaga, Q. J. G. (2001).** Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. *Buchverlag Gräfe/fing. München*. p. 49.
- Soni, U., Brar, S. y Kumar Gauttam V. (2015).** Effect of seasonal variation on secondary metabolites of medicinal plants *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research | IJPSR*, 6(9), 3654-3662. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232. URL: <https://ijpsr.com/bft-article/effect-of-seasonal-variation-on-secondary-metabolites-of-medicinal-plants/>
- Soto-Ros, I. (2023).** Optimización del crecimiento vegetal y biosíntesis de terpenos en *Satureja intricata* Lange var. *gracilis* (Willk.) R. Morales, G. López & Sánchez-Gómez mediante cultivo in vitro. Universidad Católica de Valencia.
- Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2007).** La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669-674.
- Wawrosch, C. y Zotchev, S. B. (2021).** Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies—status and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(18), 6649–6668. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11539-w>
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F. y Wang, Q. (2018).** Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zhu, W., Asghari, G. y Lockwood, G.B. (2000).** Factors affecting volatile terpene and non-terpene bio-transformation products in plant cell cultures. *Fitoterapia*, 71(5):501-506.
- Zwenger, S., y Basu, C. (2008).** Plant Terpenoids: Applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3(1), 1. URL: <https://digscholarship.unco.edu/biofacpub/4/>

8. DISCUSIÓN GENERAL

8.1. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *IN VITRO* DE *Tagetes lucida*

La importancia de establecer cultivos *in vitro* de plantas aromáticas recae principalmente en que éstas tienen propiedades muy importantes para sus usos en diferentes industrias, como la farmacéutica, cosmética, de fragancias y alimentaria, pero pocas son cultivadas como la lavanda, orégano, salvia, tomillo, mentas, té verde, entre otras; muchas son recolectadas de su hábitat y algunas de ellas han disminuido sus poblaciones, incluso hasta la extinción. Tan solo en Europa, más de 1300 de este tipo de plantas son sobre colectadas y solamente del 3 al 6% se cultivan (Kupke *et al.*, 2000; Murch *et al.*, 2004; Schippmann *et al.*, 2006; Grigoriadou *et al.*, 2019). Es por ello, que dentro de las diferentes alternativas para su propagación y cultivo, con fines de disminuir la sobre colecta de planta aromáticas, los cultivos *in vitro* ofrecen la micropropagación o el cultivo a partir de semillas para establecer sistemas de estudio para la producción de metabolitos secundarios, sobre todo de compuestos volátiles, de importancia en las industrias antes mencionadas.

El establecimiento *in vitro* por el cultivo de semillas recolectadas de plantas *in situ*, asegura variabilidad genética y el seleccionar las plantas fuente de explantes para conseguir un óptimo desarrollo de los sistemas como callos, células en suspensión, brotes y plántulas. Esto se ha conseguido por una gran diversidad de especies como *Anthyllis splendens*, *Calamintha cretica*, *Lomelosia hymettia* (Papafotiou *et al.*, 2017) y *Sideritis perfoliata* (Papafotiou y Kalantzis, 2009) cultivadas con éxito en medio MS, utilizando el hipoclorito de sodio 2–4% (v/v) por 10 min, con porcentajes de germinación por arriba del 70% (Grigoriadou *et al.*, 2019). En ciertos casos como *Gundelia tournefortii* (Shatnawi *et al.*, 2022), *Teucrium capitatum* (Papafotiou y Martini, 2016) y en *Hedychium spicatum* (Giri y Tamta, 2012), bajos porcentajes de germinación (<40%) se han reportado, aumentando en algunos casos estos valores con la adición de ácido giberélico (GA₃), o con tratamientos de incubación en oscuridad y de escarificación. Al obtener un porcentaje similar durante la germinación de semillas (36%) de *T. lucida*, es posible que, con algún tratamiento con esta fitohormona o la incubación en oscuridad, este porcentaje hubiera sido más alto.

Las plántulas de *T. lucida* de 28 días después de la germinación, fueron utilizadas como fuente yemas axilares, las que fueron cultivadas en medio MS con ácido naftalenacético (ANA) y BA en diferentes concentraciones, determinando los medios óptimos para el cultivo de callos (0.5 mg/L ANA), de brotes (0.5 mg/L BA), así como para desarrollo de plántulas (0.05 mg/L BA). Aunque no se han reportado investigaciones para el cultivo *in vitro* de *T. lucida*, Zapata *et al.* (2022) en una revisión sobre cultivos *in vitro* de *Tagetes* spp describe que las especies de este género son de las menos exploradas (5%), en general, la callogénesis y la organogénesis se ha obtenido con la combinación a diferentes concentraciones de auxinas y citocininas como BA, KIN, ANA o 2,4-D.

Las especies mayormente estudiadas son *T. erecta* (Deka y Arjuna, 2014), *T. patula* y *T. minuta*, por su importancia industrial y ornamental, en la mayoría de los trabajos se emplean plántulas de tres semanas de edad obtenidas *in vitro* a partir de semillas (Vanegas-Espinoza *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2012; Majumder *et al.*, 2014). Para la callogénesis, se han utilizado diversos explantes como hoja, raíces, tallos y yemas apicales, como lo obtenido para *T. lucida* con una óptima formación de callo en segmentos de tallos con 0.5 mg/L de ANA, diferente a lo reportado para *T. erecta* que se indujo callo en hojas cultivadas en MS con 2, 4-D (2 mg/L) y BA (5 mg/L) (Nikam y Khan, 2014).

La organogénesis directa (brotación) se ha logrado sólo en *T. erecta*, *T. minuta* y *T. patula* (Majumder *et al.*, 2014; Nuoendagula *et al.*, 2017), empleando segmentos de hoja (Vanegas *et al.*, 2002), meristemos apicales, hipocótilos, segmentos tallo o segmentos nodales (Kumar *et al.*, 2007). Realizando una comparación con lo anterior, una óptima respuesta de organogénesis directa para la generación de brotes en segmentos de tallos con yemas de *T. lucida* se obtuvo en MS con 0.5 mg/L de BA. En *T. erecta*, fue necesario utilizar una mezcla de AIA y BA, así como con GA₃, con lo que se evitó la formación de callos (Misra y Datta, 2001). En otra investigación, la brotación óptima en *T. erecta*, se logró en altas concentraciones de BA 15 mg/L), en comparación con *T. patula*, para la cual, la concentración óptima es de 10 mg/L (Osman *et al.*, 2012); 0.5 mg/L fue la mejor concentración de BA para aumentar el número de brotes por explante y tener un tamaño de brote deseado (Turchetto *et al.*, 2007) lo que coincide con los resultados de la presente investigación.

