

Esquema 2. Identificación de antraquinonas presentes en el cultivo *in vitro* de raíces de plantas de *M. royoc* L. CCF. Cromatografía en placa fina; CCF-P. Cromatografía en placa fina preparativa; **Conc.**: Concentración por evaporación; **F**: filtrados producto del fraccionamiento con solventes orgánicos; **Fr**: fracciones recogidas después de la separación en columna de gel de sílice; **HPLC-DAD**: Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo; **Sep. Col.**: Separación por columna de gel de sílice; **Solv. Org.**: Solventes orgánicos; **RMN-H¹**: Resonancia Magnética Nuclear.

Tabla 2. Valores de factor de retención (Rf) y color de cada compuesto en la cromatografía en capa fina de los Filtrados de raíces *in vitro* de *M. royoc* L. Filtrados correspondientes a la solubilización con: metanol (F1), diclorometano (F2), hexano:cloroformo:metanol (9:9:1) (F3) y acetonitrilo:agua (1:2) (F4).

Rf	Filtrado 1	Filtrado 2	Filtrado 3	Filtrado 4	Color del compuesto
Rf ₁	0.12	0.12	0.12	-	naranja
Rf ₂	0.21	0.21	0.21	-	naranja
Rf ₃	0.24	0.24	0.24	-	incolore (visible al UV)
Rf ₄	0.26	0.27	0.27	-	naranja
Rf ₅	0.54	0.56	0.56	0.56	violeta
Rf ₆	0.74	-	-	-	amarillo
Rf ₇	0.95	0.97	0.97	0.97	rosa

Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodo (HPLC-DAD).

Los valores de tiempos de retención y los máximos de absorción (nm) de los patrones de antraquinonas obtenidos por HPLC-DAD se muestran en la tabla 3, estos son muy similares a los que se informan en la literatura para las antraquinonas (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Han *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2009).

Tabla 3. Tiempo de retención y máximos de absorción (nm) para los patrones de antraquinonas analizados por HPLC-DAD.

	Nombre del patrón	Tiempo de retención (min)	Máximos de absorción (nm)
A	Ac. antraflávic (2,6DHAQ)	13.263	216.7, 274.4, 300.5, 350.4
B	Alizarina (1,2DHAQ)	18.060	249.6, 431.8
C	Aloe-emodina	18.533	227.3, 256.7, 287.4, 428.1
D	Reina	19.460	230.8, 259.1, 430.6
E	Emodina	25.944	222.6, 288.6, 441.4
F	Dantrona (1,8DHAQ)	27.067	223.8, 254.4, 283.9, 428.1
G	Quinizarina (1,4DHAQ)	29.768	223.8, 250.8, 280.3, 327.8, 465.6
H	Antrarufina (1,5-DHAQ)	30.086	225.0, 253.2, 286.3, 422.1
I	Crisofanol	32.274	225.0, 257.9, 287.4, 429.4
J	Fisciona	37.586	223.8, 267.3, 287.4, 435.4

En la figura 14 aparecen los compuestos presentes en el Filtrado 1. Se observa la presencia de 13 compuestos principales según orden de elución, de ellos siete mayoritarios (3, 6, 9, 10, 11, 12, 13) y seis minoritarios (1, 2, 4, 5, 7 y 8). Los tiempos de retención y espectros UV visible de los 13 compuestos en el margen de 200-500 nm, se observa en la tabla 4. Los valores encontrados de absorción son característicos de derivados de antraquinonas (Wijnsma y Verpoorte, 1986, Deng *et al.*, 2009) excepto el compuesto 2 que no presenta absorción entre 300-450 nm.

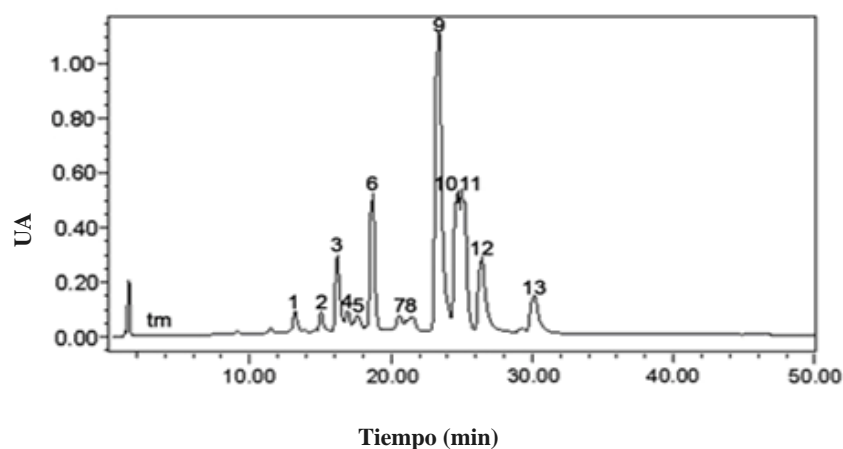


Figura 14. Cromatograma de HPLC-DAD del Filtrado 1 soluble en metanol y proveniente del extracto diclorometánico obtenido a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. Fase móvil con sistema de gradiente lineal de 0-40 min **A**: agua-ácido trifluoracético (0.1%) (v:v); **B**: acetonitrilo-ácido trifluoracético (0.1%) (v:v). UA: unidades de absorbancia, tm: tiempo muerto.

Se puede obtener información estructural sobre la posición de los grupos hidroxilos a partir de las bandas características de estos constituyentes. Las longitudes de ondas máximas entre 245 y 280 nm sugieren la presencia de la estructura de las antraquinonas (Thomson, 1971). La absorción en el espectro visible en 465 nm sugiere la presencia de una 1,4-dihidroxi-antraquinona, mientras que la longitud de onda máxima de 487 nm indicó la sustitución 1,4,5 trihidroxi antraquinona y a 430 nm las sustituciones 1,5 ó 1,8 dihidroxi-antraquinonas (Schripsema *et al.*, 1999). La literatura además informa desplazamientos hipsocrómicos de las bandas de absorción cerca de 440 nm cuando hay ausencia de sistemas 1,8-dihidroxi (Kitajima *et al.*, 1998), y bandas a 440 y 285 nm sugieren un sistema antrona (Suresh *et al.*, 2003).

Tabla 4. Tiempos de retención y máximos de absorción (nm) de los compuestos detectados por HPLC-DAD en el Filtrado 1, provenientes del extracto diclorometánico del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.

Orden de pico en elusión	Tiempos de retención (min)	Máximos de absorción (nm)
1	13.238	242.6, 278.0, 339.7
2	15.085	215.6, 259.1
3	16.219	246.1, 280.3, 410.1
4	16.995	241.4, 279.2, 363.5
5	17.701	249.6, 431.8
6	18.723	240.2, 279.2, 354.0
7	20.571	246.1, 278.0, 376.4
8	21.606	244.9, 281.5, 407.7
9	23.403	215.6, 253.2, 286.3, 388.4
10	24.582	219.1, 269.7, 412.5
11	25.243	244.9, 280.3, 408.9
12	26.444	230.8, 260.3, 300.5, 448.7
13	30.155	215.6, 259.1, 298.1, 424.5

De acuerdo con los resultados del espectro UV-Vis, los perfiles cromatográficos y la comparación con las antraquinonas patrones, sólo el compuesto 5 aislado a partir del cultivo de raíces de *M. royoc* L., se identificó como alizarina (**compuesto 1**, Figura 15). Esta antraquinona no está informada en las raíces de plantas en ambiente natural de esta planta, pero sí en otras especies de la misma familia como en raíces y suspensiones celulares de *R. tinctorum* (Orbán *et al.*, 2007; Orbán *et al.*, 2008) y en callos (Mishchenko *et al.*, 2007) y raíces de *R. cordifolia* L. (Kaur *et al.*, 2010).

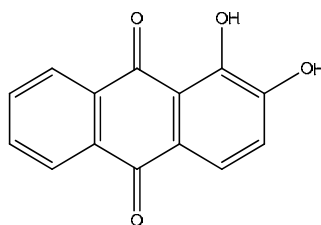


Figura 15. Estructura de la alizarina (compuesto 1). Antraquinona identificada por comparación con patrones mediante HPLC-DAD en el extracto diclorometánico de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*.

4.2.2 Purificación de las antraquinonas por cromatografía en columna de gel de sílice y cromatografía preparativa en capa fina (CCF preparativa).

El fraccionamiento de los extractos crudos, así como la caracterización de los mismos se basaron en el empleo de métodos de análisis como cromatografía en columna de gel de sílice y su combinación con cromatografía en capa fina preparativa y HPLC-DAD.

Cromatografía en columna de gel de sílice.

Al purificar el Filtrado 1 por columna de gel de sílice se obtuvieron 29 fracciones de 2 mL, las cuales se unieron en 8 grupos según su perfil en cromatografía en capa fina y análisis de HPLC-DAD: Fr 1.1 (fracción 1), Fr 1.2 (fracción 2), Fr 1.3 (fracción 3), Fr 1.4 (fracciones 4-5), Fr 1.6 (fracciones 6-12), Fr 1.13 (fracciones 13-23), Fr 1.24 (fracciones 24-27), Fr 1.28 (fracciones 28-29) (Tabla 5, Esquema 2). Se observaron sólo dos fracciones con un único compuesto (Fr 1.1 y Fr 1.3), las restantes fracciones presentaron de dos a cuatro compuestos.

Tabla 5. Valores de factor de retención (Rf) y color de cada compuesto en la cromatografía en capa fina de las fracciones eluidas por cromatografía de gel de sílice del Filtrado 1 a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*.

Rf	Fr 1.1	Fr 1.2	Fr 1.3	Fr 1.4	Fr 1.6	Fr 1.13	Fr 1.24	Fr 1.28	Color
Rf ₁								0.11	naranja
Rf ₂							0.20	0.20	naranja
Rf ₃				0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	incoloro
Rf ₄				0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	naranja
Rf ₅				0.53	0.53	0.53	0.53		violeta
Rf ₆		0.73	0.73	0.73					amarillo
Rf ₇	0.94	0.94							rosa

El chequeo por HPLC-DAD de las fracciones puras permitió observar el grado de pureza requerida para proceder a su caracterización estructural por RMN-H¹. Los tiempos de retención y los máximos de absorción del compuesto mayoritario en cada fracción se muestran en la tabla 6 y no coinciden con ninguno de los patrones analizados (Tabla 3).

Tabla 6. Tiempos de retención y máximos de absorción (nm) en fracciones puras obtenidas al procesar el Filtrado 1 provenientes de raíces de *M. royoc* L.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Máximos de absorción (nm)
Fr 1.1	30.153	215.6, 259.1, 298.1, 424.5
Fr 1.3	23.400	215.6, 253.2, 286.3, 388.4

Con el objetivo de obtener compuestos no identificados en las fracciones del Filtrado 1 se procesaron los Filtrados 2 y 3. Estos dos Filtrados se unieron y se procedió a la separación a través de cromatografía en columna de gel de sílice. Se obtuvieron 23 fracciones de 2 mL, las cuales se unieron en 4 grupos según su perfil en cromatografía en capa fina y análisis de HPLC-DAD: Fr 2.3.1 (fracción 1), Fr 2.3.8 (fracciones 2-15), Fr 2.3.19 (fracciones 16-21), Fr 2.3.23 (fracciones 22-23). Todas las fracciones tuvieron una pureza aceptable para el análisis estructural (Esquema 2). Los tiempos de retención y los máximos de absorción (HPLC-DAD) de los compuestos puros se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Tiempos de retención y máximos de absorción (nm) en fracciones puras obtenidas al procesar los Filtrados 2 y 3 provenientes de raíces de *M. royoc* L.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Máximos de absorción (nm)
Fr 2.3.1	30.154	215.6, 259.1, 298.1, 424.5
Fr 2.3.8	26.400	230.8, 260.3, 300.5, 448.7
Fr 2.3.19	25.241	244.9, 280.3, 408.9
Fr 2.3.23	24.579	219.1, 269.7, 412.5

Cromatografía preparativa en capa fina (CCF preparativa).

La fracción Fr 1.28 (obtenida a partir de la purificación por columna de gel de sílice del Filtrado 1, Esquema 1) se utilizó en el aislamiento de los productos por CCF preparativa por tener compuestos que no fueron separados mediante la cromatografía en columna. Se observó la presencia de tres bandas de color naranja y otra incolora pero medible en el UV a 254 nm. Las cuatro bandas (Fr 1.28.1, Fr 1.28.2, Fr 1.28.3 y Fr 1.28.4) se cortaron y los compuestos se extrajeron del gel de sílice. La tabla 8 muestra los tiempos de retención y los máximos de absorción de los compuestos puros obtenidos de cada una de las fracciones.

Tabla 8. Tiempos de retención y máximos de absorción (nm) de las bandas puras obtenidas al procesar por CCF preparativa la fracción Fr 1.28 proveniente de la purificación del Filtrado 1 por columna de gel de sílice.

Fracción	Tiempo de retención (min)	Máximos de absorción (nm)
Fr 1.28.1	16.267	246.1, 280.3, 410.1
Fr 1.28.3	18.669	240.2, 279.2, 354.0
Fr 1.28.2	24.584	219.1, 269.7, 412.5
Fr 1.28.4	25.246	244.9, 280.3, 408.9

El procedimiento de separación y purificación permitió obtener diez fracciones puras que contenían las antraquinonas mayoritarias presentes en el extracto crudo de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*. Se obtuvieron seis fracciones del Filtrado 1, inicialmente dos (Fr 1.1; Fr 1.3) y posteriormente cuatro (Fr 1.28.1; Fr 1.28.2; Fr 1.28.3; Fr 1.28.4). Las restantes cuatro fracciones (Fr 2.3.1; Fr 2.3.8; Fr 2.3.19; Fr 2.3.23) corresponden a la unión del Filtrado 2 y el Filtrado 3. Teniendo en cuenta los tiempos de retención y los máximos de absorción se pudo determinar que en las diez fracciones puras estaban presentes un total de siete posibles antraquinonas mayoritarias diferentes, pues las fracciones Fr 1.1 y Fr 2.3.1; Fr 2.3.23 y Fr 1.28.2; Fr 2.3.19 y Fr. 1.28.4 corresponden a iguales compuestos debido a que coinciden completamente en sus longitudes de onda de máxima absorbancia. Las diez fracciones se analizaron por RMN- H^1 .

Según los resultados que se muestran en la figura 15 aún quedan compuestos minoritarios que no se han aislado. Para determinar la estructura de los mismos se requiere continuar el análisis de las fracciones a partir de mayor masa de extracto crudo. Uno de estos compuestos minoritarios correspondió con la alizarina (compuesto 1), el cual se identificó por comparación de patrones pero no se pudo aislar del extracto crudo para ser analizado por RMN- H^1 .

4.2.3 Caracterización estructural de las antraquinonas por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- H^1).

El análisis por RMN- H^1 de los compuestos aislados de los Filtrados 1, 2 y 3 que se obtuvieron a partir de extractos diclorometánicos de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* permitió la identificación de las antraquinonas. Se identificaron un total de siete antraquinonas, de ellas la rubiadina es la primera vez que se informa en las raíces de *M. royoc* L.

Compuesto 2. Damnacantal.

El damnacantal se aisló a partir del Filtrado 1 (Fr 1.3) como compuesto de color amarillo. Los datos espectrales aparecen en la tabla 9 y la figura 16 muestra el correspondiente espectro de RMN- H^1 . Una señal a δ 4.08 (singulete 3H) es indicativo de la presencia de un grupo metoxi. Una señal aldehídica a δ 10.43 (doblete) y del grupo hidroxilo a δ 13.31 indica la presencia de estos sustituyentes en el anillo C de las antraquinonas. La ausencia de sustituyentes en el anillo A (bencénico) se soporta por las señales de los H en las posiciones 6 y 7 (δ 7.73; 7.78) y en las posiciones 5 y 8 (δ 8.21; 8.26).

La ausencia en el espectro de señales para los H1, H2 y H3 es indicativa de los sustituyentes en el anillo C. La presencia del grupo hidroxilo en el C3 se sustenta por las señales situadas para el H4 a δ 7.29 comparado con los desplazamientos para el H5 (δ 8.26) y el H8 (δ 8.31), debido al efecto de desplazamiento (apantallante) del grupo hidroxilo en posición *orto*.

El damnacantal se aisló por primera vez de las raíces del género *Damnacanthus* (Wijnsma y Verpoorte, 1986). También se aisló de raíces de campo de *M. royoc* L. (Park, 1977) y los datos espectrales (RMN- H^1) coinciden con los del compuesto aislado de las raíces *in vitro* de esta especie. Este compuesto se aisló de otras especies de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Rath *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2001): a partir de raíces de *M. elliptica* (Ali *et al.*, 2000, Alitheen *et al.*, 2010), en tallos de *Heterophyllaea pustulata* (Nuñez *et al.*, 2003; Nuñez *et al.*, 2005), en raíces y tallos de *P. fragrans* (Kanokmedhakul *et al.*, 2005) y en raíces de *M. citrifolia* L. (Kiathevest *et al.*, 2009; Kamiya *et al.*, 2010).