El desarrollo de plántulas de *T. lucida* con el cultivo de brotes micropropagados se consiguió en MS con una concentración muy baja de BA, sin la necesidad de adición la auxina principal para el enraizado de brotes como el AIB. Estas plantas mostraron un óptimo crecimiento y desarrollo para la obtención de metabolitos secundarios.

Las suspensiones celulares de *T. lucida* mostraron un óptimo crecimiento en condiciones de luz, presentándose callos de color verde en MS con 0.05 mg/L de BA. Para *T. erecta* y *T. patula*, las mejores condiciones de crecimiento fueron oscuridad (Osman *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2012; Osman *et al.*, 2012).

8.2. DETERMINACIÓN DE CRECIMIENTO EN CULTIVOS *in vitro*

Con la determinación de los diversos parámetros de crecimiento, se observó el comportamiento de crecimiento de cada uno de los cultivos *in vitro*, que en todos los casos mostraron un crecimiento exponencial con un aumento alto en relación al inóculo utilizado al tiempo del inicio de cultivo. Con las cinéticas de crecimiento se determinó el inóculo inicial y los tiempos para la colecta de biomasa, con la que se obtuvieron los extractos. Así mismo, se establecieron los tiempos para realizar los subcultivo de cada sistema, que debe de realizarse previo la fase estacionaria.

8.3. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EN CULTIVOS *in vitro*

La producción de los compuestos volátiles está asociada a la inducción de diferenciación morfológica. La falta de diferenciación celular hace que la célula siga diferentes caminos metabólicos y que no existan sitios de almacenamiento de compuestos; en consecuencia, habrá una rápida metabolización de los monoterpenos u otros compuestos volátiles, debido a la toxicidad que presentan. En cultivos celulares de *Pelargonium fragans* se ha demostrado que toleran monoterpenos en el medio hasta una concentración de 0.1 g/L (Brown *et al.*, 1987). Con lo anterior se puede explicar el que en callos y suspensiones celulares de *T. lucida*, no se acumularon compuestos volátiles por lo que no pudieron ser detectados con el análisis CG-EM. De forma similar puede sugerirse lo obtenido en brotes y plántulas, que aunque se confirmó la presencia de

los principales volátiles de *T. lucida*, el número y contenido es muy bajo de acuerdo a lo reportado para el aceite esencial de plantas *in situ* de esta especie.

En los cultivos *in vitro* de *T. lucida* solamente en plántulas se obtuvo el mayor contenido con 12.2 mg Eq. L/g e.s. a los 7 días de cultivo y un máximo de 22.2 mg Eq. L/g e.s. a los 28 días del cultivo. En suspensiones celulares, callos y brotes, el mayor contenido fue de 3.3 mg Eq. L/g e.s. Los valores de plántulas fueron más altos que lo obtenido en hojas y tallos de plantas *in situ*. Lo anterior sugiere que como se ha reportado, la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios es afectada por el tipo de explante usado y por los reguladores utilizados en la preparación de los medios de cultivo y sus concentraciones específicas para la formación de callos, suspensiones celulares, brotes y/o plántulas (Passinho-Soares *et al.*, 2013), lo cual puede explicar en parte, las diferencias encontradas entre los sistemas de cultivos *in vitro*, con un bajo contenido de compuestos volátiles y, por tanto, bajos niveles de acumulación, condiciones que no permitieron la detección por el método de extracción realizado (de Alwis *et al.*, 2009).

El metil eugenol es el compuesto volátil de tipo fenilpropanoide, mayoritario del aceite esencial de *T. lucida* y se detectó en brotes y plántulas *in vitro*, pero además en plántulas *in vitro*, se determinó la presencia de cis- β -ocimeno y cis- β -farneseno. En suspensiones celulares y callos no se detectó ningún compuesto volátil.

8.4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE CULTIVOS *in vitro*

La relación del contenido tanto de terpenos totales como de los compuestos detectados por el análisis de CG-EM, con la actividad antifúngica, pudo solo observarse con los extractos de hoja y tallo, pero dependió de los estadios, mayormente de la etapa de floración y de senescencia, en los que el metil eugenol es el compuesto mayoritario. En estas etapas fenológicas se ha reportado la mayor acumulación de aceite esencial y de compuestos volátiles en plantas aromáticas. Los extractos de los cultivos *in vitro* no mostraron actividad antifúngica, debido a el nivel de diferenciación o al sistema de extracción utilizado.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Se establecieron los cultivos *in vitro* de *Tagetes lucida* por la siembra de semillas, logrando el desarrollo de plántulas, utilizadas como fuente de explantes para los estudios de obtención de los diferentes cultivos (suspensiones celulares, callos, brotes y plántulas).

Se seleccionaron los medios óptimos para la inducción de callos, multiplicación de brotes, regeneración y desarrollo de plántulas. La respuesta *in vitro* fue dependiente de la concentración de reguladores de crecimiento (BA y ANA).

Se determinaron los tiempos de cultivo óptimos con los valores máximos de cada uno de los parámetros medidos, como el peso fresco (g) para plántulas, brotes, callos y células en suspensión, el peso seco (g) para células en suspensión, el diámetro para callos, la longitud (cm) en plántulas y brotes, así como el número de éstos por explante.

Se realizó la determinación de terpenos totales, encontrando que existe un mayor contenido en plántulas *in vitro*, en comparación a lo obtenido en hojas y tallos de plantas recolectadas *in situ*. En los demás cultivos *in vitro*, se producen terpenos en un contenido más bajo, aunque la concentración es comparable a lo que en otras especies de plantas se acumulan.

Por CG-EM se identificó como mayoritario al metil eugenol tanto en los extractos de hoja y tallo de plantas *in situ*, así como en brotes y plántulas *in vitro*, no así en los cultivos indiferenciados (callos y suspensiones celulares).

No se observó actividad antifúngica en todos los cultivos *in vitro*, solamente en los extractos de hojas y tallos de plantas *in situ*, lo que se relacionó con el contenido de los compuestos volátiles de sus extractos.

10. LITERATURA GENERAL CITADA

- Achimón, F., Brito, V. D., Pizzolitto, R. P., Ramirez-Sanchez, A., Gómez, E. A., y Zygadlo, J. A. (2021).** Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. *Revista Argentina de Microbiologia*, 53(4), 292–303. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.001>
- Acosta de la Luz, L., Hechevarría Sosa, I., y Rodríguez Ferradá, C. (2010).** Estudios preliminares para el establecimiento del cultivo de *Tagetes lucida* Cav. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(1).
- Adorjan, B., y Buchbauer, G. (2010).** Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407–426. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.2024>
- Affonso, V. R., Bizzo, H. R., Lage, C. L. S. y Sato, A. (2009).** Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of in vitro plantlets of *Thymus vulgaris* L. *J. Agric & Food Chem*; 57(14):6392-6395.
- Ahuja, A., Bakshi, S. K., Sharma, S. K., Thappa, R. K., Agarwal, S. G., Kichlu, S. K., Paul, R. y Kaul, M. K. (2005).** Production of volatile terpenes by proliferating shoots and micropropagated plants of *Santolina chamaecyparissus* L. (cotton lavender). *Flav & Fragrance J*; 20(4): 403-406.
- Akula, R. y Ravishankar, G. A. (2011).** Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731. DOI: <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Amin, S., Kaloo, Z. A., Singh, S. y Altaf, T. (2013).** Micropropagation of medicinally important plant species of family *Asteraceae* – a review. *International Journal of Recent Scientific Research.*, 4(8), 1296-1303. URL: <http://www.recentscientific.com>
- Anguiano-Aguilar, R. 2021.** Micropropagación por organogénesis directa a partir de yemas apicales de *Ageratina jocotepecana* B.L. Turner. Tesis Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 46p.
- Aqeel, U., Aftab, T., Khan, M. M. A. y Naeem, M. (2023).** Regulation of essential oil in aromatic plants under changing environment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 32(100441), 1-13 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100441>
- Aquino, R., Cáceres, A., Morelli, S. y Rastrelli, L. (2002).** An extract of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 65(12):1773-1776.
- Arafa, A. M., Abdel-Ghani, A. E., El-Dahmy, S. I. y Abdelaziz, S. (2020).** Micropropagation, ,myristicin production enhancement, and comparative GC-MS analysis of the n-hexane extracts of different organs of *Daucus pumilus* (Gouan), family Apiaceae. *J Pharm Bioall Sci*;12:324-34.

- Arratia, J. y Aguirre, J. (2013).** Los factores de transcripción tipo Myb, una familia de reguladores de la diferenciación celular conservada en los organismos eucariontes. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), 98-108. ISSN 1405-888X.
- Ashaari, N. S., Mohamad, N. E., Afzinizam, A. H., Ab., Rahim M.-H., Lai, K. S. y Ong Abdullah, J. (2021).** Chemical composition of hexane-extracted *Plectranthus amboinicus* leaf essential oil: maximizing contents on harvested plant materials. *Appl. Sci.*, 11:10838.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. e Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem Toxicol*; 46, 446–475.
- Barajas-Pérez, J., Montes-Belmont, R., Castrejón-Ayala, F., Flores-Moctezuma, H. y Serrato-Cruz, M. A. (2011).** Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Rev Mex Micol*; 34: 85-91.
- Barton, K. E. (2007).** Early ontogenetic patterns in chemical defense in *Plantago* (Plantaginaceae): genetic variation and trade-offs. *American Journal of Botany*, 94(1), 56–66. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.94.1.56>
- Barton, K. E. y Koricheva, J. (2010).** The ontogeny of plant defense and herbivory: Characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist*, 175(4), 481–493. DOI: <https://doi.org/10.1086/650722>
- Beltrán-García, M. J., Ogura-Fujii, T. y Manzo-Sánchez, G. (2006).** Catalasas de Hongos Fitopatógenos: ¿Factores de Virulencia y Resistencia a los Fungicidas? *Revista Mexicana de Fitopatología* 24 (1) 50-58
- Bennett, R. N. y R. M. Wallsgrove. (1994).** Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127: 617-633.
- Bernáth, J. y Tétényi, P. (1979).** The effect of environmental factors on growth. Development and alkaloid production of poppy (*Papaver somniferum* L.). *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen: BPP*, 174(5–6), 468–478. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0015-3796\(17\)31342-2](https://doi.org/10.1016/s0015-3796(17)31342-2)
- Bicchi, C., Fresia, M., Rubiolo, P., Monti, D., Franz, C. y Goehler, I. (1997).** Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(1), 47–52. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1026\(199701\)12:1<47::aid-ffj610>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1026(199701)12:1<47::aid-ffj610>3.0.co;2-7)
- Binder, B. Y. K., Peebles, C. A. M., Shanks, J. V. y San, K.-Y. (2009).** The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology Progress*, 25(3), 861–865. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.97>
- Boaro, C. S. F., Vieira, M. A. R., Campos, F. G., Ferreira, G., De-la-Cruz-Chacón, I. y Marques, M. O. M. (2019).** Factors influencing the production and chemical composition

of essential oils in aromatic plants from Brazil. En *Essential Oil Research*, 1, 19–47. Springer International Publishing.

- Bremer, K., Jansen, R. K., Karis, P. O., Källersjö, M., Keeley, S. C., Kim, K.-J., Michaels, H. J., Palmer, J. D. y Wallace, R. S. (1992).** A review of the phylogeny and classification of the Asteraceae. *Nordic Journal of Botany*, 12(2), 141–148. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1992.tb01281.x>
- Brown, J. T. y Charlwood, B. V. (1986).** The accumulation of essential oils by tissue cultures of *Pelargonium fragrans* (Willd.). *FEBS Letters*, 204(1), 117–120. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81397-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81397-7)
- Camarena-Gutiérrez, G. (2009).** Señales en la interacción planta insecto. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 15(1), 81-85.
- Canter, P. H., Thomas, H. y Ernst, E. (2005).** Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends Biotech.* 23(4): 180-185.
- Capote, A., Pérez-Alonso, N., Pérez, A., Wilken, D., Gerth, A., Müller-Kuhrt, L. y Jiménez, O. (2009).** Efecto del cultivo in vitro en el perfil metabólico de *Psidium guajava* L. *Biotecnología vegetal*, 9(1).
- Carreón-Abud, Y., Torres-Martínez, R., Farfán-Soto, B., Hernández-García, A., Ríos-Chávez, P., Bello-González, M. Á. y Salgado-Garciglia, R. (2015).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases the content of volatile terpenes and plant performance in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(4), 273-279.
- Cassells, A. C., Walsh, C., Belin, M., Cambornac, M., Robin, J. R. y Lubrano, C. (1999).** Establishment of a plantation from micropropagated *Arnica chamissonis* a pharmaceutical substitute for the endangered *A. montana*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 56(2), 139–144. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1006224215503>
- Cázarez-Chávez D. (2017).** Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi). Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Céspedes, C. L., Ávila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J. C. y Salgado-Garciglia, R. (2006).** Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), 3521–3527. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf053071w>
- Chakraborty, A. y Chattopadhyay, S. (2008).** Stimulation of menthol production in *Mentha piperita* cell culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*; 44(6):518-524.