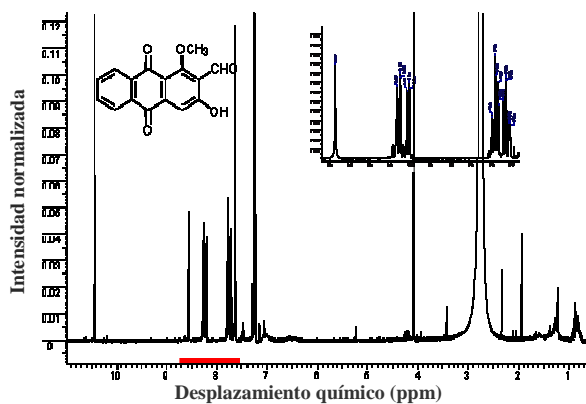
Compuesto 3. Nordamnacantal.

El nordamnacantal se aisló a partir del Filtrado 1 (Fr 1.1) y del Filtrado 2-3 (Fr 2.3.1) como compuesto de color naranja. Los datos espectrales aparecen en la tabla 9 y la figura 16 muestra el correspondiente espectro de RMN- H^1 . La presencia de un grupo α -hidroxilo adicional se soporta por la señal singulete a δ 14.06, señal ausente en el compuesto **2** (damnacantal). La diferencia de la señal del grupo aldehídico, que resultó un singulete (δ 10.42) pudiera deberse a una menor resolución en el espectro o a una falta real de acoplamiento con el H4.

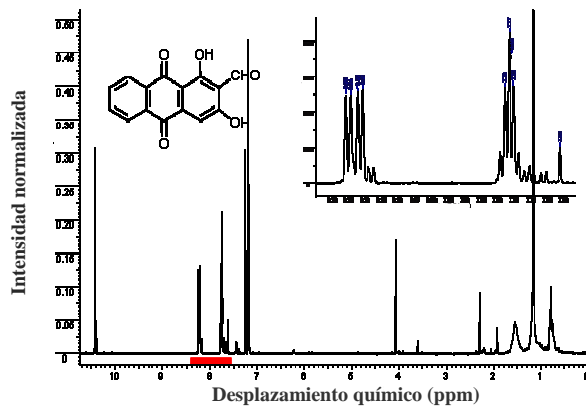
Tabla 9. Datos espectrales (RMN-H¹) de las antraquinonas aisladas a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* (2-8).

	Damnacantal*	Nordamnacantal**	Morindona*	Rubiadina**	Soranjidiol*	Lucidina*	Rubiadina 1-metiléter*
H1							
H2							
H3			7.24 d J= 7.7		7.42 d J= 7.7		
H4	7.65 d J=0.5	7.34s	7.52 d J= 7.7	7.29 s	7.645 d J= 7.7 se	7.31 s	7.57 s
H5	8.26 dd J= 7.8, 1.3	8.32 d J= 7.7		8.30 dd J= 7.0, 1.8	7.648 d J= 2.6 se	8.23 dd J= 7.3, 1.6	8.21 d J=7.6
H6	7.72 t*d J= 7.6, 1.3	7.85 t*d J=7.4		7.768 dd J= 7.0, 1.5		7.69 t*d J=7.3, 1.6	7.66 t* J=7.5
H7	7.78 t*d J= 7.5, 1.3	7.82 t* d J=7.5	6.99 d J= 8.3	7.795 t*d J= 7.4, 1.5	7.18 dd J= 8.6, 2.6	7.72 t*d J=7.5, 1.7	(7.60 t*) J=7.5 se
H8	8.21 dd J= 7.6, 1.3	8.29 d J= 7.4	7.61 d J= 8.3	8.26 dd J= 7.0, 1.7	8.16 d J= 8.6	8.15 dd J= 7.2, 1.7	8.09 d J=7.6
CH ₃			2.14 s	2.25 s	2.32 s		
CHO	10.43 d J=0.5	10.50 s					
OCH ₃	4.08 s						2.28 s
CH ₂ OH						5.08 s	3.86 s
OH	13.31 s	12.68 s	13.19 s	13.20 s	13.20 s		13.02 a
OH		14.06 s	12.95 a				

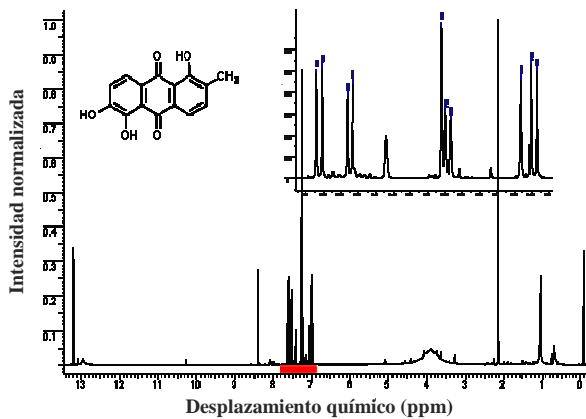
*registrados en mezcla de CDCl₃ (deuterocloroformo) y C₅D₅N (pentadeuteropiridina); **registrados en CDCl₃; **J**: constante de acoplamiento; **s**: singlete; **d**: doblete; **ddd**: doblete de doblete de doblete; **a**: señal ancha; **t*d**= triplete (aparente) de dobletes; el **t*** equivale a un doblete de dobletes (dd) con J prácticamente igual; **se**: señal enmascarada parcialmente en principio, entre los valores H5 y H8, así como entre H6 y H7, la asignación es indistinta (entre H3 y H4 se ha seguido como criterio dar la posición de valor superior a H4)



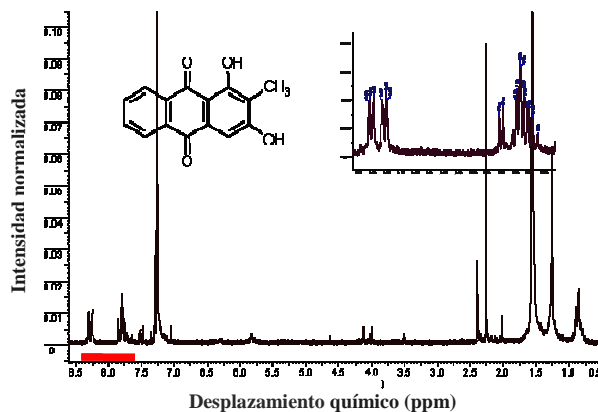
Compuesto 2. Damnacantal.



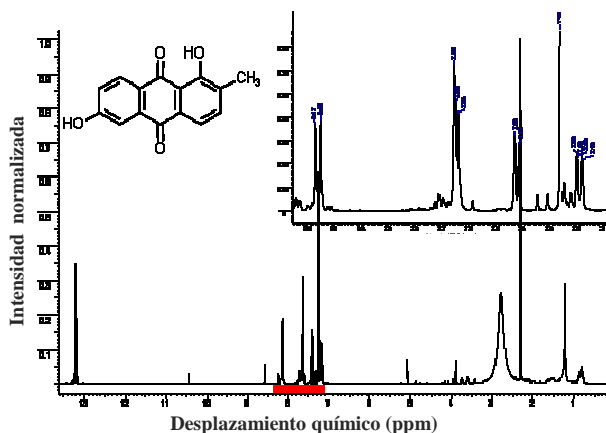
Compuesto 3. Nordamnacantal.



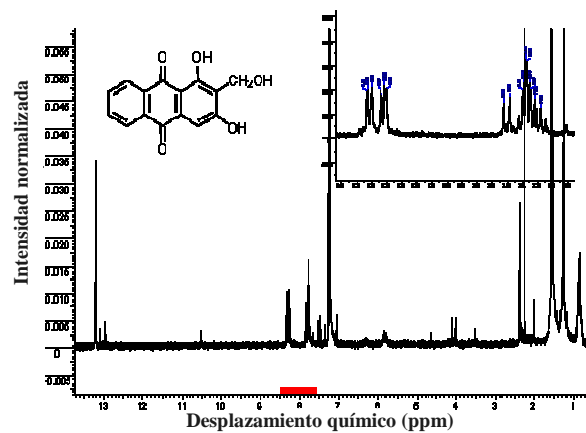
Compuesto 4. Morindona.



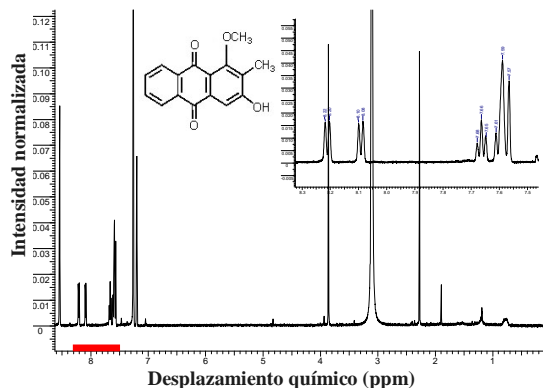
Compuesto 5. Rubiadina.



Compuesto 6. Soranjidiol.



Compuesto 7. Lucidina.



Compuesto 8. Rubiadina-1-metiléter.

Figura 16. Espectro de RMN- H^1 de las antraquinonas aisladas a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*.

Este compuesto se aisló a partir de diferentes especies de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Han *et al.*, 2001) a partir de raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. (Park, 1977), en raíces y suspensiones celulares de *M. elliptica* (Ali *et al.*, 2000; Chong *et al.*, 2005b), en raíces y tallos de *P. fragrans* (Kanokmedhakul *et al.*, 2005), en raíces y suspensiones celulares de *R. tinctorum* (Boldizár *et al.*, 2006; Orbán *et al.*, 2008) y en raíces de *M. citrifolia* L. (Kamiya *et al.*, 2010).

Compuesto 4. Morindona.

La morindona se aisló a partir de la fracción Fr 2.3.8 como un compuesto de color violeta. Los datos espectrales aparecen en la tabla 9 y la figura 16 muestra el correspondiente espectro de RMN- H^1 . La ausencia de señales para los hidrógenos H1, H2, H5 y H6 confirma la presencia de sustituyentes en estas posiciones. Una señal a δ 2.14 (singulete), correspondiente a un grupo metilo, indica su presencia en el C2. Los protones de los carbonos C3, C4, C7 y C8 se presentaron como dos pares de dobletes (d) con constantes de acoplamiento de J 7.7 (H3, H4) y J 8.3 (H7, H8). La presencia de grupos hidroxilos se demostró por las señales a δ 13.19 y 12.95 (Tabla 9).

La presencia de este compuesto se informó en otras especies de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Han *et al.*, 2001): a partir de raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. (Park, 1977), en raíces de *M. elliptica* (Ali *et al.*, 2000), en raíces de *M. angustifolia* (Aobchey *et al.*, 2002) y *M. citrifolia* L. (Kamiya *et al.*, 2010).

Compuesto 5. Rubiadina.

La rubiadina se aisló de las fracciones Fr 2.3.19 y Fr 1.28.4 como compuesto de color amarillo. Los datos espectrales aparecen en la tabla 9 y la figura 16 muestra el correspondiente espectro de RMN- H^1 . El espectro de RMN- H^1 provee evidencia de la presencia de grupos hidroxilos y metilo en el anillo C y la ausencia de señales para los protones H1, H2, H3 confirman la sustitución en el mismo. La señal δ 2.25 indica la presencia de un grupo metilo en el C2.

Este compuesto se informó en diferentes especies de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Likhitwitayawuid *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001). Se obtuvo a partir de raíces de *M. elliptica* (Ali *et al.*, 2000), en tallos de *H. pustulata* (Nuñez *et al.*, 2003; Nuñez *et al.*, 2005), en raíces y tallos de *P. fragrans* (Kanokmedhakul *et al.*, 2005), en las raíces de *M. citrifolia* L. (Kamiya *et al.*, 2010), pero no en los frutos y hojas de esta planta (Deng *et al.*, 2009). Los resultados de la presente investigación son los primeros sobre la presencia de este metabolito en las raíces de *M. royoc* L.

Compuesto 6. Soranjidiol.

El soranjidiol se aisló de las fracciones Fr 2.3.23 y Fr 1.28.2 como compuesto de color naranja. Los datos espectrales aparecen en la tabla 9 y la figura 16 muestra el correspondiente espectro de RMN-H¹. La presencia de cinco protones aromáticos sugiere que hay tres sustituciones en el compuesto y los acoplamiento sugieren que se trata de dos sistemas de dos y tres espines respectivamente. El anillo C presenta en C2 el grupo metilo (δ 2.32) y el grupo hidroxilo en 1 (δ 13.20). El anillo A debe tener un sólo grupo hidroxilo, con dos protones contiguos y uno separado. Estas características confirman la presencia de este compuesto en las raíces *in vitro* de la *M. royoc* L.

El soranjidiol se informó en otras plantas de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Han *et al.*, 2001): a partir de raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. (Park, 1977), en raíces de *M. elliptica* (Ali *et al.*, 2000), en tallos de *H. pustulata* (Nuñez *et al.*, 2003; Nuñez *et al.*, 2005) y en raíces de *M. citrifolia* L. (Kamiya *et al.*, 2010).

Compuesto 7. Lucidina.

La lucidina se aisló de la fracción Fr 1.28.1 como compuesto de color naranja. Los datos espectrales aparecen en la tabla 9 y la figura 16 muestra el correspondiente espectro de RMN-H¹. El espectro UV y el RMN-H¹ proveen evidencia de la presencia de grupos hidroxilos e hidroximetilo en el anillo C y la ausencia de señales para los protones H1, H2, H3 confirman la sustitución en el mismo. La señal δ 5.08 indica la presencia de un grupo hidroximetilo en el C2.

La presencia de lucidina se informó en diferentes especies de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Han *et al.*, 2001). Se identificó en raíces raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. (Park, 1977), en callos de *R. tinctorum*, en raíces y suspensiones celulares de *R.*

tinctorum (Nakanishi *et al.*, 2005; Boldizár *et al.*, 2006; Orbán *et al.*, 2007; Orbán *et al.*, 2008) y en raíces de *M. citrifolia* L. (Kamiya *et al.*, 2010). La lucidina no estuvo presente en extractos de frutos y hojas de *M. citrifolia* L. (Deng *et al.*, 2009).

Compuesto 8. Rubiadina-1-metiléter.

La rubiadina-1-metiléter se aisló de la fracción Fr 1.28.3 como un compuesto de color amarillo. Los datos espectrales aparecen en la tabla 9 y la figura 16 muestra el correspondiente espectro de RMN- H^1 . La ausencia de señales para los protones H1, H2, H3 confirma la sustitución en el anillo C y la presencia del grupo metilo se puso de manifiesto con la señal a δ 2.28. Una señal en δ 3.86 indicó la presencia de un grupo metoxilo. La presencia del grupo metoxilo en la posición 1 parece más probable que en 3, al comparar la separación de las señales del anillo A con dicha sustitución (compuesto 2 y 3).

Rubiadina-1-metiléter se aisló de diferentes miembros de la familia *Rubiaceae* (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Rath *et al.*, 1995; Likhitwitayawuid *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001). Se observó en raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. (Park, 1977), raíces de *M. elliptica* (Ali *et al.*, 2000), en los tallos de *H. pustulata* (Nuñez *et al.*, 2003; Nuñez *et al.*, 2005), en las raíces y los tallos de *P. fragrans* (Kanokmedhakul *et al.*, 2005) y en las raíces de *M. citrifolia* L. (Kamiya *et al.*, 2010).

En este estudio se identificaron por primera vez ocho antraquinonas a partir de raíces de *M. royoc*. L. cultivadas *in vitro*, seis de ellas informadas por Park (1977) para raíces de plantas en ambiente natural. El damnacantal, nordamnacantal, morindona, rubiadina, soranjidiol, lucidina y rubiadina-1-metiléter se lograron obtener a partir de la extracción con diferentes solventes orgánicos, cromatografía en gel de sílice y CCF preparativa y su identificación se realizó por resonancia magnética nuclear (RMN- H^1). La rubiadina no se ha informado para las raíces de esta planta. La alizarina, antraquinona identificada por primera vez en este cultivo, se obtuvo de las raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* por coincidencia con el patrón correspondiente mediante HPLC-DAD analítica. En la investigación se logró identificar las antraquinonas de los picos mayoritarios las cuales son las que pueden tener una mayor repercusión en las propiedades de actividad biológica de estos extractos.

4.3 Actividad antimicrobiana de extractos antraquinónicos de raíces de *M. royoc* L.

4.3.1 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan al hombre.

La **actividad antifúngica** de los extractos antraquinónicos de raíces de *M. royoc* L. y las antraquinonas puras aisladas a partir de raíces cultivadas *in vitro* se muestra en las tablas 10 y 11 respectivamente. Los extractos crudos obtenidos a partir de raíces *in vitro* mostraron actividad a bajas concentraciones ($1.95\text{-}15.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre las levaduras que se utilizaron; igual comportamiento se observó para los extractos obtenidos a partir de raíces de plantas en ambiente natural. Al comparar la actividad antifúngica de ambos extractos con la del Fluconazol (control positivo de inhibición del crecimiento para levaduras) fueron más efectivos que dicho producto frente a *C. glabrata* (HU84) con CMI de $1.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabla 10). Para el resto de los patógenos la actividad de los extractos crudos fue similar o ligeramente superior a la que se logró con el Fluconazol.