- Ciccio, J. F. (2004).** A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 52(4), 853–857.
- Costa, L. C. B., Pinto, J. E. B. P., Bertolucci, S. K. V., Costa, J. C. do B., Alves, P. B. y Niculau, E. dos S. (2015).** *In vitro* antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. *Ciencia Agronomica*, 46(2), 428–435. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150023>
- Da Silva, J., Silva, J., Nascimento, S., da Luz, S., Meireles, E., Alves, C., Ramos, A. y Maia, J. (2014).** Antifungal activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* infection in black pepper. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(11), 17926–17942. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules191117926>
- Deka, B. y Arjuna, A. (2014).** Effect of plant growth regulator on in vitro propagation of *Tagetes erecta*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(2), 319 - 332.
- Dee-Alwis, R., Fujita, K., Ashitani, T. y Kuroda, K. I. (2009).** Volatile and non-volatile monoterpenes produced by elicitor-stimulated *Cupressus lusitanica* cultured cells". *Journal of Plant Physiology*, 166(7), 720-728.
- Del Vitto, L. A. y Petenatti, E. M. (2009).** Asteráceas de importancia económica y ambiental: Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. *Multequina*, 18(2), 87-115.
- Dharmagadda, V. S., Naik, S. N., Mittal, P. K. y Vasudevan, P. (2005).** Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource technology*, 96(11), 1235-1240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.020>
- Díaz-Cedillo, F. y Serrato-Cruz, M. A. (2011).** Composición del aceite esencial de *Tagetes parryi* A. Gray. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 34: 145-148.
- Dyas, L., Threlfall, D. R. y Goad, L. J. (1994).** The sterol composition of five plant species grown as cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 35(3), 655–660. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)90581-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)90581-8)
- Elger, A., Lemoine, D. G., Fenner, M. y Hanley, M. E. (2009).** Plant ontogeny and chemical defence: older seedlings are better defended. *Oikos (Copenhagen, Denmark)*, 118(5), 767–773. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17206.x>
- Espinoza, P. E. V., Benítez-García, I., Peralta, A. L. L., Paredes-López, O. y Del Villar-Martínez, A. A. (2017).** Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Plant Biotechnology (Tokyo, Japan)*, 34(4), 187–192. DOI: <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.1120>

- Farha-Rehman, Khan, F. A., Anis, S. B. y Badruddin, S. M. A. (2010).** Plant defenses against insect herbivory. En *Integrated Management of Arthropod Pests and Insect Borne Diseases* (pp. 189–208). Springer Netherlands.
- Ferreira, J. F. S. (2007).** Nutrient deficiency in the production of artemisinin, dihydroartemisinic acid, and artemisinic acid in *Artemisia annua* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 1686–1694. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf063017v>
- Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. y Scheffer, J. J. C. (2008).** Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(4), 213–226. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>
- Fulgencio-Negrete R. (2013).** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (nurite, santa maría y toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 85 p.
- García-Rodríguez, Y.M., Bravo-Monzón, A., Martínez-Díaz, Y., Torres-Gurrola, G. y Espinosa-García, F. J. (2012).** Variación fitoquímica defensiva en ecosistemas terrestres, pp. 217-252. En: J. C. rojas y E. A. Malo (eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El colegio de la Frontera sur. México. 446 p
- García-Sánchez, F., López-Villafranco, M., Aguilar-Rodríguez, S. y Aguilar-Contreras, A. (2012).** Etnobotánica y morfo-anatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, Estado de México. *Botanical Sciences*, 90, 221-232. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.388>
- Gherairia, N., Boukerche, S., Mustapha, M. A. y Chefrour, A. (2022).** Effects of biotic and abiotic factors on the yield and chemical composition of essential oils from four thymus species wild-growing in northeastern Algeria. *Jordan journal of biological sciences*, 15(02), 173–181. DOI: <https://doi.org/10.54319/jjbs/150203>
- Giri, D. y Tamta S. (2012).** Effect of pre-sowing treatments on seed germination in *Hedychium spicatum*: An important vulnerable medicinal plant of Indian Himalayan region. *Scientific Research and Essays*, 7(19), 1835-1839. URL <http://www.academicjournals.org/SRE> DOI: 10.5897/SRE11.1349
- Gonzalves, S. y Romano, A. (2013)** In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites. *Biotechnol Advances*, 31:166–174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.006>
- Gounaris, Y. (2010)** Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. *Flavour Fragr. J.*, 25:367–386. DOI: <https://doi.org/10.1002/ffj.1996>
- Granados-Sánchez, D., Ruíz-Puga, P. y Barrera-Escorcia, H. (2008).** Ecología De La Herbivoría. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 14(1), 51-64.