Tabla 10. Actividad antifúngica (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de los extractos antraquinónicos de raíces cultivadas *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L.

Patógenos	Actividad antifúngica (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)*		
	Extracto de raíces <i>in vitro</i>	Extracto de raíces de plantas en ambiente natural	Fluconazol**
<i>Candida albicans</i> 501	15.63	15.63	0.488
<i>Candida albicans</i> 53	15.63	15.63	15.63
<i>Candida albicans</i> 498	15.63	15.63	1.95
<i>Candida tropicales</i> 166	15.63	15.63	1.95
<i>Candida glabrata</i> 84	1.95	1.953	31.25
<i>Candida krusei</i> 168	15.63	15.63	3.9
<i>Candida parasilopsis</i> 96	15.63	15.63	0.975

CMI: Concentración mínima inhibitoria,

*No se realizó análisis estadístico porque no hubo variabilidad entre las observaciones de las tres réplicas;

** Control positivo.

De las antraquinonas que se evaluaron sólo la morindona mostró actividad antifúngica sobre todas las levaduras ensayadas con valores de CMI de $1.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabla 11). De forma interesante, la

morindona fue más efectiva frente a *C. glabrata* (HU84), *C. albicans* (HU53) y *C. krusei* (HU168) que el Fluconazol; mientras ambos compuestos tuvieron similar potencial sobre *C. albicans* (HU498) y *C. tropicalis* (HU166). En el ensayo de actividad antimicrobiana el control del solvente (DMSO) no afectó el crecimiento de las cepas.

Tabla 11. Actividad antifúngica (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de las antraquinonas purificadas a partir de las raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*.

Patógenos	Actividad antifúngica (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)*								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Fluconazol**
<i>Candida albicans</i> 501	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	0.488
<i>Candida albicans</i> 53	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	15.63
<i>Candida albicans</i> 498	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	1.95
<i>Candida tropicales</i> 166	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	1.95
<i>Candida glabrata</i> 84	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	31.25
<i>Candida krusei</i> 168	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	3.9
<i>Candida parasilopsis</i> 96	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	0.975

CMI: Concentración mínima inhibitoria,

*No se realizó análisis estadístico porque no hubo variabilidad entre las observaciones de las tres réplicas,

** Control positivo,

1: Alizarina, 2: Damnacantal, 3: Nordamnacantal, 4: Morindona, 5: Rubiadina, 6: Soranjidiol, 7: Lucidina, 8: Rubiadina-1-metiléter, **N.D:** No detectada en las concentraciones evaluadas.

Otros investigadores informan sobre la actividad antimicrobiana de antraquinonas obtenidas de otras especies de plantas. Por ejemplo, Agarwal *et al.* (2000) publicaron valores mayores de CMI ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para un extracto metanólico a partir de raíces de *Rheum emodi* frente a *C. albicans*, comparados a los que se obtuvieron por las antraquinonas puras presentes en el extracto ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). De igual forma, Kuete *et al.* (2007) informaron la actividad antimicrobiana de extractos crudos y antraquinonas aisladas de *V. laurentii*. La CMI que obtuvieron mediante el ensayo de microdilución para los extractos crudos fue de 78.12 y $312.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra las cepas de *C. glabrata* y *C. albicans*, respectivamente. En el caso de las antraquinonas los valores fueron de 1.22 y $2.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ contra las mismas cepas. Estos resultados concuerdan con los que se obtuvieron en la presente investigación, donde los extractos crudos de raíces *in vitro* y raíces de plantas en

ambiente natural mostraron valores de CMI mayores que la morindona (Tablas 10 y 11), excepto para la cepa *C. glabrata* que fue la más susceptible (CMI de $1.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a los extractos crudos que se evaluaron.

El extracto antraquinónico del tallo de *H. pustulata* mostró actividad antifúngica frente a *C. albicans*, *C. tropicales*, *C. krusei* y *C. parasilopsis* mediante el método de difusión en agar (Nuñez *et al.*, 2003). Sin embargo, a diferencia de los extractos de *M. royoc* L., el extracto de *H. pustulata* no fue activo sobre *C. glabrata*. Alanís *et al.* (2007) evaluaron diferentes extractos de plantas sobre las cepas *C. albicans* 501 y *C. albicans* 498 e informaron valores de CMI entre $31\text{-}500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. El extracto con menor CMI fue el butanólico, obtenido a partir de *Euphorbia prostrata*. En todos los casos los extractos crudos que se obtuvieron de raíces *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. y la morindona aislada de raíces *in vitro* mostraron mayor actividad frente a ambas cepas de levaduras (Tablas 10 y 11).

Mishra *et al.* (2010) informaron la presencia de una nueva antraquinona (1-metil-2-(3'-metil-but-2'-eniloxi antraquinona) aislada de semillas de *A. marmelos* Correa, que tuvo fuerte actividad antifúngica sobre *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *C. albicans*. La antraquinona tuvo valores de CMI sobre *C. albicans* de $31.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$ mediante los métodos de microdilución y difusión en agar, respectivamente. Como se puede observar, ambos valores son más altos que los obtenidos para los extractos crudos de raíces *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. y la morindona aislada de estas raíces.

Marzouk *et al.* (2009) evaluaron el extracto acuoso y acetónico de varios órganos de *Citrullus colocynthis* frente a diferentes cepas de *Candida*. Los extractos presentaron alto contenido de alcaloides y flavonoides. Las cepas más susceptibles fueron *C. albicans* y *C. glabrata* con valores de CMI entre $0.10\text{-}6.50 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas concentraciones son superiores a las que se encontraron para los extractos crudos y la morindona extraída a partir de raíces *in vitro* de *M. royoc* L. frente a estas mismas cepas, lo que demuestra las aplicaciones potenciales que pudieran tener estos extractos frente a estos patógenos. Debido a la fuerte actividad (CMI de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de los extractos de *C. colocynthis* sobre *C. glabrata* estos autores sugirieron la posibilidad del uso de los mismos solos o combinados con Anfotericina B.

Aunque en el presente estudio el nordamnacantal y el damnacantal no mostraron actividad antifúngica a concentraciones inferiores $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabla 11), se informó que estos compuestos son activos sobre *C. albicans* a concentraciones de 6 y $22.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente (Kanokmedhakul *et al.*, 2005). Singh *et al.* (2006) informaron CMI de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el damnacantal aislado a partir de *Saprosma fragrans*. La actividad antifúngica de las antraquinonas nordamnacantal, damnacantal y morindona aisladas a partir de la planta *M. elliptica* puede ser debido a la presencia de un grupo formil en el carbono C2 y un hidroxilo en el damnacantal y el nordamnacantal y a los grupos hidroxilos en la morindona (Ali *et al.*, 2000).

Xiang *et al.* (2008) evaluaron la actividad antimicrobiana de seis antraquinonas aisladas a partir de las raíces de *M. angustifolia*: 1,8-dihidroxi-2-metil-3,7-dimetoxiantraquinona, damnacantal-3-O- β -primeveroside, 1,3-dihidroxi-2-metil-antraquinona, lucidita- ω -etiléter, damnacantal- ω -butiléter y el damnacantal. El compuesto 1,8-dihidroxi-2-metil-3,7-dimetoxiantraquinona mostró mayor actividad antifúngica sobre *C. albicans* y *S. sake*. El resto de las antraquinonas mostraron débil o ninguna actividad a la concentración de $13.3 \mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$.

Según Nuñez *et al.* (2003), *Candida* es el cuarto germen aislado a partir de los hemocultivos asociados con el 38% de mortalidad. Clínicamente se desea tener un medicamento (extracto o compuesto) con potencial para inhibir el crecimiento de varias cepas de *Candida*, debido a que cualquiera de las cepas puede provocar candidiasis, la cuarta de las infecciones sistémicas más comunes y en la mayoría de los casos es causada por *C. albicans* (50-60%), *C. glabrata* (15-20%), *C. parasilopsis* (10-20%), *C. tropicalis* (6-12%) y *C. krusei* (1-3%) (Hidalgo y Vázquez, 2008).

Se plantea que extractos con valores de CMI por debajo de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se consideran extractos con fuerte potencial antifúngico (Carmeli *et al.*, 1999). Los autores informaron CMI de $800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Epilobium angustifolium* sobre *C. albicans* ATCC 90028. En este contexto, es muy interesante el hecho que el extracto crudo de raíces *in vitro*, raíces de plantas en ambiente natural y la morindona extraída de raíces *in vitro* de *M. royoc* L. mostraron buena actividad antifúngica sobre siete aislados clínicos de especies de *Candida* pues sólo pocos agentes antifúngicos son efectivos contra la candidiasis causada por *C. albicans*. Tres de estos agentes son la Anfotericina B, el Fluconazol y el Itraconazol (Tamokou *et al.*, 2008). El tratamiento de candidiasis a menudo requiere

la combinación de estos agentes, sin embargo se ha observado resistencia y efectos adversos en el tratamiento con estos antifúngicos (Rahalison *et al.*, 1991; Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006).

Aunque se informa que las antraquinonas pueden inhibir el crecimiento de los patógenos fúngicos que se estudiaron en esta investigación, no se encontraron referencias sobre la actividad antimicrobiana de estos compuestos extraídos de raíces de *M. royoc* L.

La **actividad antibacteriana** de los extractos antraquinónicos de raíces de *M. royoc* L. y las antraquinonas puras aisladas de raíces cultivadas *in vitro* se muestra en las tablas 12 y 13, respectivamente. De los resultados que se obtuvieron se puede notar que las bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *E. faecales*) fueron las más sensibles a los dos extractos probados, ya que presentaron CMI entre 31.25 y 62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabla 12).

Tabla 12. Actividad antibacteriana (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de los extractos antraquinónicos de raíces cultivadas *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L.

Patógenos	Actividad antibacteriana (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)*		
	Extracto de raíces <i>in vitro</i>	Extracto de raíces de plantas en ambiente natural	Cefalotina**
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Oxac.	31.25	31.25	62.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	62.50	62.50	0.488
<i>Enterococcus faecales</i>	62.50	31.25	31.25
<i>Escherichia coli</i>	250.00	250.00	0.975
<i>Acinetobacter baumannii</i>	N.D	N.D	62.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N.D	N.D	N.D
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N.D	N.D	62.5

CMI: Concentración mínima inhibitoria,

*No se realizó análisis estadístico porque no hubo variabilidad entre las observaciones de las tres réplicas;

**Control positivo.

N.D: No detectada en las concentraciones evaluadas.

Los extractos crudos no fueron activos contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (bacterias Gram-negativas) incluso a la concentración más alta de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sólo fueron activos frente a *E. coli* con valores de CMI de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Al comparar la actividad antibacteriana mostrada por de los extractos crudos con el antibiótico utilizado como control, se observó que

fueron más activos que la Cefalotina frente a la cepa *S. aureus* resistente a Oxacilina evaluada. En el ensayo de actividad antibacteriana el control del solvente (DMSO) no afectó el crecimiento de las cepas.

De los compuestos puros sólo la morindona mostró actividad antibacteriana contra *S. aureus* resistente a Oxacilina (CMI $15.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Tabla 13). Interesantemente, la única diferencia entre la morindona y el soranjidiol es la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 5 de la morindona, por lo que se infiere que este grupo puede tener un efecto en la actividad encontrada.

Tabla 13. Actividad antibacteriana (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de las antraquinonas purificadas a partir de las raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*.

Patógenos	Actividad antibacteriana (CMI $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)*								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Cefalotina**
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Oxa.	N.D	N.D	N.D	1.95	N.D	N.D	N.D	N.D	62.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12598	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.488
<i>Enterococcus faecales</i>	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	31.25
<i>Escherichia coli</i>	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	0.975
<i>Acinetobacter baumannii</i>	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	62.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	62.5

CMI: Concentración mínima inhibitoria,

* No se realizó análisis estadístico porque no hubo variabilidad entre las observaciones de las tres réplicas;

** Control positivo,

1: Alizarina, 2: Damnacantal, 3: Nordamnacantal, 4: Morindona, 5: Rubiadina, 6: Soranjidiol, 7: Lucidina, 8: Rubiadina-1-metiléter, **N.D:** No detectada en las concentraciones evaluadas.

En este estudio se demostró un amplio efecto de la morindona contra siete cepas de levaduras (Tabla 11) y una promisorio actividad sobre *S. aureus* resistente a Oxacilina (Tabla 13). Esta actividad parece estar relacionada con la estructura de la morindona (grupos hidroxilos en la posición 5 y 6), aunque el mecanismo de acción en raíces *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. no se conoce. En el resto de las antraquinonas los grupos hidroxilos pueden interactuar con los grupos metilo, metoxi y aldehído mediante la formación de puentes de hidrógeno e interferir en la posible actividad que pudieran provocar esos grupos. Los grupos funcionales hidroxilo,

hidroximetilos y carboxilos presentes en las antraquinonas mejoran la actividad antimicrobiana (Yanwen *et al.*, 2005).

La actividad antibacteriana de las antraquinonas obtenidas de otras especies de plantas se ha estudiado por otros investigadores. Por ejemplo, de las seis antraquinonas evaluadas por Xiang *et al.* (2008) el compuesto 1,8-dihidroxi-2-metil-3,7-dimethoxiantraquinona mostró mayor actividad antibacteriana sobre *B. subtilis*, *E. coli*, y *Micrococcus luteus* a la concentración de 13.3 $\mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$ y no fueron activas frente a *S. aureus*. De igual forma, Li *et al.* (2009) evaluaron la actividad antibacteriana de dos antraquinonas (6-acetoxi-1-hidroxi-2-metil-antraquinona-3-O- α -L-ramnopiranosida y 1-acetoxi-6-hidroxi-2-metil-antraquinona-3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-lucopiranosida, aisladas de *R. cordifolia*. Las antraquinonas mostraron actividad contra las bacterias Gram-positivas *B. subtilis*, *S. faecalis* y *B. cereus* a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$.

Los extractos antraquinónicos de raíces de *M. royoc* L. no mostraron actividad frente a *K. pneumoniae* (Tabla 12). Sin embargo, Fabri *et al.* (2009) informaron valores de CMI de 313 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el extracto diclorometánico de hojas de *Mitracarpus frigidus* frente a esta cepa. Contrastantemente, ese extracto tuvo valores mayores de CMI frente a *S. aureus* (313 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), *E. coli* (313 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y *C. albicans* (313 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que los registrados para los extractos antraquinónicos de *M. royoc* L. frente a esos microorganismos (Tablas 12 y 13).

El extracto etanólico de raíces de *Rumex nepalensis* mostró alta actividad antibacteriana frente a: *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* a todas las concentraciones evaluadas (200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{disco}^{-1}$); probablemente debido a la presencia de aloe-emodina, antraquinona presente en las raíces de esta planta (Ghosh *et al.*, 2003).

Siddiqui *et al.* (2007) evaluaron un extracto antraquinónico y antraquinonas puras obtenidas a partir de tallos de *M. citrifolia* L. e informaron actividad antimicrobiana del extracto contra 15 bacterias Gram-positivas con un halo de inhibición de 8-14 mm y 12 bacterias Gram-negativas con un halo de inhibición de 7-12 mm. Sin embargo, en ese estudio las antraquinonas 1-hidroxi-2-metil-antraquinona y 2-hidroximetilantraquinona, identificadas a partir del extracto, no mostraron

actividad antimicrobiana. Los autores refieren que otros compuestos como xantonas pudieran influir en la actividad del extracto.

Al evaluar los extractos de raíces de *M. royoc* L. y la morindona se demostró la relación directa en la actividad anti-*S.aureus* resistente a Oxacillina. La actividad de ambos extractos de raíces de *M. royoc* L. frente a las cepas *S. aureus* ATCC 12598, *E. faecales*, y *E. coli*, pudiera estar influenciada por un efecto sinérgico de todas las antraquinonas o por otros compuestos minoritarios presentes. El extracto antraquinónico de tallos de *H. pustulata* mostró actividad antibacteriana frente a *S. aureus* resistente a Oxacillina, pero no fue activo contra las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *P. aeruginosa* (Nuñez *et al.*, 2003).

Pandey y Mishra (2010) estudiaron el efecto del extracto etanólico de *Aloe barbadensis* contra bacterias patogénicas y contrario a lo que se encontró para extractos de raíces de *M. royoc* L., y antraquinonas aisladas a partir de raíces *in vitro*, ese extracto fue activo sobre *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* con valores de CMI de 0.10 y 10.0 mg·mL⁻¹, respectivamente. Además el extracto de *A. barbadensis* mostró ser activo contra otras bacterias evaluadas en esta investigación como: *E. coli* (CMI 10 mg·mL⁻¹) y *S. aureus* (CMI 0.50 mg·mL⁻¹). En todos los casos el extracto etanólico fue más activo que el extracto acuoso. Según los autores, el extracto etanólico presenta antraquinonas como uno de los componentes activos.