- Grigoriadou, K., Krigas, N., Sarropoulou, V., Papanastasi, K., Tsoktouridis, G., y Maloupa, E. (2019).** In vitro propagation of medicinal and aromatic plants: The case of selected Greek species with conservation priority. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(6), 635-646. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10014-6>
- Grover, A., Yadav, J., Biswas, R., Pavan, C. S., Mishra, P., Bisaria, V. y Sundar, D. (2012).** Production of monoterpenoids and aroma compounds from cell suspension cultures of *Camellia sinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*; 108(2): 323-331.
- Guadarrama-Cruz, G., Alarcon-Aguilar, F. J., Lezama-Velasco, R., Vazquez-Palacios, G., y Bonilla-Jaime, H. (2008).** Antidepressant-like effects of *Tagetes lucida* Cav. in the forced swimming test. *Journal of Ethnopharmacology*, 120(2), 277–281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.013>
- Gutiérrez-Gaitén, Y., Scull-Lizama, R., García-Simón, G. y Montes-Álvarez, A. (2018).** Evaluación farmacognóstica, fitoquímica y biológica de un extracto hidroalcohólico de *Tagetes lucida* Cavanilles. *Rev Cub Plantas Med*; 23(2):1-7.
- Gutiérrez-Sánchez, A., Monribot-Villanueva, J. L., Cocotle-Ronzón, Y., Martínez-Cruz, N. S. y Guerrero-Analco, J. A. (2020).** Phenolic profile and antioxidant activity from wild and in vitro cultivated *Rhynchosystele rossii* (Orchidaceae). *Acta Bot Mex*; 127: e1665.
- Handa, S., Khanuja, S. P., Long, G. y Rakesh, D. D. (2008).** Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 260 p.
- Hanson, D. T. y Sharkey, T. D. (2001).** Effect of growth conditions on isoprene emission and other thermotolerance-enhancing compounds: Growth condition effects on thermotolerance-enhancing compounds. *Plant, Cell & Environment*, 24(9), 929–936. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00744.x>
- Harbage, J. F. (2001).** Micropropagation of *Echinacea angustifolia*, *E. pallida*, and *E. purpurea* from stem and seed explants. *HortScience: A Publication of the American Society for Horticultural Science*, 36(2), 360–364. DOI: <https://doi.org/10.21273/hortsci.36.2.360>
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Dermont, C., Joseph, H. y Bailleul, F. (2006).** The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from french overseas departments and review of previous works. *Chemistry & Biodiversity*, 3(10), 1116–1125. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbdv.200690113>
- Ibrahim, M. (2022).** Role of endogenous and exogenous hormones in bioactive compounds production in medicinal plants via in vitro culture technique. *Plant Hormones-Recent Advances, New Perspectives and Applications*.
- Isah, T. (2019).** Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>

- Jaafar, H. Z. E., Ibrahim, M. H. y Mohamad Fakri, N. F. (2012).** Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), malondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(6), 7305–7322. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules17067305>
- Jain, M., Banerji, R., Nigam, S., Scheffer, J. y Chaturvedi, H. (1991).** *in vitro* production of essential oil from proliferating shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica*, 57(02), 122–124. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2006-960046>
- Jakobsen, H. y Olsen, C. (1994).** Influence of climatic factors on emission of flower volatiles in situ. *Planta*, 192(3). DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00198572>
- Janas, K. M., Cvikrová, M., Palagiewicz, A., Szafranska, K. y Posmyk, M. M. (2002).** Constitutive elevated accumulation of phenylpropanoids in soybean roots at low temperature. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 163(2), 369–373. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(02\)00136-x](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(02)00136-x)
- Karamać, M., Kosińska, A. y Pegg, B. R. (2005).** Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish J Food & Nutri Sci*; 14(2), 165-170.
- Karjee, S., Namita, K. P. S. y Panwar, S. (2020).** Development of in-vitro protocol for direct regeneration from thalamus ex-plant of *Tagetes patula* L. var. Pusa Deep. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9 (4), 373-377.
- Kaur, R., Kashyap, A., Majeed, S., Chauhan, N. S. y Bhardwaj, S. B. (2010).** *In vitro* Propagation and Conservation of *Inula racemosa* Hook. F. an Endangered Medicinal Plant of Temperate Origin. Core.ac.uk. URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/188610041.pdf>
- Khare, S., Singh, N. B., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V., Bano, C., Yadav, R. K. y Amist, N. (2020).** Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal of Plant Biology*, 63(3), 203–216. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09245-7>
- Kovač, M., Piskernik, D. y Ravnikar, M. (2003).** Jasmonic acid-induced morphological changes are reflected in auxin metabolism of beans grown in vitro. *Biologia plantarum*, 46(2), 273–275. DOI: <https://doi.org/10.1023/b:biop.0000022264.47660.17>
- Kumar, A., Raghava, S. P., Singh, S. K., y Misra, R. L. (2007).** Factors affecting in vitro culture initiation and shoot multiplication in male sterile African marigold (*Tagetes erecta* L.) lines. *Indian Journal of Horticulture*, 64 (1), 67-72.
- Kupke, J., Schwierz, A. y Niefind, B. (2000)** Arznei- und gewürzpflanzen in osteuropa. anbau, verarbeitung und handel in 18 ausgewählten moeländern. *Materialien zur Marktberichterstattung ZMP Bonn*. 34:1–95

- Leng, T. C., Ping, N. S., Lim, B. P. y Keng, C. L. (2011).** Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. *J. Med. Plant Res.*, 5(3), 371-378. DOI: <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000434>
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E. y Gazim, Z. C. (2016).** Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 18(1), 191–200. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084x/15_037
- López-Cruz, J. (2017).** Análisis de la señalización medida por la pared celular y el estrés oxidativo en la interacción planta insecto Tesis Departamento de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Universidad de València.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. y Ontiveros, Y. (2004).** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(1), 39–45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>
- Majumder, J., Singh, K. P., Singh, S. K., Prasad, K. V. y Verma, M. (2014).** In vitro morphogenesis in marigold using shoot tip as explant. *Indian Journal of Horticulture*, 71(1), 82-86.
- Marchese, J. A., Rehder, V. L. G., Casiraghi, V., Tedesco, A. C. y Lira, R. (2002).** Flowering in plants of *Artemisia annua* L. standed to different conditions of photoperiod and temperature. *Acta Hort*, 569, 275-280.
- Marvier, M. A. (1996).** Parasitic plant-host interactions: Plant performance and indirect effects on parasite-feeding herbivores. *Ecology*, 77(5), 1398–1409. DOI: <https://doi.org/10.2307/2265537>
- Matos-Acurero, A. (2011).** Producción de aloína en callos y hojas de brotes de zábila (*Aloe vera* L.) regenerados in vitro. *Bioagro*, 23(2):79-86.
- Mendes, M. D., Figueiredo, A. C., Oliveira, M. M. y Trindade, H. (2013).** Essential oil production in shoot cultures versus field-grownplants of *Thymus caespititius*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 113:341–351.
- Miranda-Ham, M., Castro-Concha, L. A., Avilés-Berzunza, E. y GodoyHernández, G. (2006).** Plant regeneration from shoot apex-derived calluses of marigold (*Tagetes erecta* L.). *HortScience*, 41(6), 1518-1520.
- Miras-Moreno, B., Sabater-Jara, A. B., Pedreño, M. A. y Almagro, L. (2016).** Bioactivity of phytosterols and their production in plant in vitro cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7049–7058. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02345>