Contradictorio a lo encontrado para extractos de raíces de *M. royoc* L., el microorganismo *P. aeruginosa* fue el más susceptible frente al extracto acuoso de *Cassia occidentalis* L. seguida por *P. mirabilis*, *C. albicans*. El extracto presenta altos contenidos de antraquinonas (Arya *et al.*, 2010).

James *et al.* (2007), Li *et al.* (2007), Kuete *et al.* (2007), Krolicka *et al.* (2008) y Chouna *et al.* (2009) demostraron que las bacterias Gram-positivas fueron más susceptibles que las Gram-negativas a extractos crudos y compuestos de plantas, lo cual coincide con los resultados obtenidos para los extractos y antraquinonas de raíces de *M. royoc* L. La pared celular de las bacterias Gram-positivas es menos compleja y carece de una filtración efectiva contra grandes moléculas debido al tamaño de los poros en su envoltura celular, al ser menos selectivas dejan pasar moléculas más grandes (Hawkey, 1998; Gould y Booker, 2000). En este contexto, el extracto etanólico de las raíces

transformadas de *Maytenus senegalensis* mostraron actividad solo frente a las bacterias Gram-positivas *B. subtilis* y *S. aureus* con valores de CMI de $1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y no fue activo frente a las bacterias Gram-negativas *E. coli* y *K. pneumoniae* (Jain *et al.*, 2008). En contraste, Marzouk *et al.* (2009) informaron que las bacterias Gram- negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*) fueron más sensibles que las Gram-positivas (*E. faecalis* y *S. aureus*) frente a extractos acuosos y acetónicos de *C. colocynthis*.

De acuerdo con los resultados obtenidos para los extractos de raíces de *M. royoc* L. se infiere un efecto de amplio espectro sobre las bacterias Gram-positivas evaluadas e incluso sobre *E. coli*. Este efecto puede ser debido a la acción combinada de los compuestos presentes en las raíces, entre ellos la morindona. Otros autores informan este efecto entre algunos metabolitos cuando se realizaron estudios frente a patógenos (Didry *et al.*, 1998; Arima *et al.*, 2002; Tamokou *et al.*, 2008; Kil *et al.*, 2009). Arima *et al.* (2002) informaron que aunque flavonoides glicósidos, tales como la rutina (quercetina-3-rutinoside) no exhibieron actividad antibacteriana, si incrementaron las propiedades antimicrobianas de flavonoides agliconas (ej. quercetina). Además, algunos flavonoides potenciaron fuertemente la acción bactericida de otros metabolitos de las plantas y antibióticos comerciales frente a *S. aureus* (Stermitz *et al.*, 2002).

El efecto combinado de varios metabolitos o de sinergismo puede ser el resultado de la cooperación de metabolitos que influyen en la permeabilidad de la pared celular de las bacterias decidiendo en sus propiedades antimicrobianas. Algunos metabolitos de plantas no presentan propiedades antimicrobianas pero modulan eficientemente la resistencia bacteriana. Estos compuestos pueden actuar a través de la inhibición de bombas de resistencia a varias drogas, lo que potencia la acción de antimicrobianos, que de lo contrario serían liberados de la célula bacteriana (Stermitz *et al.*, 2002; Gibbons *et al.*, 2005). En este contexto, Kil *et al.* (2009) informaron mayor actividad frente a cinco cepas de bacterias y una de hongo para el extracto crudo de *Sorghum bicolor* Moench, en comparación con las fracciones obtenidas por la presencia de varios tipos de metabolitos secundarios. Como los extractos de plantas son una mezcla compleja de compuestos, la actividad bactericida que se observó podría asociarse a la presencia de otros metabolitos no identificados, es decir, el efecto bactericida final de una preparación de plantas puede ser el resultado de la acción de

varios compuestos presentes en el extracto, así como de la relación de los metabolitos actuando de una manera sinérgica (Krolicka *et al.*, 2008).

Los extractos crudos y antraquinonas aislados de raíces de *M. royoc* L. mostraron CMI en el intervalo registrado para las antraquinonas y los metabolitos aislados de otras plantas (Kanokmedhakul, *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que los productos con una actividad antimicrobiana a concentraciones por debajo de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se consideran extractos con gran interés farmacológico (Ríos y Recio, 2005) se puede plantear, que los extractos antraquinónicos de raíces *in vitro*, raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. y la morindona aislada de raíces *in vitro* de esta planta presentan un potencial para utilizarse en el tratamiento de infecciones causadas por algunas bacterias y hongos. Sin embargo, se recomienda estudios de modo de acción y la evaluación de la toxicidad de dichos extractos y la profundización en estos estudios para su posible uso como agentes antimicrobianos en ensayos clínicos.

4.3.2 Actividad antimicrobiana frente a patógenos que afectan a las plantas.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de extractos de cultivo *in vitro* de raíces y de raíces de plantas en ambiente natural sobre hongos y omicetes que afectan a las plantas se muestra en la tabla 15. Los extractos antraquinónicos de raíces de *M. royoc* L. inhibieron el crecimiento de los patógenos analizados con diferente efectividad. *R. solani* fue el patógeno más susceptible a los extractos. Su crecimiento fue completamente inhibido con concentraciones de ambos extractos desde 62.5 a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Los patógenos *V. dahliae*, *A. solani*, y *F. oxysporum* f.sp. *cubense* mostraron los mayores porcentajes de inhibición con concentraciones de ambos extractos de 500 y $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sin diferencias significativas entre ellos y si con las restantes concentraciones. El extractos de raíces *in vitro* fue más activo que el extracto de raíces de plantas en ambiente natural para los patógenos *P. parasitica* y *P. infestans*. Se obtuvo el mayor porcentaje de crecimiento cuando se utilizó $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de los extractos con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Esto evidencia que cada extracto de una misma planta puede tener actividad antimicrobiana específica y diferente modo de acción frente a los patógenos microbianos (Vinale *et al.*, 2010).

Tabla 15. Actividad antimicrobiana de los extractos antraquinónicos a partir de raíces cultivadas *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. frente a hongos y omicetes que afectan a las plantas.

Extracto	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Porcentaje de inhibición					
		<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Alternaria solani</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Extracto de raíces <i>in vitro</i>	1000	50.87 a	80.57 a	90.28 a	98.28 a	99.28 a	100 a
	500	37.71 b	48.89 b	74.75 b	88.62 ab	90.95 b	100 a
	250	26.97 c	31.71 cd	62.74 bc	83.05 abc	72.77 c	100 a
	125	13.98 d	23.89 de	51.75 cd	76.62 bcd	50.42 e	99.06 a
	62.5	12.58 de	20.53 de	36.25 ef	66.84 cde	12.25 hi	99.28 a
	31.25	6.24 ef	18.77 e	23.84 gh	51.45 ef	7.51 ij	50.44 b
	15.63	0 f	1.24 f	12.32 hi	16.46 g	0 k	27.18 c
	0	0 f	0 f	0 j	0 h	0 k	0 d
Extracto de raíces de plantas en ambiente natural	1000	50.97 a	81.25 a	51.23 cd	99.28 a	62.43 d	100 a
	500	38.05 b	49.60 b	44.37de	91.95 ab	50.08 e	100 a
	250	26.64 c	39.02 bc	33.39 efg	86.28 ab	42.91 f	100 a
	125	12.98 de	28.04 cde	24.48 fgh	78.18 bcd	31.84 g	99.06 a
	62.5	11.58 de	23.70 de	20.53 h	64.77def	18.98 h	95.95 a
	31.25	5.91 ef	18.27 e	13.68 hi	50.12 d	6.24 ijk	51.63 b
	15.63	0 f	2.19 f	6.40 ij	18.46 g	2.52 jk	26.70 c
	0	0 f	0 f	0 j	0 h	0 k	0 d
Media general		18.47	28.60	34.12	60.65	34.26	71.83
Error típico de la media		0.025	0.051	0.065	0.07	0.026	0.024

Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA bifactorial, Tukey HSD, $p \leq 0.05$, $n=3$). Para el tratamiento estadístico, los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2\arccoseno(y/100)^{0.5}$. Los datos que se presentan en la tabla son los datos no transformados.

Los hongos *F. oxysporum* f.sp. *cubense* y *R. solani* presentaron inhibición del 50% del crecimiento (CI_{50}) con concentraciones de aproximadamente $31.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambos extractos (Tabla 15). Es importante señalar que los hongos de conidio coloreado como es el caso de *R. solani* son más difíciles de controlar por productos naturales de plantas. Singh *et al.* (1990), observaron que aquellos hongos que tenían conidios coloreados requerían mayores concentraciones de ajoene, metabolito aislado de *Allium sativum*, para inhibir la germinación del conidio.

Molina-Torres *et al.* (2004) observaron diferencias en la inhibición del crecimiento de la afinina en dependencia del fitopatógeno. Los hongos y omicetes con micelios hialinos, tales como *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium cepivorum* y *P. infestans*, fueron más susceptibles que aquellos que presentaron micelios coloreados. En la figura 17 se observa la inhibición del crecimiento micelial de *R. solani* en presencia (Figura 17A) o ausencia (Figura 17B) de extracto antraquinónico ($31.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L.

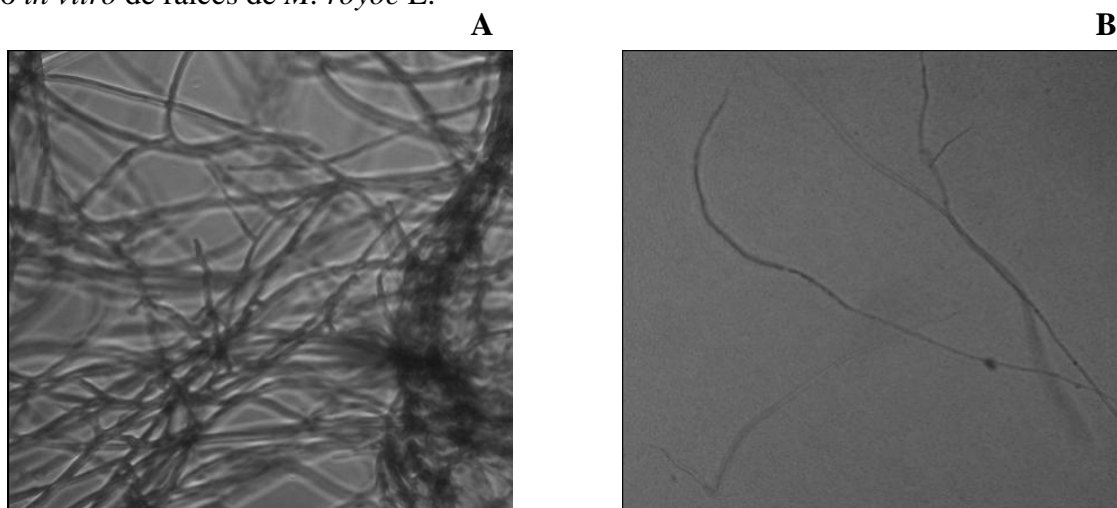


Figura 17. Inhibición del crecimiento microbiano por el extracto antraquinónico de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*. Crecimiento del micelio de *R. solani* después de las 48 horas en ausencia (A) y presencia (B) de extracto antraquinónico ($31.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

En la literatura las antraquinonas muestran su efecto con concentraciones inhibitorias del 50% del crecimiento del patógeno mayores a las observadas en este estudio. Por ejemplo, las antraquinonas emodina, fisiona y reina aisladas a partir de *C. tora* L. presentaron actividad antifúngica sobre *R. solani*, *B. cinerea*, *P. infestans* y *E. graminis* con valores de CI_{50} entre 102 y $46 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. La cepa más susceptible frente a todas las antraquinonas evaluadas fue *E. graminis* (Kim *et al.*, 2004). Los

compuestos sesquiterpenoides aislados de *Calocedrus macrolepis* mostraron valores de CI_{50} de 15.2-21.0 y de 30.1-34.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente a *R. solani* y *F. oxysporum* en ensayos *in vitro*, pero el extracto crudo de esta planta a una concentración de 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sólo inhibió el 33.1% y 15.0% del crecimiento de ambos patógenos (Chang *et al.*, 2008). Esto puede estar dado por la concentración en que se encuentre un compuesto antimicrobiano específico en el extracto crudo o al efecto sinérgico de los compuestos presentes

La purificación de las antraquinonas a partir de los extractos, como futura formulación para su uso en la agricultura, es un proceso costoso. Es por eso que en este estudio sólo se evaluaron los extractos crudos, teniendo en cuenta que su producción a gran escala es más factible económicamente. Además en estudios previos frente a patógenos que afectan al hombre se pudo comprobar que los extractos crudos presentan mayor actividad antimicrobiana que las antraquinonas puras, posiblemente por efecto sinérgico. El efecto sinérgico de las antraquinonas también se informa frente a patógenos de plantas. Por ejemplo, mediante la combinación de dos o más moléculas en un extracto, como es el caso de las antraquinonas fisona y crisofanol, se logró actividad contra hongos en plantas de *Cucumis sativus* L. y *Triticum aestivum* (Yang *et al.*, 2007). En este contexto, Godard *et al.* (2009) informaron que las fracciones purificadas y la antraquinona pura (emodina) presentaron menor actividad fungitóxica sobre *P. viticola*, que el extracto crudo. Los extractos crudos indujeron la acumulación de fitoalexinas, incrementaron la actividad peroxidasa y provocaron una reacción de hipersensibilidad no encontrada para las fracciones y la emodina.

Varios grupos de investigación informan actividad antifúngica de diferentes extractos de plantas a mayores concentraciones que los resultados que se obtuvieron en esta investigación para extractos de *M. royoc* L. Por ejemplo, Sharma y Kumar (2009), evaluaron el efecto de concentraciones de extractos etanólicos de diferentes órganos de *Capparis decidua*, *Lantana camara* y *Tridax procumbens* sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. Los autores informaron que 12 de los extractos a una concentración de 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibieron más del 70% la germinación de las esporas y más del 80% fue inhibido por nueve de los extractos a 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Kim *et al.* (2003) evaluaron las propiedades fungicidas *in vivo* de diferentes extractos de *Curcuma longa* L. El extracto hexánico a 1000 mg·mL⁻¹ demostró actividad fungicida y anti-omicete frente a *E. graminis*, *P. infestans*, y *R. solani* y el extracto de etil acetato a 1000 mg·L⁻¹ demostró actividad frente a *B. cinerea*, *P. infestans*, *Puccinia recondita* y *R. solani*. A partir de esta fracción purificaron el metabolito curcúmina el cual a una concentración de 500 µg·mL⁻¹ mostró una actividad de 100, 100 y 63% frente a *P. infestans*, *P. recondita* y *R. solani* respectivamente.

La Tabla 16 muestra que ambos extractos fueron activos para inhibir el crecimiento de las bacterias *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* y *X. campestris* p.v. *phaseoli*. Para la bacteria *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no hubo diferencias significativas en los tratamientos entre los extractos de raíces *in vitro* y raíces en ambiente natural en las concentraciones 250-1000 µg·mL⁻¹ y si con las restantes concentraciones de los dos tratamientos. Sin embargo, en los tratamientos de extractos de raíces en ambiente natural, la concentración de 125 µg·mL⁻¹ no mostró diferencias significativas con respecto a las concentraciones mayores que se evaluaron (250, 500, 1000 µg·mL⁻¹). Los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento de *X. campestris* p.v. *phaseoli* se obtuvieron con concentraciones para ambos extractos entre 500-1000 µg·mL⁻¹ con diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Molina-Torres *et al.* (2004) evaluaron la actividad antimicrobiana de afinina, la principal alkalamida aislada de las raíces de *Heliopsis longipes*. En presencia de 150 mg·mL⁻¹ este compuesto mostró fuerte actividad sobre los hongos *P. infestans*, *R. solani* AG-3, *R. solani* AG-5, *S. cepivorum* y *S. rolfsii*. Se encontró baja sensibilidad frente a *P. infestans* y *Verticillium* sp. La actividad frente a bacterias fue menor que frente a hongos. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* no fue sensible a este compuesto. Sin embargo, en este trabajo ambos extractos de raíces de *M. royoc* L. inhibieron el crecimiento de la bacteria con todas las concentraciones evaluadas con diferentes porcentajes de inhibición.

Tabla 16. Actividad antimicrobiana de los extractos antraquinónicos a partir de raíces cultivadas *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royo* L. frente a bacterias patógenas de plantas.