- Misra, P. y Datta, S. K. (2001).** Direct differentiation of shoots buds in leaf segments of white marigold (*Tagetes erecta* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 37, 366-470.
- Moghaddam, M. y Mehdizadeh, L. (2017).** Chapter 13 - chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. *Soft Chemistry and Food Fermentation*, 379–419. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4/00013-8>
- Molero-Paredes, T. y Viloria, M. (2020).** Características morfológicas y producción de aloína de plantas poliploides de *Aloe vera* (L.) Burm. F. (Asphodelaceae). *Bioagro-*, 33(1), 41–50. DOI: <https://doi.org/10.51372/bioagro331.5>
- Monterrosas-Brisson, N., Herrera-Ruiz, M., Jiménez-Ferrer, E., Bahena-Pérez, R., Avilés-Flores, M., Fuentes-Mata, M., Martínez-Dunker, I., y Gonzales-Cortazar, M. (2019)** Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2018.1553172
- Morariu, A. y Caulet, R. P. (2011).** *Morphine Content Variation In Papaver Somniferum L. During Phenological Development.* repository.uaiasi.ro. URL: <https://repository.uaiasi.ro/xmlui/handle/20.500.12811/3345>
- Mroginski, L., Sansberro, P., Flaschland, E., Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (2004).** Capítulo I. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. Biotecnología y mejoramiento vegetal II.* 2a ed. Argenbio. Consejo Argentino para la información y desarrollo de la Biotecnología. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina*, 17-25.
- Munshi, J. L., Baksha, R., Rahaman, M. Z., Huque, N. N., Zinat, E. A. y Momtaz, N. (2021).** In vitro plant regeneration from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 56(2), 69-74.
- Muñoz-Acevedo, A., Kouznetsov, V. V. y Stashenko, E. E. (2009).** Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 287-294.
- Muñoz-Acevedo, A., González, M. C., Rodríguez, J. D. y Moya, Y. S. D. (2019).** New chemovariety of *Lippia alba* from Colombia: Compositional analysis of the volatile secondary metabolites and some *in vitro* biological activities of the essential oil from plant leaves. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X1986290. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578x19862905>
- Muñoz-Concha, D., Vogel, H. y Razmili, I. (2004).** Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drimys spp.* (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Revista chilena de historia natural*, 77(1), 43-50.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*; 15(3):473-497.

- Murch, S. J., Peiris, S. E., Liu, C-Z y Saxena, P.K. (2004)** In vitro conservation and propagation of medicinal plants. *Biodivers* 5:19–24.
- Murthy, H.N., Lee, E-J y Paek, K-Y (2014).** Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 118:1–16 DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0467-7>
- Nezhadali, A., Nabavi, M., Rajabian, M., Akbarpour, M., Pourali, P. y Amini, F. (2014).** Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2), 87–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.05.001>
- Nieto-Trujillo, A., Cruz-Sosa, F., Luria-Pérez, R., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Román-Guerrero, A., Burrola-Aguilar, C., Zepeda-Gómez, C., y Estrada-Zúñiga, M. E. (2021).** *Arnica montana* cell culture establishment, and assessment of its cytotoxic, antibacterial, α -amylase inhibitor, and antioxidant in vitro bioactivities. *Plants*, 10(11), 2300. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10112300>
- Nikam, S. L. y Khan, S. J. (2014).** In-vitro callus induction in leaf explants of *Tagetes erecta* L. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5 (4), 648- 653.
- Nuoendagula, Narushima, M., Uesugi, M., Murai, Y., Katayama, Y., Iimura, Y. y Kajita, S. (2017).** In vitro regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of male-sterile marigold (*Tagetes erecta* L.). *Plant Biotechnology*, 34(2), 125-129
- Osman, H. A., Taha, H. S., Youssef, M. M., El Gindi, A. Y., Ameen, H. H. y Lashein, A. M. (2012).** Establishment of calli cultures from different explants of *Tagetes erecta* and *T. patula*. *Journal of applied sciences research*, 8, 2850-3854.
- Oxenham, S. K., Svoboda, K. P. y Walters, D. R. (2005).** Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Phytopathology* (1986), 153(3), 174–180. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00952.x>
- Papafotiou, M. y Kalantzis, A. (2009)** Seed germination and in vitro propagation of *Sideritis athoa*. *Acta Hort.*, 813:471–476 <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.813.62>
- Papafotiou, M. y Martini, A. N. (2016).** In vitro seed and clonal propagation of the mediterranean aromatic and medicinal plant *Teucrium capitatum*. *HortScience*, 51(4), 403-411. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.4.403>
- Papafotiou, M., Martini, A. N. y Vlachou, G. (2017)** In vitro propagation as a tool to enhance the use of native ornamentals in archaeological sites of Greece. *Acta Hort.*, 1155:301–308 DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.43>

- Park, C.-J., Kim, H.-S., Lee, D. W., Kim, J., y Choi, Y.-H. (2020).** Identification of antifungal constituents of essential oils extracted from *Boesenbergia pulcherrima* against *Fusarium wilt* (*Fusarium oxysporum*). *Applied Biological Chemistry*, 63(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00518-w>
- Passinho-Soares P., Meira P., David J., Mesquita P., Vale A., Rodrigues F. de M., Pereira P. de P., de Santana J, de Oliveira F., de Andrade J. y David J. (2013).** Volatile organic compounds obtained by *in vitro* callus cultivation of *Plectranthus ornatus* Codd. (Lamiaceae). *Molecules*; 18(9): 10320-10333.
- Pavón-Reyes L., Evangelista-Lozano S., Sepúlveda-Jiménez G., Ávila V.C. y Rodríguez-Monroy M. (2017).** Cell culture of *Bursera linanoe* in a stirred tank bioreactor for production of linalool and linalyl acetate. *Nat Product Communications*; Marzo 1.
- Perales Aguilar, L., Silos Espino, H., Lorenzo, L., Montero, V., Perales, C. y Flores Benítez, S. (2016).** Propagación in vitro de guayaba (*Psidium guajava* L.) a partir de segmentos nodales, *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 7(2) 375-386. ISSN 2007-0934. URL: <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas>.
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez E. (2011).** Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotec Veg*; 11(4): 195-211.
- Pérez-Gutiérrez RM, Hernández Luna He, Hernández Garrido S. (2006).** Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *Journal of the Chilean Chemical Society* 51: 883-886. DOI: <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072006000200010>
- Pérez-Ortega G, González-Trujano ME, Ángeles-López GE, Brindis F, Vibrans H, Reyes-Chilpa R. (2016).** *Tagetes lucida* Cav.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties. *Journal of Ethnopharmacology* 181: 221-228. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.01.040>
- Petrova, M., Zayova, E., Geneva, M., Dimitrova, L., Vitkova, A. y Stanilova, M. (2021).** Multiplication and Conservation of Threatened Medicinal Plant *Arnica montana* L. by in vitro Techniques. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 86(1), 57–65. URL: <https://hrcak.srce.hr/255028>
- Prins, C. L., Vieira, I. J. C. y Freitas, S. P. (2010).** Growth regulators and essential oil production. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 22(2), 91–102. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1677-04202010000200003>
- Raal, A., Kaur, H., Orav, A., Arak, E., Kailas, T. y Müürisepp, M. (2011).** Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 60(1), 55. DOI: <https://doi.org/10.3176/proc.2011.1.06>