Extracto	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Porcentaje de Inhibición	
		<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> p.v. <i>phaseoli</i>
Extracto de raíces <i>in vitro</i>	1000	100 a	95 a
	500	100 a	87 ab
	250	93.85 ab	80.90 bc
	125	85.67 bc	72 cd
	62.5	78.61 cd	68.67 cd
	31.25	53 e	48.33 f
	15.63	30.67 f	45.34 f
	0	0 g	0 g
Extracto de raíces de plantas en ambiente natural	1000	99 a	87.33 ab
	500	98 ab	87.40 ab
	250	96.33 ab	76.02 bcd
	125	93.85 ab	68.02 d
	62.5	67.95 d	64.54 de
	31.25	53.77 e	52.68 ef
	15.63	44.25 e	42 f
	0	0 g	0 g
Media general		68.43	60.95
Error típico de la media		0.082	0.040

Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA bifactorial, Tukey HSD, $p \leq 0.05$, $n=3$). Para el tratamiento estadístico los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2 \arccos(y/100)^{0.5}$. Los datos que se presentan en la tabla son los datos no transformados.

Es importante señalar que ambos extractos mostraron actividad frente a dos importantes bacterias de plantas, lo cual es un tema poco abordado en la literatura y abre la posibilidad del empleo de los extractos en el control de bacterias fitopatógenas. Las antraquinonas presentan diferentes mecanismos de acción para inhibir directamente el crecimiento de los patógenos. Por ejemplo, estos metabolitos pueden modular las propiedades físicas de las membranas (Alves *et al.*, 2004). Además

pueden formar un complejo irreversible con aminoácidos nucleofílicos de las proteínas de los patógenos, lo que a menudo conduce a la inactivación de las mismas y a la pérdida de sus funciones o pueden inhibir la síntesis de las proteínas bacterianas al bloquear el ribosoma A (Stern *et al.*, 1996; Pandey y Mishra, 2010). Estudios posteriores se llevarán a cabo para elucidar el modo de acción del extracto y las antraquinonas identificadas en este estudio.

De forma general, estos resultados sugieren que los extractos de raíces de *M. royoc* L. podrían utilizarse como potenciales pesticidas aunque son necesarios otros estudios de toxicidad y actividad sobre microorganismos de la microflora.

4.3.2.1 Efecto de la acción protectora de extractos antraquinónicos en la fase de semillero en el cultivo del tabaco.

En la tabla 17 aparece el efecto protector de los extractos en las semillas de tabaco sembradas en sustrato con infección natural de los patógenos del suelo: *P. parasitica*, *P. aphanidermatum* y *R. solani*. Como se puede observar cuando las semillas se trataron previo a su siembra con los extractos antraquinónicos se obtuvieron los mayores porcentajes de germinación (95.5% y 96.2%) con diferencias significativas con las semillas sin tratar (Tabla 17), lo cual muestra el efecto protector de ambos extractos. La figura 18 muestra la germinación de las semillas de tabaco en los diferentes tratamientos evaluados. Como se observa, hubo un mayor número de semillas germinadas cuando se trató a las semillas con los extractos de raíces de *M. royoc* L.

Tabla 17. Porcentaje de germinación de semillas de tabaco germinadas en sustrato en condiciones de infección natural con los patógenos: *P. parasitica*, *P. aphanidermatum* y *R. solani*.

Tratamiento a las semillas	Porcentaje de germinación
Semillas sumergidas en agua destilada estéril	17.6 c
Semillas sumergidas en extracto antraquinónico de raíces <i>in vitro</i> (1mg·mL ⁻¹)	95.5 a
Semillas sumergidas en extracto antraquinónico de raíces de plantas en ambiente natural (1mg·mL ⁻¹)	96.2 a

Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey HSD, $p \leq 0.05$, $n=3$).

Media general= 24.9%; Error típico de la media= 1.19. Para el tratamiento estadístico los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2 \arccos(y/100)^{0.5}$. Los datos que se presentan en la tabla son los datos no transformados.

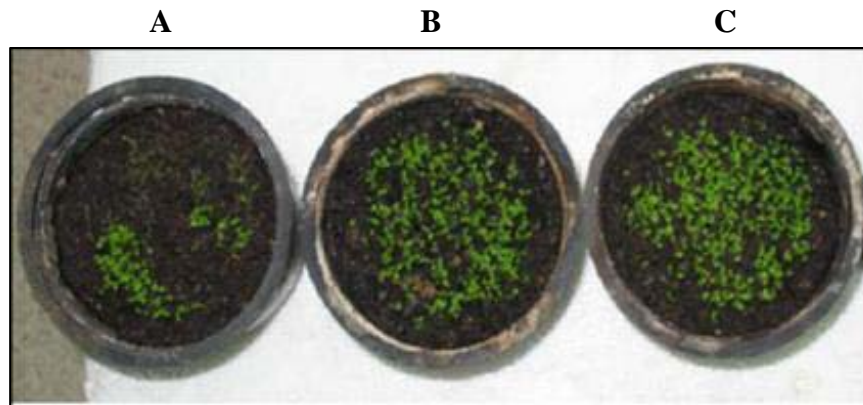


Figura 18: Semillas de tabaco germinadas en sustrato en condiciones de infección natural con los patógenos: *P. parasitica*, *P. aphanidermatum* y *R. solani*. **A:** Semillas sumergidas en agua destilada estéril, **B:** Semillas sumergidas en extracto antraquinónico de raíces *in vitro* de *M. royoc* L. ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), **C:** Semillas sumergidas en extracto de raíces de plantas en ambiente natural ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Las enfermedades de las plantas juegan una función directa en la destrucción de fuentes naturales en la agricultura. En particular, los patógenos del suelo tales como *Phythium* sp., *Phytophthora* sp., *Botrytis* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp. causan importantes pérdidas en las cosechas (Benítez *et al.*, 2004). Los productos naturales de las plantas presentan un alto potencial para su uso en programas de manejo de plagas y enfermedades (Sharma y Kumar, 2009; Yang *et al.*, 2009). Sin embargo, el resultado de los programas de tamizaje demuestra que la probabilidad de encontrar compuestos altamente activos es baja. Normalmente se estima una probabilidad de 0.01 % (Mendoza *et al.*, 2007).

Existen diferentes metabolitos secundarios con probada actividad sobre hongos fitopatógenos. Por ejemplo, los aceites esenciales de *Salvia fruticosa* fueron efectivos sobre los hongos: *R. solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium solani* (Pitarokili *et al.*, 2003). Estos compuestos aislados de *Thymbra spicata*, *Satureja thymbra* y *Origanum minutiflorum* inhibieron el crecimiento de los patógenos del suelo: *F. moniliforme*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *Phytophthora capsici* (Muller-Riebau *et al.*, 1995). Los derivados de cumarinas presentaron alta efectividad *in vitro* para inhibir el crecimiento de los patógenos *Macrophomina phaseolina* y *Pythium* spp. (Brooker *et al.*, (2007). Los compuestos secundarios asaronaldehído y α -asarona mostraron fuerte actividad antimicrobiana *in vivo* sobre *R. solani* y *P. infestans* a $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Lee, 2007).

Las antraquinonas aisladas de plantas presentan alta actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos. Existe una formulación comercial (Milsana[®]) a base de antraquinonas que controla el mildio polvoriento del pepino (Kim *et al.*, 2004; Konstandinidou-Doltsinis *et al.*, 2007; Rosca-Casian *et al.*, 2007). Milsana[®] también fue efectiva para el control de semillas de frijol con *Colletotrichum lindemuthianum* pero estuvo asociado con una reducción en emergencia (Tinivella *et al.*, 2009). Según Koch *et al.* (2010), después del tratamiento de las semillas se puede observar un efecto protector si el agente penetra dentro de la semilla y alcanza los tejidos activos fisiológicamente de los brotes en desarrollo. Los extractos de raíces de *M. royoc* L. pudieran estar actuando por este mecanismo de acción, aunque es necesario realizar otros estudios para afirmarlo.

Se conoce que diferentes especies de *Trichoderma* se encuentran entre los agentes de biocontrol fúngico más estudiados y son útiles como biopesticidas en casas verdes y producciones de campo (Benítez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2007). El mecanismo de biocontrol de *Trichoderma* es un proceso complejo mediado por la secreción de metabolitos secundarios (Liu *et al.*, 2009). Se han caracterizado diferentes metabolitos secundarios a partir de *Trichoderma* spp. entre los que se encuentran: azafilona, butenolide, harzianolide, antraquinonas entre otros (Liu *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2009). Las antraquinonas aisladas a partir de *Trichoderma harzianum* Raza Th-R16 mostraron alta actividad antifúngica sobre *R. solani* y *B. cinerea*. El nivel de actividad encontrada dependió del grado de oxidación de los compuestos. Las antraquinonas altamente oxidadas fueron agentes antimicrobianos más potentes y pueden actuar para incrementar la eficiencia competitiva de *Trichoderma* y la resistencia del hospedero a otros patógenos (Liu *et al.*, 2009).

El tabaco es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial. Su cultivo involucra una fase de semillero de alrededor de 40 días, después de la cual las plantas se transfieren al campo hasta que alcanzan tamaño comercial. La protección en la fase de semilleros es esencial para obtener plantas sanas (Falcón *et al.*, 2007). Durante esta fase las plantas sufren el ataque de varios patógenos del suelo que son controlados por agentes químicos (Erwin y Ribeiro, 1996). Sin embargo, cada vez más, se están desarrollando sistemas de manejo ecológico para eliminar el uso de agroquímicos (García *et al.*, 2002).

Varios patógenos del suelo desarrollan resistencia a los agroquímicos utilizados (Jaarsveld *et al.*, 2002), lo que hace necesario la búsqueda de sistemas de protección alternativos. Adicionalmente los extractos de plantas se utilizan tradicionalmente como fungicidas naturales en pequeña escala en los cuales el uso de químicos sintéticos no son factibles económicamente (Tegegne y Pretorius, 2007).

En semilleros de tabaco se demostró que un polímero de quitosano en dosis entre 1.5-2.0 mg·mL⁻¹ causó la inhibición sobre el crecimiento de los patógenos del suelo: *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Su efecto estuvo acompañado con la inducción foliar de marcadores defensivos y de resistencia en plantas de tabaco previamente tratadas por inmersión de semillas y aspersión foliar (Falcón *et al.*, 2007). El quitosano, además puede formar una barrera física en los sitios de penetración del patógeno impidiendo su entrada además de activar las cascadas de señalización y la activación y acumulación de compuestos antimicrobianos relacionados con la defensa (Hadrami *et al.*, 2010).

Los extractos de *M. royoc* L. mostraron efecto protector en las semillas de tabaco sembradas en suelo con infección natural. Es necesario realizar otras investigaciones que permitan determinar el modo de acción de estos compuestos.

4.3.2.2 Efecto de la acción protectora de extractos antraquinónicos en plantas de tomate inoculadas con *Alternaria solani*.

En la tabla 18 se observa el efecto de los extractos de antraquinonas (raíces *in vitro* y raíces en ambiente natural) en plantas de tomate inoculadas con *A. solani*. El mayor porcentaje de plantas con síntomas se observó en las plantas que no fueron asperjadas con los extractos. Los tratamientos con extractos antraquinónicos mostraron los menores porcentajes de plantas con síntomas de la enfermedad con diferencias significativas a los tratamientos controles.

En experimento *in vitro* desarrollados en este trabajo (Tabla 15), se muestra que los extractos inhibieron hasta un 80% del crecimiento de *A. solani* a la concentración más alta estudiada (1 mg·mL⁻¹). En ensayos *in vivo* cuando los extractos se asperjaron a esa concentración las plantas de tomate presentaron los menores porcentajes de síntomas de tizón temprano (*A. solani*)

comparados con el control (Tabla 18). En este caso, los extractos pudieron no solo inhibir el crecimiento directamente del patógeno sino inducir los mecanismos de la resistencia de las plantas de tomate.

Tabla 18. Porcentaje de plantas de tomate con síntomas de tizón temprano (*A. solani*).

Tratamiento	Porcentaje de plantas con síntomas
Plantas asperjadas con SDS 0.5 % (m:v) (control)	66 a
Plantas asperjadas con agua destilada estéril (control)	72 a
Plantas asperjadas con extracto antraquinónico de raíces <i>in vitro</i> (1 mg·mL ⁻¹)	16 b
Plantas asperjadas con extracto antraquinónico de raíces de plantas en ambiente natural (1 mg·mL ⁻¹)	8 b

Medias con letras desiguales difieren estadísticamente (ANOVA de un factor, Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).

Media general= 40.50%; Error típico de la media= 1.8. Para el tratamiento estadístico, los datos se transformaron de acuerdo con $y' = 2 \arcseno (y/100)^{0.5}$. Los datos que se presentan en la tabla son los datos no transformados.

El cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa el primer lugar de importancia en la producción hortícola cubana, y constituye además, un importante renglón para la industria conservera del país. No obstante, sus rendimientos son bajos debido, entre otras causas, a la susceptibilidad a las enfermedades (Capote *et al.*, 2002). El tizón temprano, causado por *A. solani* es una de las enfermedades que más incide en la disminución de los rendimientos del tomate pudiendo causar pérdidas de hasta el 79% de las cosechas en países altos productores (Chaerani *et al.*, 2006). Esta enfermedad reduce el área fotosintética y en casos severos puede causar la defoliación de las plantas. Las medidas de control de la enfermedad incluyen rotación de cultivo de 3-5 años, aplicaciones de fungicidas químicos y el uso de transplantes libres de enfermedades (Chaerani *et al.*, 2006; Chaerani *et al.*, 2007).

Las antraquinonas muestran alta actividad antimicrobiana frente a patógenos de plantas mediante inducción de resistencia localizada debido a incrementos del contenido de fenoles, actividad de las enzimas β -1.3-glucanasa, quitinasa, fenilalanina-amonio-liasa, lipo-oxigenasa y catalasas (Schmitt, 2006; Ma *et al.*, 2010; Daayf *et al.*, 1997). En este contexto, Dayan *et al.* (2009) informaron que los

extractos antraquinónicos pueden incrementar las especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo dependiente de antraquinona puede inducir resistencia adquirida sistémica e inhibir directamente el crecimiento del patógeno. También se ha informado que la antraquinona fisona modifica la expresión de genes relacionados con la defensa y especialmente la expresión del gen específico para la tioniina (péptidos ricos en cisteínas con propiedades antimicrobianas) (Ma *et al.*, 2010).

Mediante la inducción de resistencia en las plantas de tomate es posible controlar la enfermedad provocada por *A. solani*. Por ejemplo, el ácido salicílico produjo la inducción de resistencia sistémica adquirida en plantas de tomate contra *A. solani*. La adición de ácido salicílico incrementó los niveles de la hormona en las hojas de tomate y fue acompañado de la activación de genes relacionados con la patogénesis en plantas de tomate (Spletzer y Enyedi, 1999). El tratamiento foliar en plantas de tomate con glicósidos sintéticos combinados con aminas a una concentración de 2 mg·mL⁻¹ redujo el 75% de crecimiento de *A. solani* comparado con el control, mediante la inducción de mecanismos de resistencia. Con el tratamiento de ambos químicos se produjo una activación de la vía de fenilpropanoides, disminución de actividad peroxidada, incremento en las clorofilas y contenidos de proteínas (Flors *et al.*, 2003). En este trabajo los extractos antraquinónicos de raíces de *M. royoc* L. protegieron las plantas de la infección. Resulta interesante, determinar su efecto en la inducción de mecanismos defensivos, en adición al demostrado efecto de inhibición del crecimiento del patógeno *in vitro*. Otros estudios relacionados con el modo de acción de las antraquinonas se realizarán en experimentos futuros.

En la literatura consultada no hay informes del uso de extractos antraquinónicos para el control de *A. solani* en plantas de tomate. Sin embargo, existe un gran número de trabajos donde se muestra el potencial de los extractos de plantas para el control de este hongo. Por ejemplo, el extracto acuoso de las raíces *Curcuma longa* y el metabolito curcúmina a diferentes concentraciones se evaluaron frente a *A. solani*. El extracto fue más activo que el metabolito puro e inhibió el crecimiento micelial y la esporulación del hongo a concentraciones entre 10 y 15% (Balbi-Peña *et al.*, 2006). Los extractos acuosos de *Achillea millefolium*, *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* y *Rosmarinus officinalis* mostraron actividad fúngica frente a *A. solani*. Se observó una acción

protectora al reducir el número de lesiones en las hojas con relación al control en plantas de tomate en casas verdes (Itako *et al.*, 2008).

Koch *et al.* (2010) evaluaron diferentes métodos no convencionales de control sobre *Alternaria dauci* y *A. radicina* en semillas de zanahoria. De todos los inductores de resistencia evaluados solo Milsana[®] produjo control sobre los patógenos de las semillas. Milsana[®] presenta como ingrediente activo las antraquinonas fisona y emodina.

En experimentos *in vitro* el extracto acuoso (20%) de hojas del Neem (*Azadirachta indica*) inhibió el 70.55% y el 100 % del crecimiento de los hongos *A. solani* y *F. oxysporum* respectivamente. El nimolol puro aislado de la planta no tuvo actividad antifúngica sobre los hongos evaluados. Las plantas que se asperjaron o irrigaron mostraron una marcada inhibición de la incidencia y severidad de la enfermedad después de dos y cuatro semanas de la inoculación del patógeno (Hassanein *et al.*, 2008).

Gachande, (2009), evaluó diferentes extractos de 15 plantas sobre la germinación y el crecimiento micelial de *A. solani*. El extracto de *Allium sativum* fue el más efectivo en regular el crecimiento del hongo. De esta misma forma, Latha *et al.* (2009) demostraron la más alta inhibición del crecimiento (87%) del hongo por el extracto de hojas de Zimmu (*Allium cepa* L. x *Allium sativum* L.). Las plantas de tomate tratadas con el extracto incrementaron los niveles de las enzimas: peroxidasa, polifenol oxidasa, fenilalanina amonio-liasa, quitinasa y β -1,3 gluconasa.

Este estudio demuestra que los extractos de *M. royoc* L. tuvieron un efecto protector en semilleros de tabaco y en plantas de tomate frente a *A. solani*. Los resultados obtenidos en esta investigación juntos con los relacionados con mecanismos de acción de las antraquinonas y toxicidad servirán para trazar nuevas estrategias que permitan el uso de los extractos de *M. royoc* L. en el control de microorganismos fitopatógenos.

El conjunto de experimentos desarrollados en esta investigación comprueban la hipótesis que “Es posible la obtención de antraquinonas a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de patógenos que afectan al hombre y a las plantas mediante el manejo de las condiciones de cultivo”.

5. CONCLUSIONES.

1. Se establecieron los principales factores en el cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. para la obtención de antraquinonas por unidad de masa fresca. El empleo de la auxina ácido indolacético a $5.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, la concentración de $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa suplementada al medio de cultivo, el cultivo de raíces durante 30 días, el empleo del medio de cultivo sin renovación y el crecimiento en la oscuridad favorecieron la acumulación del metabolito.
2. En las raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro* la adición de elicitores incrementó el rendimiento específico de antraquinonas el cual estuvo en el rango de la concentración que se obtiene para raíces de plantas en ambiente natural.
3. El mayor rendimiento específico de antraquinonas se logró mediante la extracción a partir de las raíces cultivadas *in vitro*, mientras que los contenidos de antraquinonas detectados en el medio de cultivo fueron significativamente bajos.
4. En el extracto diclorometánico que se obtuvo a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. se aislaron y se identificaron por primera vez ocho antraquinonas: la alizarina, damnacantal, nordamnacantal, morindona, rubiadina, soranjidiol, lucidina y rubiadina-1-metiléter. La presencia de alizarina y rubiadina constituyen el primer informe para esta especie.
5. Los extractos antraquinónicos de raíces cultivadas *in vitro* y raíces de plantas en ambiente natural mostraron actividad inhibitoria sobre el crecimiento de patógenos que afectan al hombre al ser activos frente a siete cepas de *Candida* (valor más bajo de CMI $1.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a tres bacterias Gram-positiva (CMI $31.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), y una Gram-negativa (CMI $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). De las antraquinonas puras que se aislaron a partir de cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. sólo la morindona mostró actividad inhibitoria sobre las especies de levaduras que se evaluaron (CMI $1.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y sobre *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacillina (CMI $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

6. En experimentos *in vitro* los extractos diclorometánicos de cultivo *in vitro* de raíces y raíces de plantas en ambiente natural de *M. royoc* L. mostraron inhibición del crecimiento frente a patógenos que afectan las plantas.
7. En experimentos *in vivo* se comprobó el efecto protector de los extractos de raíces de *M. royoc* L. en semillas de tabaco germinadas en sustrato con infección natural de los patógenos: *Phytophthora parasitica*, *Pythium aphanidermatum* y *Rhizoctonia solani*, y en plantas de tomate inoculadas con *Alternaria solani*.

6. RECOMENDACIONES.

1. Aplicar el protocolo desarrollado en esta investigación para la obtención de antraquinonas a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *M. royoc* L. y optimizarlo para su escalado.
2. Profundizar en los estudios de toxicidad y ecotoxicidad de los extractos crudos y la morindona aislada a partir de raíces de *M. royoc* L. cultivadas *in vitro*, así como estudiar los mecanismos mediante los cuales ejercen su acción.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdullah, M.A; Ali, A.M; Marcia, M; Lajis, N.H; Ariff, A.B. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54: 173–182.
2. Abdullah, M.A; Ariff, A.B; Ali, A.M; Lajis, N.H. 2000b. Strategies to overcome foaming and wall-growth during the cultivation of *Morinda elliptica* cell suspension culture in a stirred-tank bioreactor. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60: 205–212.
3. Abdullah, M.A; Ariff, A.B; Marziah, M; Ali, A.M; Lajis, N.H. 2000a. Growth and anthraquinone production of *Morinda elliptica* cell suspension cultures in a stirred-tank bioreactor. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4432–4438.
4. Agarwal, K; Singh, S; Verma, S; Kumar, S. 2000. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodin*. *J. Ethnopharmacol.* 72: 43–46
5. Ahmed, S; Hahn, E.J; Paek, K.Y. 2008. Aeration volume and photosynthetic photon flux affect cell growth and secondary metabolite contents in bioreactor cultures of *Morinda citrifolia*. *J. Plant Biol.* 51: 209-212.
6. Alain, H. 1964. Flora de Cuba. Tomo 5. Publicación de la Asociación de Estudiantes de Ciencias Biológicas. La Habana. Cuba. pp. 362.
7. Alanís, B.A; González, G.M; Salazar, R; Waksman, N; Rivas, V.M. 2007. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 114: 468–471.
8. Alef K. 1995. Soil respiration. In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. K. Alef and P. Nannipieri (Eds). Academic Press. London, USA. Pp: 214-219.
9. Ali, A.M; Ismail, N.H; Mackeen, M.M; Yazan, L.S; Mohamed, S.M; Ho, A.S.H; Lajis, N.H. 2000. Antiviral, cytotoxic, and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica*. *Pharm. Biol.* 38: 298-301.
10. Aligiannis, N; Kalpotzakis, E; Mitaku, S; Chinou, I.B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 40: 4168–4170.

11. Alitheen, N.B; Manaf, A.A; Yeap, S.K; Shuhaimi, M; Nordin, L; Mashitoh, A.R. 2010. Immunomodulatory effects of damnacanthol isolated from roots of *Morinda elliptica*. *Pharm. Biol.* 48: 446-452.
12. Alves, D.S; Perez-Fons, L; Estepa, A; Micol, V. 2004. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem Pharmacol.* 68: 549–561.
13. Amdoun, R; Khelifi, L; Khelifi-Slaoui, M; Amroune, S; Benyoussef, E.H; Vu Thi, D; Assaf-Ducrocq, C; Gontier, E. 2009. Influence of minerals and elicitation on *Datura stramonium* L. tropane alkaloid production: Modelization of the *in vitro* biochemical response. *Plant Sci.* 177: 81–87.
14. Angelova, Z; Georgiev, S; Roos, W. 2006. Elicitation of plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 20: 72–83.
15. Antognoni, F; Zheng, S; Pagnucco, C; Baraldi, R; Poli, F; Biondi, S. 2007. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. *Fitoterapia.* 78: 345–352.
16. Aobchey, P; Sriyam, S; Praharnriporab, W; Lhieochaiphant, S; Phutrakul, S. 2002. Production of red pigment from the root of *Morinda gustifolia* Roxb. var. *scabridula* Craib. by root cell culture. *CMU. J.* 1: 66-78.
17. Argolo, A.C; Charlwood, B.V; Pletsch, M. 2000. The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of *Solanum aviculare*. *Planta Med.* 66: 448–451.
18. Arima, H; Ashida, H; Danno, G. 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 1009–1014.
19. Arya, V; Yadav, S; Kumar, S; Yadav, J.P. 2010. Antimicrobial activity of *Cassia occidentalis* L. (Leaf) against various human pathogenic microbes. *Life Sci. Med. Res.* 9: 1-11.
20. Azlan, G.J; Marziah, M; Radzali, M; Johari, R. 2002. Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 271–278.

21. Bais, H.P; Walter, T.S; McGrew, J.J; Vivancio, J.M. 2002. Factors affecting growth of cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John'S Wort) and production of hypericin. *In Vitro Cell. Dev-Plant*.38: 58-65.
22. Balbi-Peña, M.I; Becker, A; Stangarlin, J.R; Franzener, G; Lopes, M.C; Schwan-Estrada, K.R.F. 2006. Control of *Alternaria solani* in tomato by *Curcuma longa* extracts and curcumin - I. *In vitro* evaluation. *Fitopatol. bras.* 31: 310-314.
23. Baque, A.M; Hahn, E.J; Paek, K.Y. 2010a. Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. *In Vitro Cell. Dev-Plant*. 46: 71-80.
24. Baque, A.M; Hahn, E.J; Paek, K.Y. 2010b. Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. *Plant Biotechnol. Rep.* 4: 109-116.
25. Barth, A; Peter, S; Sedlářová, E; Valent, A; Tokhtaeva, E. 2005. Study of immobilized and extracellular aminopeptidases of watermelon. *Acta Histochem.* 107: 253-259.
26. Bednarek, P; Osbourn, A. 2009. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science.* 324: 746-748.
27. Benítez, T; Rincón, A.M; Limón, M.C; Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* Strains. *Int. Microbiol.* 7: 249-260.
28. Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293-300.
29. Betsui, F; Tanaka-Nishikawa, N; Shimomura, K. 2004. Anthocyanin production in adventitious root cultures of *Raphanus sativus* L. cv. Peking Koushin. *Plant Biotechnol.* 21: 387-391.
30. Beyra, A; León, M.C; Iglesias, E; Ferrándiz, D; Herrera, R; Volpato, G; Godínez, D; Guimaraes, M; Álvarez, R. 2004. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid.* 61: 185-204.
31. Bhadra, R; Morgan, J.A; Shanks, J.V. 1998. Transient studies of light-adapted cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*: growth and indole alkaloid accumulation. *Biotechnol. Bioeng.* 60: 670-678.

32. Boldizsár, I; Szűcs, Z; Füzfai, Z; Molnár-Perl, I. 2006. Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1133: 259-274.
33. Bouque, V; Bourgaud, F; Nguyen, C; Guckert, A. 1998. Production of daidzein y callus cultures of *Psoralea* species and comparison with the plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53: 35–40.
34. Bourgaud, F; Gravot, A; Milesi, S; Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant. Sci.* 161: 839-851.
35. Broekaert, W.F; Terras, F.R.G; Cammue, B.P.A; Vanderleyden, J. 1990. An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol. Lett.* 69: 55–60.
36. Brooker, N.L; Kuzimichev, Y; Laas, J; Pavlis, R. 2007. Evaluation of coumarin derivatives as anti-fungal agents against soil-borne fungal pathogens. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 72: 785-793.
37. Bulgakov, V.P; Tchernoded, G.K; Mischenko, N.P; Khodakovskaya, M.V; Glazunov, V.P, Radchenko, S.V; Zvereva, E.V; Fedoreyev, S.A; Zhuravlev, Y.N. 2002. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *J. Biotechnol.* 97: 213–221.
38. Bustillo, A; Aleu, J; Hernández-Galán, R; Collado, I. 2003. Biotransformation of the fungistatic compound (*R*)-(+)-1-(4- ϕ -chlorophenyl) propan-1-ol by *Botrytis cinerea*. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 21: 267-271.
39. Cai, Y; Luo, O; Sun, M; Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74: 2157–2184.
40. Capote, A; Socorro, A; Rodríguez de la Rosa, N; Pérez, O; Marrero, N. 2002. Fitotoxicidad de los filtrados de cultivos de *Alternaria solani* Sorauer. I. Efecto sobre la permeabilidad celular en hojas y callos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Rev. Protección Veg.* 17: 30-33.
41. Capote, A; Pérez-Alonso, N; Pérez, A; Barbón, R; Salas, E; Wilken, D; Gerth, A; Müller-Kuhrt, L; Jiménez, E. 2008. Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y plantas de campo de *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. y *Morus alba* L. *Biotechnología Vegetal.* 8: 119 – 121.

42. Carmeli, Y; Troillet, N; Eliopoulos, G.M; Samore, M.H. 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1379–1382.
43. Carretero, M.E. 2000. Compuestos fenólicos: Quinonas. *Panorama Actual Med.* 24: 778-782.
44. Carrillo-Muñoz, A.J; Giusiano, G; Ezkurra, P.A; Quindós, G. 2006. Antifungal agents. Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter.* 19: 130-139.
45. Chaerani, R; Voorrips, R.E. 2006. Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. *J. Gen Plant Pathol.* 72: 335–347.
46. Chaerani, R; Groenwold, R; Stam, P; Voorrips, R.E. 2007. Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a droplet inoculation method. *J. Gen Plant Pathol.* 73: 96–103.
47. Chan, L.K; Dewi, P.R; Boey, P.L. 2005. Effect of plant growth regulators on regeneration of plantlets from bud cultures of *Cymbopogon nardus* L. and the detection of essential oils from the in vitro plantlets. *J. Plant Biol.* 48: 142–145.
48. Chang, H.T; Cheng, Y.H; Wu, Ch.L; Chang, S.T; Chang, T.T; Su, Y.C. 2008. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresour. Technol.* 99: 6266–6270.
49. Chen, H; Chen, F. 2000. Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. *Process Biochem.* 35: 837–840.
50. Chiang, L; Abdullah, M.A. 2007. Enhanced anthraquinones production from adsorbent-treated *Morinda elliptica* cell suspension cultures in production medium strategy. *Process Biochem.* 42: 757–763.
51. Cho, K; Agrawal, G.K; Shibato, J; Jung, Y.H; Kim, Y.K; Nahm, B.H; Jwa, N.S; Tamogami, S; Han, O.O; Kohda, K; Iwahashi, H; Rakwal, R. 2007. Survey of differentially expressed proteins and genes in jasmonic acid treated rice seedling shoot and root at the proteomics and transcriptomics levels. *J. Proteome. Res.* 6: 3581-3603.
52. Chong, T.M; Abdullah, M.A; Fadzillah, N.M; Lai, O.M; Lajis, N.H. 2004. Anthraquinones production, hydrogen peroxide level and antioxidant vitamins in *Morinda elliptica* cell

- suspension cultures from intermediary and production medium strategies. *Plant Cell Rep.* 22: 951-958.
53. Chong, T.M; Abdullah, M.A; Fadzillah, N.M; Lai, O.M; Lajis, N.H. 2005a. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme Microb. Technol.* 36: 469–477.
54. Chong, T.M; Abdullah, M.A; Lai, O.M; Fadzillah, N.M; Lajis, N.H. 2005b. Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochem.* 40: 3397–3405.
55. Chouna, J.R; Nkeng-Efouet, P.A; Lenta, B.N; Devkota, K.P; Neumann, B; Stammeler, H.G; Kimbu, S.F; Sewald, N. 2009. Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedia anacardioides*. *Phytochemistry.* 70: 684–688.
56. CITMA. 2009. IV Informe nacional al convenio sobre la diversidad biológica. República de Cuba. pp: 170.
57. Cuesta-Rubio, O; Vélez-Castro, H; Frontana-Uribe, B.A; Cárdena, J. 2001. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry.* 57: 279-283.
58. Cui, X.H; Chakrabarty, D; Lee, E.J; Paek, K.Y. 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresour. Technol.* 101: 4708–4716.
59. Daayf, F; Schmitt, A; Bélanger, R.R. 1997. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiol.* 113: 719–727.
60. Dayan, F.E; Cantrell, C.L; Duke, S.O. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4022–4034.
61. De Klerk, G.J. 1995. Hormone requirements during the successive phases of rooting of *Malus* microcuttings. En: Terzi, M, Cella, R, Falavigna, A. (eds.): *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp: 111-116.
62. De Klerk, G.J; Gerrits, M.M. 1996. Development of dormancy in tissue- cultured lily bulblets and apple shoots. In: G. A. Lang (ed). *Plant Dormancy* CAB International. pp: 115-131.

63. Deng, S; West, B.J; Jensen, C.J; Basar, S; Westendor, J. 2009. Development and validation of an RP-HPLC method for the analysis of anthraquinones in noni fruits and leaves. *Food Chem.* 116: 505–508.
64. Dewir, Y.H; Chakrabarty, D; Wu, C.H; Hahn, E.J; Jeon, W.K; Paek, K.Y. 2010. Influences of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on growth and secondary metabolite accumulation in *Panax ginseng* C.A. Meyer adventitious roots cultured in air-lift bioreactors. *S. Afr. J. Bot.* 76: 354-358.
65. Didry, N; Dubreuil, L; Trotin, F; Pinkas, M. 1998. Antimicrobial activity of aerial parts of *Drosera petalta* Smith on oral bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 60: 91–96.
66. Dornenburg, H; Knorr, D. 1994. Effectiveness of plant-derived and microbial polysaccharides as elicitors for anthraquinone synthesis in *Morinda citrifolia* cultures. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1048-1052.
67. Erwin, D.C; Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora nicotianae* = *Phytophthora parasitica*. In: *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA. pp: 391-407.
68. Fabri, R.L; Nogueira, M.S; Braga, F.G; Coimbra, E.S; Scio, E. 2009. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresour. Technol.* 100: 428–433.
69. Falcón, A.B; Costales, D; Ortega, E; León, O; Cabrera, J.C; Martínez, M.A. 2007. Evaluation of chitosan as an inhibitor of soil-borne pathogens and as an elicitor of defense markers and resistance in tobacco plants. *Span. J. Agric. Res.* 5: 533-541.
70. Farzami-Sepehr, M; Ghorbanli, M. 2002. Effects of nutritional factors on the formation of Anthraquinones in callus cultures of *Rheum ribes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 68: 171–175.
71. Flors, V; Miralles, M.C; González-Bosch, C; Carda, M; García-Agustín, P. 2003. Induction of protection against the necrotrophic pathogens *Phytophthora citrophthora* and *Alternaria solani* in *Lycopersicon esculentum* Mill. by a novel synthetic glycoside combined with amines. *Planta.* 216: 929–938.
72. Gachande, B.D. 2009. Efficacy of plant extracts on *Alternaria solani* causing early blight in tomato (*Lycopersicon esculantum* Mill). *Bioinfolet.* 6: 353-355.