- Rahman, M. M. y Bhadra, S. K. (2011).** *Development of protocol for in vitro culture and rapid propagation of Wedeliachinensis(Osbeek) Merr.* Academicjournals.org. URL: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/2C1A92922607>
- Rai, N., Kumari, S., Singh, S., Saha, P., Pandey, A. K. y Pandey-Rai, S. (2024).** Modulation of morpho-physiological attributes and in situ analysis of secondary metabolites using Raman spectroscopy in response to red and blue light exposure in *Artemisia annua*. *Environmental and Experimental Botany*, 217(105563), 105563. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105563>
- Rai, N., Kumari, S., Singh, S., Saha, P., Pandey, A. K. y Pandey-Rai, S. (2024).** Modulation of morpho-physiological attributes and in situ analysis of secondary metabolites using Raman spectroscopy in response to red and blue light exposure in *Artemisia annua*. *Environmental and Experimental Botany*, 217(105563), 105563. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105563>
- Ramawat, K.G. (2021).** An Introduction to the Process of Cell, Tissue, and Organ Differentiation, and Production of Secondary Metabolites. In: Ramawat, K.G., Ekiert, H.M., Goyal, S. (eds) *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-30185-9_35
- Rather, M. A., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Qayoom, M., Akbar, S., Masood, A., Rasool, R., Wani, S. H. y Qurishi, M. A. (2012).** Comparative GC–FID and GC–MS analysis of the mono and sesquiterpene secondary metabolites produced by the field grown and micropropagated plants of *Artemisia amygdalina* Decne. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(3), 885–890. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0886-6>
- Regalado, E. L., Fernández, M. D., Pino, J. A., Mendiola, J. y Echemendia, O. A. (2011).** Chemical composition and biological properties of the leaf essential oil of *Tagetes lucidacav.* From Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 23(5), 63–67. DOI: <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700485>
- Rejeb, I., Pastor, V. y Mauch-Mani, B. (2014).** Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: Molecular mechanisms. *Plants*, 3(4), 458–475. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Robin, A. H. K., Saha, G., Laila, R., Park, J.-I., Kim, H.-T. y Nou, I.-S. (2020).** Expression and role of biosynthetic, transporter, receptor, and responsive genes for auxin signaling during clubroot disease development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5554. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21155554>
- Rolnik, A. y Olas, B. (2021).** The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3009. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22063009>

- Romagnoli C, Bruni R, Andreotti E, Rai MK, Vicentini CB, Mares D. 2005.** Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* 225: 57-65. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0084-8>
- Rosales-Zamora A.C. 1995.** Estudio de la biología floral, modo de reproducción y viabilidad de seis poblaciones de pericón (*Tagetes lucida* Cav.) nativas de Guatemala. Tesis de Bióloga, Fac. de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Guatemala. 90 p.
- Rutiaga Q.J.G. (2001).** Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Buchverlag Gräffeling. München. p. 49.
- Rzedowski J. (2001).** Composite. In: Calderón de Rzedowski G, Rzedowski J. Flora Fanerogámica del Valle de México. Pátzcuaro: *Instituto de Ecología AC, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*, pp. 764-975. ISBN: 970-9000-17-9
- Saiman, M. Z., Mustafa, N. R., Pomahočová, B., Verberne, M., Verpoorte, R., Choi, Y. H. y Schulte, A. E. (2014).** Analysis of metabolites in the terpenoid pathway of *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(2), 225–239. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0435-2>
- Salehi B., Valussi M., Morais-Braga M., Carneiro J., Leal A., Coutinho H., Vitalini S., Kregiel D., Antolak H., Sharifi-Rad M., Silva N., Yousaf Z., Martorell M., Iriti M., Carradori S. y Sharifi-Rad J. (2018).** *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: chemical characterization and biological activity. *Molecules*; 23(11):2847.
- Sampaio, B. L., Edrada-Ebel, R. y Da Costa, F. B. (2016).** Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific Reports*, 6(1). DOI: <https://doi.org/10.1038/srep29265>
- Santacoloma-Varón, L. E. y Granados, J. E. (2010).** Evaluación del contenido de metabolitos secundarios en dos especies de plantas forrajeras encontradas en dos pisos térmicos de Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1(1), 29. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.890>
- Schippmann, U., Leaman, D., Cunningham, A.B. (2006).** Cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. In: Bogers RJ, Craker LE, Lange D (eds) *Medicinal and aromatic plants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, Wageningen UR Frontis Series no, p 17 URL: http://library.wur.nl/frontis/medicinal_aromatic_plants/05_schippmann.pdf.
- Sengar, R. S. y Sengar, K. (2014).** *Climate Change Effect on Crop Productivity*. CRC Press.
- Serrato-Cruz M.A. 2014.** El recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes spp.*) de México (diagnóstico). México: Universidad Autónoma Chapingo-SINAREFI-SNICS-SAGARPA. ISBN: 978-607-12-0373-1