73. Galindo, F; Kabir, N; Gavrilovic, J; Russell, D.A. 2008. Spectroscopic studies of 1,2-diaminoanthraquinone (DAQ) as a fluorescent probe for the imaging of nitric oxide in living cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* 7: 126-130.
74. Gamborg, O.L; Millar, R.A; Ojima K. 1960. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 15–18.
75. García, V; Mena, E.C; Santana, N; Hernández, B. 2002. Nuevas variedades de tabaco negro, productores de capas y capotes, resistentes a las principales enfermedades. *Cuba Tabaco.* 3: 48-53.
76. George, E. F; Hall, M.A; De Klerk, G.J. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd edition. Chapter 3. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. Published by Springer (ed). The Netherlands. Exegetics Ltd. pp: 65-113.
77. Georgiev, M; Heinrich, M; Kerns,T, G; Pavlov, BleyA. 2006. Production of iridoids and phenolics by transformed *Harpagophytum procumbens* root cultures. *Eng. Life. Sci.* 6(6): 593–596.
78. Gevrenova, R; Stancheva, T; Voynikov, Y; Laurain-Mattarb, D; Henry, M. 2010. Root in vitro cultures of six *Gypsophila* species and their saponin contents. *Enzyme Microb. Technol.* 47: 97–104.
79. Ghosh, L; Gayen, J.R; Sinha, S; Pal, S; Pal, M; Saha, B.P. 2003. Antibacterial efficacy of *Rumex nepalensis* Spreng. roots. *Phytother. Res.* 17: 558–559.
80. Gibbons, S. 2005. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem. Rev.* 4: 63–78.
81. Giridhar, P; Rajasekaran, T; Ravishankar, G.A. 2005. Production of a root-specific flavour compound, 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde by normal root cultures of *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn (*Asclepiadaceae*). *J. Sci. Food. Agr.* 85: 61-64.
82. Godard, S; Slacanin, I; Viret, O; Gindro, K. 2009. Induction of defense mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 827-837.
83. Gould, D; Booker, 2000. *Applied Microbiology for Nurses*. Aardvark (ed.). Mcndham, Suffolk, London. pp: 75-94.

84. Guo, H; Chang, Z; Yang, R; Guo, D; Zheng, J. 1998. Anthraquinones from hairy root cultures of *Cassia obtusifolia*. *Phytochemistry*. 49: 1623-1625.
85. Hadrami, A.E; Adam, L. R; Hadrami, I.E; Daayf, F. 2010. Chitosan in Plant Protection. *Mar. Drugs*. 8: 968-987.
86. Hagendoorn, M.J.M; Plas, L.H.W; Van der Segers, G.J. 1994. Accumulation of anthraquinones in *Morinda citrifolia* cell suspensions. A model system for the study of the interaction between secondary and primary metabolisms. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38: 227–237.
87. Han, Y.S; Van der Heijden, R; Verpoorte, R. 2001. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of the *Rubiaceae*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 201–220.
88. Han, Y.S; Van der Heijden, R; Lefeber, A.W.M; Erkelens, C; Verpoorte, R. 2002a. Biosynthesis of anthraquinones in cell cultures of *Cinchona Robusta* proceeds via the methylerytritol 4-phosphate pathway. *Phytochemistry*. 59: 45-55.
89. Han, Y.S; Van der Heijden, R; Verpoorte R. 2002b. Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona Robusta* by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors. *Biotechnol. Lett.* 24: 705-710.
90. Han, Y.S; Hofte, B; Van der Heijden, R; Verpoorte, R. 2003. Analysis of anthraquinones in cell cultures of *Cinchona robusta* by HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochem. Anal.* 14: 298-305.
91. Harkes, P.A.A; Krijbolder, L; Libbenga, K.R; Wijnsma, R; Aremge, T.N; Verpoorte, R. 1985. Influence of various media constituents on growth of *Cinchona ledgeriana* tissue cultures and the production of alkaloids and anthraquinones therein. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4: 199–214.
92. Harman, G.E; Howell, C.R; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43–56.
93. Hassanein, N.M; Abou Zeid, M.A; Youssef, K.A; Mahmoud, D.A. 2008. Efficacy of leaf extracts of neem (*Azadirachta indica*) and chinaberry (*Melia azedrach*) against early blight and wilt diseases of tomato. *Aust. J. Basic appl.sci.* 2: 763-772.
94. Hawkey, B.M. 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ.* 317: 657-660.

95. Hazra, B; Sarma, M; Sanyal, U. 2004. Separation methods of quinonoid constituents of plants used in Oriental traditional medicines. *J. Chromatogr. B.* 812: 259–275.
96. He, Z.H; He, M.F; Ma, S.C; But, P.P.H. 2009. Anti-angiogenic effects of rhubarb and its anthraquinone derivatives. *J. Ethnopharmacol.* 121: 313–317.
97. Hernández, J; Volpato, G. 2004. Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J. Ethnopharmacol.* 90: 293–316.
98. Herrero, M; Cifuentes, A; Ibañez E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chem.* 98: 136-148.
99. Hidalgo, J.A; Vázquez, J.A. 2008. Candidiasis, emedicine from WebMD, on line: <http://emedicine.medscape.com/article/213853-overview>. Consultado el 11 de Agosto 2010.
100. Hou, Y; Cao, S; Brodie, P.J; Callmander, M.W; Ratovoson, F; Rakotobe, E; Rasamison, V.E ; Ratsimbason, M; Alumasa, J.N. 2009. Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 2871–2876.
101. Igbavboa, U; Sieweke, H.J; Leistner, E; Röwer, I; Hüsemann, W; Barz, W. 1985. Alternative formation of anthraquinones and lipoquinones in heterotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Morinda lucida* Benth. *Planta.* 166: 537–544.
102. Inoue, K; Nayeshiro, N.A; Inouye, H; Zenk, M. 1981. Anthraquinone in cell suspensions cultures of *Morinda citrifolia*. *Phytochemistry.* 20: 1693-1700.
103. Ismail, N; Ali, A; Aimi, N; Kitajima, M; Takayama, H; Lajis, N. 1997. Anthraquinones from *Morinda elliptica*. *Phytochemistry.* 45: 1723-1725.
104. Itako, A.T; Schwan-Estrada, K.R.F; Júnior, T; Stangarlin, J.R; da Silva Cruz, M.E. 2008. Antifungal activity and protection of tomato plants by extracts of medicinal plants. *Trop. plant pathol.* 33: 241-244.
105. Izhaki, I. 2002. Emodin a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytol.* 155: 205–217.
106. Jaarsveld, E; Wingfield, M; Drenth, A. 2002. Effect of metalaxyl resistance and cultivar resistance on control of *Phytophthora nicotianae* in tobacco. *Plant Dis.* 86: 362-366.

107. Jacob, A; Malpathak, N. 2005. Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 247–257.
108. Jain, N; Light, M.E ; van Staden, J. 2008. Antibacterial activity of hairy-root cultures of *Maytenus senegalensis*. *South African Journal of Botany.* 74: 163–166.
109. James, D.B; Abu, E.A; Wurochekke, A.U; Orji, G.N. 2007. Phytochemical and antimicrobial investigation of the aqueous and methanolic extracts of *Ximenia americana*. *J. Med. Sci.* 7: 284-288.
110. Jiménez, E; Reyes, C; Peña, Pablo; Pérez, N; Capote, A; Pérez, A. 2005. Propagación in vitro de *Morinda royoc* en medios de cultivo semisólidos y sistemas de inmersión temporal. *Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005)*. Centro de Bioplantás. ISBN: 959-16-0300-2. pp: 237-242.
111. Kamiya, K; Hamabe, W; Tokuyama, S; Hirano, K; Satake, T; Kumamoto-Yonezawa Y; Yoshida, H. Mizushina, Y. 2010. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chem.* 118: 725–730.
112. Kanokmedhakul, K; Kanokmedhakul, S; Phatchana, R. 2005. Biological activity of anthraquinones and triterpenoids from *Prismatomeris fragrans*. *J. Ethnopharmacol.* 100: 284–288.
113. Kaur, P; Singh, B; Kumar, S; Kaur, S. 2008. *In vitro* evaluation of free radical scavenging activity or *Rubia cordifolia* L. *J. Chin. Clin. Med.* 3: 278-284.
114. Kaur, P; Chandel, M; Kumar, S; Kumar, N; Singh, B; Kaur, S. 2010. Modulatory role of alizarin from *Rubia cordifolia* L. against genotoxicity of mutagens. *Food Chem. Toxicol.* 48: 320–325.
115. Khouri, H; Ibrahim, R.K; Rideau, M. 1986. Effects of nutritional and hormonal factors on growth and production of anthraquinone glucosides in cell suspension cultures of *Cinchona succirubra*. *Plant Cell Rep.* 5: 423–426.
116. Kiathevast, K; Goto, M; Sasaki, M; Pavasant, P; Shotipruk, A. 2009. Extraction and concentration of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia* by non-ionic surfactant solution. *Sep. Purif. Technol.* 66: 111–117.

117. Kil, H.Y; Seong, E.S; Ghimire, B.K; Chung, I.M; Kwon, S.S; Goh, E.J; Heo, K; Kim, M.J; Lim, J.D; Lee, D; Yu, C.Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem.* 115: 1234–1239.
118. Kim, M.K; Choi, G.J; Lee, H.S. 2003. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived Curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1578-1581.
119. Kim, Y; Wyslouzil, B; Weathers, P. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cell. Dev-Plant. Biol.* 38: 1–10.
120. Kim, Y.M; Lee, C.H; Kim, H.G; Lee, H.S. 2004. Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seeds show an antifungal property against phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6096–6100.
121. Kitajima, M; Fischer, U; Nakamura, M; Ohsawa, M; Ueno, M; Takayama, H; Unger, M; Stockigt, J; Aimi, N. 1998. Anthraquinones from *Ophiorrhiza pumila* tissue and cell cultures. *Phytochemistry.* 48: 107–111.
122. Koch, E; Schmitt, A; Stephan, D; Kromphardt, C; Jahn, M; Krauthausen, H.J; Forsberg, G; Werner, S; Amein, T; Wright, S.A.I; Tinivella, F; Gullino, M.L; Roberts, S.J; Wolf, J.V.D; Groot, S.P.C. 2010. Evaluation of non-chemical seed treatment methods for the control of *Alternaria dauci* and *A. radicina* on carrot seeds. *Eur. J. Plant Pathol.* 127: 99–112.
123. Koehn, F.E. 2008. High impact technologies for natural product screening. *Prog Drug Res.* 65: 177-210.
124. Kolewe, M.E; Gaurav, V; Roberts, S.C. 2008. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol. Pharmaceutics.* 5: 243-256.
125. Komaraiah, P; Kavi, P.B; Carlsson, M; Magnusson, K.E; Mandenius, C.F. 2005. Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Sci.* 168: 1337–1344.
126. Konstandinidou-Doltsinis, S; Markellou, E; Kasselaki, A.M; Siranidou, E; Kalamarakis, A; Tzembelikou, K; Schmitt, A; Koumakis, C; Malathrakis, N. 2007. Control of powdery mildew of grape in Greece using Sporodex (R) L and Milsana (R). *J. Plant Dis. Prot.* 114: 256–262.

127. Kowalewski, A. 1993. Investigations about the chemical nature and the mode of action of the resistance inducing ingredients from *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai. In *Mechanisms of Plant Defense Response*, ed. by Fritting B and Legrand M. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 182.
128. Krolicka, A; Szpitter, A; Gilgenast, E; Romanik, G; Kaminski, M; Lojkowska, E. 2008. Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown *in vitro* by addition of elicitors. *Enzyme Microb. Technol.* 42: 216–221.
129. Kuczkiewicz, M; Kokotkiewicz, A. 2005. Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens. *Plant Sci.* 169: 862-871.
130. Kuete, V; Nguemeving, J.R; Beng, V.P; Blaise Azebaze, A.G; Etoa, F.X; Meyer, M; Bodo, B; Nkengfack. A.E. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *J. Ethnopharmacol.* 109: 372–379.
131. Kuete, V; Tsafack, A; Tsaffack, M; Beng, V.P; Etoa, F.X; Nkengfack, A.E; Meyer, M; Lall, N. 2008. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae). *J. Ethnopharmacol.* 115: 494–501.
132. Kutney, J.P; Pérez, I. 2004. Studies on Natural Products from Cuban Plants. Alkaloids from *Tabernaemontana citrifolia*. *Helv. Chim. Acta.* 65: 2242-2250.
133. Kuzma, L; Bruchajzer, E; Wysokinska, H. 2009. Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.* 44: 406–410.
134. Latha, P; Anand, T; Ragupathi, N; Prakasam, V; Samiyappan, R. 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control.* 50: 85-93.
135. Lebeda, A; Luhová, L; Sedlářová, M; Jancová, D. 2001. The role of enzymes in plant–fungal pathogens interactions. *J. Plant Dis. Prot.* 108: 89–111.
136. Lee, H.S. 2007. Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Bioresour. Technol.* 98: 1324–1328.

137. Lee, S.J; Ahn, J.K; Khanth, T.D; Chun, S.Ch; Kim, S.L; Ro, H.M; Song, H.K; Chung, I.M. 2007. Comparison of isoflavone concentrations in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions. *J. Agric. Food Chem.* 55: 9415–9421.
138. Leistner, E. 1973. Biosynthesis of morindone and alizarin in intact plants and cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Phytochemistry.* 12: 1669-1674.
139. Leistner, E. 1995 XVI *Morinda* species: Biosynthesis of quinones in cell cultures. In: Bajaj, YPS (ed) *Biotechnology In Agriculture And Forestry, Medicinal And Aromatic Plants* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg VIII Vol. 33. pp 296–307.
140. Li, A; Zhu, Y; He, X; Tian, X; Xu, L; Ni, W; Jiang, P. 2007. Evaluation of antimicrobial activity of certain Chinese plants used in folkloric medicine. *World J Microbiol. Biotechnol.* 24: 569–572.
141. Li, X; Liu, Z; Chen, Y; Wang, L.J; Zheng, Y.N; Sun, G.Z; Ruan, C.C. 2009. Rubiacordone A: A new anthraquinone glycoside from the Roots of *Rubia cordifolia*. *Molecules.* 14: 566-572.
142. Lichtenthaler, H.K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoids biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 47–65.
143. Likhitwitayawuid, K; Dejadisai, S; Jongbunprasert, V; Krungkrai, J. 1999. Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliora*, *Diospyros Montana*, and *Murraya siamensis*. *Planta Med.* 65: 754–756.
144. Liu, Ch-Zh; Guo, Ch; Wang, Y-Ch; Ouyang, F. 2002. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. *Process Biochem.* 38: 581-585.
145. Liu, S.Y; Lo, C.T; Chen, C; Liu, M.Y.; Chen, J.H.; Peng, K.C. 2007. Efficient isolation of anthraquinone-derivatives from *Trichoderma harzianum* ETS 323. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70: 391–395.
146. Liu, S.Y; LO, C.T; Shibu, M; Leu, Y.L; Jen, B.Y; Peng, K.C. 2009. Study on the anthraquinones separated from the cultivation of *Trichoderma harzianum* Strain Th-R16 and their biological activity. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7288–7292.