- Serrato-Cruz, M. A, Díaz-Cedillo, F. y Barajas-Pérez, J. S. (2008).** Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. *Agrociencia*, 42: 277-285.
- Sharapin, N. (2000)** Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 1era. Edición. Colombia. 179-189, 198-204, 247 p.
- Sharifi-Rad J., Sureda A., Tenore G.C., Daglia M., Sharifi-Rad M., Valussi M., Tundis R., Sharifi-Rad M., Loizzo M.R., Ademiluyi A.O., Sharifi-Rad R., Ayatollahi S.A. e Iriti M. (2017).** Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*;22(1):70.
- Shatnawi, M., Majdalawi, M., Shahrour, W., R. Abu-Zahra, T., Al-Tawaha, A. R. (2022).** Germination and in vitro Propagation of *Gundelia tournefortii* an Important Medicinal Plant. *Ecological Engineering & Environmental Technology*, 23(1), 57-64. DOI: <https://doi.org/10.12912/27197050/143006>
- Sreelekshmi, R., Swapna, T. S. y Siril, E. A. (2023).** In vitro secondary metabolite production for sustainable utilization of endangered medicinal plants. En *Sustainable Development and Biodiversity* (pp. 451–471). Springer Nature Singapore.
- Torres-Martínez, R., Bello-González, M. Á., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., García-Hernández, A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M. M., Lara-Chávez, B. N. y Salgado-Garciglia, R. (2014).** Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq. *Rev. Mex. Ciencias Forest.*, 5(21):122-134.
- Torres-Martínez, R., Moreno-León, A., García-Rodríguez, Y. M., Hernández-Delgado, T., Delgado-Lamas, G. y Espinosa-García, F. J. (2022).** *Tagetes lucida* Cav. essential oil and the mixture of its main compounds are antibacterial and modulate antibiotic resistance in multi-resistant pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 75(2), 210–223. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.13721>
- Trejo-Tapia, G. y Rodríguez-Monroy, M. (2007).** La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669-674.
- Turchetto, A. C., Peters, J. A. y Braga, E. J. (2007).** Multiplication in vitro of plants of *Tagetes erecta* Linn. *Revista Científica Rural*, 12(1), 99-106.
- Tyub, S., Ahmad Dar, S., Maqbool Lone, I., Hussain Mir, A., y Kamili, A. N. (2021).** A robust in-vitro protocol for shoot multiplication of *Echinacea angustifolia*. *Current Plant Biology*, 28(100221), 100221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100221>
- Umpiérrez, M. L., Lagreca, M. E., Cabrera, R., Grille, G. y Rossini, C. (2012).** Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. *Phytochemistry*

Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, 11(4), 339–350. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9253-5>

- Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcés, M. y Escobar, R. (2008).** Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque (Valdivia)*, 29(1), 58–64. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-92002008000100007>
- Vanegas Espinoza, P. E., Cruz Hernández, A., Valverde, M. E. y Paredes López, O. (2002).** Plant regeneration via organogenesis in marigold. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 279- 283.
- Vargas-Rincón, C., Sánchez-León, G. y Jiménez-Morales, P. (2014).** La Producción de Metabolitos Secundarios en la Familia Brassicaceae. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 9(2), 282. DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.388>
- Verma, N. y Shukla, S. (2015).** Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Verpoorte, R., Contin, A. y Memelink, J. (2002).** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*, 1(1), 13–25. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1015871916833>
- Villa-Patricio, M. C. (2012).** Micropropagación de nurite [*Satureja macrostema* (Benth.) Briq.]. Tesis de Licenciatura, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 45 p.
- Villarreal, J. A. (2003).** Flora del bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 113. Tribu *Tageteae*. pp. 55-59.
- Villarreal-Quintanilla, J.A y Villaseñor, J. L. (2004).** Compositae, Tribu *Tageteae*. *Flora de Veracruz* 135: 1-67. ISBN: 970-709-066-9
- Villarreal-Quintanilla, J. A. (2003).** Compositae, Tribu *Tageteae*. *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes* 113: 47-73.
- Villarreal-Quintanilla, J. A., Villaseñor J. L. y Medina-Lemos, R. (2008).** Familia Compositae, Tribu *Tageteae*. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*, 62: 39-52. ISBN: 97-32-5084-4
- Villaseñor, J. L. (2016).** Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 559-902. DOI: [10.1016/j.rmb.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017).
- Villaseñor, J. L. (2018).** Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical sciences*, 96(2), 332–358. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1872>

- Villa-Silva, P. Y., Iliná, A., Ascacio-Valdes, J. A., Esparza-González, S. C., Cobos-Puc, L. E., Rodríguez-Herrera, R., & Silva-Belmares, S. Y. (2020).** Compuestos fenólicos de *Tagetes lucida* Cav. con efecto antibacteriano por daños a la membrana. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 19(6), 580-590. DOI: <https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.6.41>
- Vogel, H. y Berti, M. (2003).** Como producir plantas medicinales y aromáticas de calidad. *Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile.*
- Walters, D. (2011).** *Plant Defense: Warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants.* John Wiley & Sons.
- War, A. R., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ahmad, T., Nair, R. M. y Sharma, H. C. (2019).** Plant defense and insect adaptation with reference to secondary metabolites. En *Reference Series in Phytochemistry* (pp. 1–28). Springer International Publishing. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_60
- Wink, M. (1988).** Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 225–233. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00303957>
- Wink, M. (2015).** Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*. 2: 251-286.
- Xu, L.-W., Chen, J., Qi, H.-Y. y Shi, Y.-P. (2012).** Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese herbal medicines*, 4(2), 103–117. DOI: <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-6384.2012.02.004>.
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F. y Wang, Q. (2018).** Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4), 762. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Zapata, C., Serrato, M., Rodríguez, J. y Guerra, D. (2022).** *In vitro* morphogenesis in genus *Tagetes*: A review. *Horticultura Argentina*. 41 (104): 200-216. DOI: <http://id.caicyt.gov.ar/ark:/s18519342/82y7uuffa>
- Zarate-Escobedo, J., Castañeda-González, E. L., Cuevas-Sánchez, J. A., Carrillo-Fonseca, C. L., Ortiz-Torres, C., Ibarra-Estrada, E. y Serrato-Cruz, M. A. (2018).** Aceite esencial de algunas poblaciones de *Tagetes Lucida* Cav. de las regiones norte y sur del Estado de México. *Revista fitotecnia mexicana*, 41(2), 199–209. DOI: <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.199-209>
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M. y Franco, C. (2002).** Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 162(3), 459–468. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(01\)00586-6](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(01)00586-6)

- Zhu, W., Asghari, G. y Lockwood, G. B. (2000).** Factors affecting volatile terpene and non-terpene bio-transformation products in plant cell cultures. *Fitoterapia*; 71(5):501-506.
- Zitzelsberger, C. y Buchbauer, G. (2015).** Essential oils as “a cry for help”. A review. *Nat. Prod. Commun.*, 10(6). 1127–1138. DOI: <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000678>
- Zobayed, S. M. A., Afreen, F. y Kozai, T. (2005).** Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John’s wort. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(10–11), 977–984. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.07.013>