147. López-Laredo, A.R; Ramírez-Flores, F.D; Sepúlveda-Jiménez, G; Trejo-Tapia, G. 2009. Comparison of metabolite levels in callus of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth cultured in photoperiod and darkness. *In Vitro Cell. Dev-Plant.* 45: 550–558.
148. Lu, M.B; Wong, H.L; Teng, W.L. 2001. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* 20: 674–677.
149. Lucchesini, M; Bertoli, A; Mensuali-Sodi, A; Pistelli, L. 2009. Establishment of *in vitro* tissue cultures from *Echinacea angustifolia* D.C. adult plants for the production of phytochemical compounds. *SCI Hortic-Amsterdam.* 122: 484–490.
150. Luczkiewicz, M; Gold, D. 2003. Callus cultures of genista plants: *In vitro* material producing high amounts of isoflavones of phytoestrogenic activity. *Plant Sci.* 165: 1101–1108.
151. Ludwig-Muller, J; Georgiev, M; Bley, T. 2008. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. *Process Biochem.* 43: 15–23.
152. Ma, X; Yang, X; Zeng, F; Yang, L; Yu, D; Ni, H. 2010. Physcion, a natural anthraquinone derivative, enhances the gene expression of leaf-specific thionin of barley against *Blumeria graminis*. *Pest. Manag. Sci.* 66: 718-724.
153. Mantrova, O.V; Dunaeva, M.V; Kuzovkina, I.N; Schneider, B; Müller-Uri, F. 1999. Effect of methyl jasmonate on anthraquinone biosynthesis in transformed madder roots. *Russ. J. Plant Physiol.* 46: 276–279.
154. Marie, Ch; White, T.C. 2009. Genetic basis of antifungal drug resistance. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 3: 163-169.
155. Marzouk, B; Marzouk, Z; Décor, R; Edziri, H; Haloui, E; Fenina, N; Aouni, M. 2009. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. *J. Ethnopharmacol.* 125: 344–349.
156. Matkowski, A. 2004. *In vitro* isoflavonoid production in callus from different organs of *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi. *J. Plant Physiol.* 161: 343–346.
157. Matkowski, A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. *Biotechnol. Adv.* 26: 548–560.

158. McChesney, J.D; Venkataraman, S.K; Henri, J.T. 2007. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. *Phytochemistry*. 68: 2015–2022.
159. Mdee, L.K; Masoko, P; Eloff, J.N. 2009. The activity of extracts of seven common invasive plant species on fungal phytopathogens. *South African Journal of Botany*. 75: 375–379.
160. Meazza, G; Dayan, F.E; Wedge, D.E. 2003. Activity of Quinones on *Colletotrichum* Species. *J. Agric. Food Chem*. 51: 3824-3828.
161. Melo, M.J. 2009. History of Natural Dyes in the Ancient Mediterranean World. En. *Handbook of Natural Colorants* Edited by Thomas Bechtold and Rita Mussak. John Wiley & Sons, Ltd. pp: 4-15.
162. Mendoza, C.B; Moreno, M.N; Weil, M; Elango, F. 2007. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Phytophthora palmivora* Butl y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. *Tierra Tropical*. 3: 81-89.
163. Mendoza, L; Araya-Maturana, R; Cardona, W; Delgado-Castro, T; García, C; Lagos, C; Cotoras, M. 2005. *In vitro* sensitivity of *Botrytis cinerea* to anthraquinone and anthrahydroquinone derivatives. *J. Agric. Food Chem*. 53: 10080-10084.
164. Misawa, M. 1994. *Plant Tissue Culture: an alternative for production of useful metabolites*. FAO Agricultural Services. Bulletin, No. 108: pp.87.
165. Mishchenko, N.P; Fedoreev, S.A; Bryukhanov, V.M; Zverev, Y.F; Lampatov, V.V; Azarova, O. V; Shkryl, Y.N; Chernoded, G.K. 2007. Chemical composition and pharmacological activity of anthraquinones from *Rubia cordifolia* cell culture. *Pharm. Chem. J*. 41: 605-609.
166. Mishra, B.B; Kishore, N; Tiwari, V.K; Singh, D.D; Tripathi, V. 2010. A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa (family Rutaceae). *Fitoterapia*. 81: 104-107.
167. Molina-Torres, J; Salazar-Cabrera, C.J; Armenta-Salinas, C.N; Ramirez-Chávez, E. 2004. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. *J. Agric. Food Chem*. 52: 4700-4704.
168. Moore, G.E; Gerner, R.E; Franklin, H.A. 1967. Culture of normal human leukocytes. *JAMA*. 199: 519-524.

169. Mulabagal, V; Tsay, H.S. 2004. Plant Cell Cultures - An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2: 29-48.
170. Muller-Riebau, F; Berger, B; Yegen, O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 43: 2262–2266.
171. Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
172. Nakanishi, F; Nagasawa, Y; Caballa, Y; Sekimoto, H; Shimomura, K. 2005. Characterization of lucidin formation in *Rubia tinctorum* L. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 921–928.
173. Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. *Phcog. Rev.* 1: 69-79.
174. Narayan, M.S; Thimmaraju, R; Bhagyalakshmi, N. 2005. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochem.* 40: 351-358.
175. Nazif, N.M; Rady, M.R; Seif El-Nasr, M.M. 2000. Stimulation of anthraquinone production in suspension cultures of *Cassia acutifolia* by salt stress. *Fitoterapia.* 71: 34-40.
176. Nuñez, S.C; Agnese, A.M; Pérez, C; Tiraboschi, I.N; Cabrera, J.L. 2003. Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomedicine.* 10: 569–574.
177. Nuñez, S.C; Comino, L; Sarmiento, M; Becerra, C; Albesa, I; Arguello, G.A; Cabrera, J.L. 2005. Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *J. Photoch. Photobio. B.* 78: 77–83.
178. Ogundare, A.O; Onifade, A.K. 2009. The antimicrobial activity of *Morinda lucida* leaf extract on *Escherichia coli*. *J. Med. Plants Res.* 3: 319-323.
179. Oliveira, M.C; Negri, G; Salatino, A; Braga, M.R. 2007. Detection of anthraquinones and identification of 1,4-naphthohydroquinone in cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides* (Cham.) Müll. Arg. (*Rubiaceae*). *Revista Brasil. Bot.* 30: 167-172.

180. Orbán, N; Boldizsár, I; Bóka, K. 2007. Structural and chemical study of callus formation from leaves of *Rubia tinctorum*. *Biol. Plantarum*. 51: 421-429.
181. Orbán, N; Boldizsár, I; Szucs, Z; Dános, B. 2008. Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. *Dyes Pigments*. 77: 249-257.
182. Pandey, R; Mishra, A. 2010. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. *Appl Biochem Biotechnol*. 160: 1356-1361.
183. Park, S; Lee, Y; Park, Y; Ahn, J.K. 2006. Effects of nitrogen source and bacterial elicitor on isoflavone accumulation in root cultures of *Albizia kalkora* (Roxb.) Prain. *J. Integr. Plant Biol*. 48: 1108–1114.
184. Park, S; Kim, Y; Lee, Y. 2009. Establishment of hairy root culture of *Rubia akane* Nakai for alizarin and purpurin production. *Scientific Research and Essay*. 4: 94-97.
185. Park, S; Lee, Y. 2009. Anthraquinone production by hairy root culture of *Rubia akane* Nakai: Influence of media and auxin treatment. *Scientific Research and Essay*. 4: 690-693.
186. Park, Y.H. 1977. Part I: A phytochemical study of *Morinda roioe* L. (Family Rubiaceae). Part II: Alkaloids in aged potatoes, *Solanum tuberosum* L. (Family Solanaceae). Dissertation, Univ. of Mississippi. pp: 102.
187. Pavliak, M; Vacek, J; Klejdus, B; Kuban, V. 2007. Hypericin and hyperforin production in St. John's Wort *in vitro* culture: influence of saccharose, polyethylene glycol, methyl jasmonate, and *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Agric. Food Chem*. 55: 6147–6153.
188. Perassolo, M; Quevedo, C; Busto, V; Ianone, F; Giulietti, A.M; Rodriguez –Talou, J. 2007. Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Enzyme Microb. Technol*. 41: 181–185.
189. Pérez, A; Nápoles, L; Lorenzo, J.C; Hernández, M. 2003. Protease excretion during pineapple micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell. Dev-Plant*. 39:311-315.
190. Pérez-Alonso, N; Wilken, D; Gerth, A; Jahn, A; Nitzsche, H.M; Kerns, G; Capote-Pérez, A; Jiménez, E. 2009. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 99: 151-156.

191. Pitarokili, D.P; Tzakou, O; Loukis, A; Harvala, C. 2003. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3294–3301.
192. Prakash, G; Srivastava, A. 2008. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. *Biochem. Eng. J.* 40: 218–226.
193. Prasad, N.B.C; Gururaj, B.H; Kumar, V; Giridhar, P; Ravishankar, A.G. 2006. Valine pathway is more crucial than phenyl propanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in *Capsicum frutescens* Mill. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6660-6666.
194. Qian, Z.G; Zhao Z.J; Xu. Y; Qian, X; Zhong J.J. 2004. Novel chemically synthesized hydroxyl-containing jasmonates as powerful inducing signals for plant secondary metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* 86: 809–816.
195. Qiu, D; Pan, X; Wilson, I.W; Li, F; Liu, M; Teng, W; Zhang, B. 2009. High throughput sequencing technology reveals that the taxoid elicitor methyl jasmonate regulates microRNA expression in Chinese yew (*Taxus chinensis*). *Gene.* 436: 37–44.
196. Quevedo, C; Perassolo, M; Alechine, E; Corach, D; Giulietti, A.M; Rodriguez- Talou, J. 2010. Increasing anthraquinone production by overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase in transgenic cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Biotechnol. Lett.* 32: 997-1003.
197. Quiala, E; Barbón, R; Jimeénez, E; De Feria, M; Chávez, M; Capote, A; Pérez, N. 2006. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In Vitro Cell. Dev-Plant.* 42: 298–300.
198. Radman, R; Saez, T; Bucke, C; Keshavarz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37: 91–102.
199. Rahalison, L; Hamburger, M; Hostettmann, K. 1991. A Bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.* 2: 199-203.
200. Ramachandra, S; Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20: 101–153.

201. Ramos-Valdivia, A.C; Van der Heijden, R; Verpoorte, R. 1997a. Elicitor-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of *Cinchona robusta*. *Planta*. 203: 155–161.
202. Ramos-Valdivia, A.C; Van der Heijden, R; Verpoorte, R; Camara, B. 1997b. Purification and characterization of two isoforms of isopentenyl-diphosphate isomerase from elicitor-treated *Cinchona robusta* cells. *Eur. J. Biochem*. 249: 161–170.
203. Ramos-Valdivia, A.C; Van der Heijden, R; Verpoorte, R. 1998. Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyltransferase activities in Rubiaceous and Apocynaceous cultures. *Phytochemistry*. 48: 961-969.
204. Rath, G; Ndonzao, M; Hostettmann, K. 1995. Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*. *Int. J. Pharmacog*. 33: 107–114.
205. Reppert, A; Yousef, G; Rogers, R; Lila, M. 2008. Isolation of radiolabeled isoflavones from kudzu (*Pueraria lobata*) root cultures. *J. Agric. Food Chem*. 56: 7860–7865.
206. Ríos, J.L; Recio, M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol*. 100: 80–84.
207. Rivas, M; Borroto, J; Blanco, M; Hernández, M; Trujillo, R; Concepción, O. 2006. Meroterpenos en diferentes partes de la planta de *Morinda royoc* L. *Centro Agrícola*. 33: 65-69.
208. Rodríguez, J; Vegas, R; Penichet, M; Guerra, I; Nuñez, R. 1999. Caracterización de extractos de *M. royoc* L. para posible uso como materia prima en la elaboración de suplementos dietéticos. *Revista Alimentaria de Tecnología e Higiene de los Alimentos*. 302: 47-52.
209. Roig, J.T. 1965. *Diccionario Botánico de nombres vulgares cubanos*. La Habana. Cuba. Científico Técnico (ed.). pp. 792.
210. Roig, J.T. 1974. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. La Habana. Cuba. Científico Técnico (ed.). pp. 949.
211. Rosca-Casian, O; Parvu, M; Vlase, L; Tamas, M. 2007. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. *Fitoterapia*. 78: 219–222.

212. Saito, K; Sudo, H; Yamazaki, M; Koseki-Nakamura, M; Kitajima, M; Takayama, H; Aimi, N. 2001. Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*. *Plant Cell Rep.* 20: 267–271.
213. Sakunpak, A; Sirikatitham, A; Panichayupakaranant, P. 2009. Preparation of anthraquinone high-yielding *Senna alata* extract and its stability. *Pharm. Biol.* 47: 236–241.
214. Sakunphueak, A; Panichayupakaranant, P. 2010. Increased production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Bioresour. Technol.* 101: 8777–8783.
215. Sakuta, M; Komamine, A. 1987. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. En: Constabel, F.; Vasil, I. (ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press. USA. pp: 97-114.
216. Santos-Gomes, P.C; Seabra, R.M; Andrade, P.B; Fernandes-Ferreira, M. 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). *J. Plant Physiol.* 160: 1025–1032.
217. Sato, K; Yamazaki, T; Okuyama, E; Yoshihira, K; Shimomura, K. 1991. Anthraquinones production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum*: Influence of phytohormones and sucrose concentration. *Phytochemistry.* 30: 1507–1509.
218. Sato, K; Kubota, H; Goda, Y; Yamada, T; Maitani, T. 1997. Glutathione enhanced anthraquinone production in adventitious root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Biotechnol.* 14: 63–66.
219. Schmitt, A. 2006. Induced resistance with extracts of *Reynoutria sachalinensis*: crucial steps behind the scene. *Bulletin OILB/SROP*, International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBC/OILB), West Palaearctic Regional Section (WPRS/SROP), Dijon, France. pp: 85–90.
220. Schripsema, J; Ramos-Valdivia, A; Verpoorte, R. 1999. Robustaquinone, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. *Phytochemistry.* 51: 55-60.
221. Schulte, U; El-Shagi, H; Zenk, M.H. 1984. Optimization of 19 Rubiaceae species in cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*. *Plant Cell Rep.* 3: 51–54.

222. Scull, I; Cabrera, M.Y; Cabrera, I. 2000. Suplemento alimenticio de origen natural y su procesamiento de obtención. Instituto politécnico "Villenas Revolución" C. Habana. Cuba. Patente N° CU22628 A1.
223. Sepúlveda-Jiménez, G; Rueda-Benítez, P; Porta, H; Rocha-Sosa, M. 2005. A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 56: 605-611.
224. Sharma, B; Kumar, P. 2009. *In vitro* antifungal potency of some plant extracts against *Fusarium oxysporum*. *Int. J. Green. Pharm.* January-March: 63-65.
225. Shinde, A.N; Malpathak, N; Fulzele, D.P. 2009. Studied enhancement strategies for phytoestrogens production in shake flasks by suspension culture of *Psoralea corylifolia*. *Bioresour. Technol.* 100: 1833–1839.
226. Shinde, A.N; Malpathak, N; Fulzele, D.P. 2010. Determination of isoflavone content and antioxidant activity in *Psoralea corylifolia* L. callus cultures. *Food Chem.* 118: 128–132.
227. Shohael, A.M; Ali, M.B; Yu, K.W; Hahn, E.J; Islam, R; Paek, K.Y. 2006. Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Process Biochem.* 41: 1179–1185.
228. Shotipruk, A; Kiatsongserm, J; Pavasant, P; Goto, M; Sasaki, M. 2004. Pressurized hot water extraction of anthraquinones from the roots of *Morinda citrifolia*. *Biotechnol. Prog.* 20: 1872–1875.
229. Siddiqui, B.S; Sattar, F.A; Begum, S; Gulzar, T; Ahmad, F. 2007. Chemical constituents from the stems of *Morinda citrifolia* Linn. *Arch Pharm Res.* 30: 793-798.
230. Singh, D.N; Verma, N; Raghuvanshi, S; Shukla, P.K; Kulshreshtha, D.K. 2006. Antifungal anthraquinones from *Saprosma fragrans*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 4512–4514.
231. Singh, U; Pandey, V; Wagner, K; Singh, K. 1990. Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Can. J. Bot.* 68: 1354-1356.
232. Sivakumar, G; Yu, K.W; Paek, K.Y. 2005a. Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Eng. Life. Sci.* 5: 333-342.

233. Sivakumar, G; Yu, K.W; Paek, K.Y. 2005b. Biosafe ginseng: A novel source for human well-being. *Eng. Life Sci.* 5: 527-533.
234. Smeekens, S. 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 51: 49- 81.
235. Smetanska, I. 2008. Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 111: 187–228.
236. Son, J.K; Jung, S.J; Jung, J.H; Fang, Z; Lee, C.S; Seo, C.S; Moon, D.C; Min, B.S; Kim, M.R; Woo, M.H. 2008. Anticancer constituents from the roots of *Rubia cordifolia* L. *Chem. Pharm. Bull.* 56: 213-216.
237. Sottomayor, M; Lopes, I; Pereira, L.G; Barceló, A. 2004. Peroxidase and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochem. Rev.* 3: 159-171.
238. Spletzer, M.E; Enyedi, A.I. 1999. Salicylic Acid Induces Resistance to *Alternaria solani* in Hydroponically Grown Tomato. *Phytopathology.* 89: 722-725.
239. Sreekumar, S; Seeni, S; Pushpangadan, P. 1998. Production of 2-hydroxy 4-methoxy benzaldehyde using root cultures of *Hemidesmus indicus*. *Biotech. Lett.* 20: 631–635.
240. Sreekumar, S; Seeni, S; Pushpangadan, P. 2000. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* for cultivation and production of 2-hydroxy 4-methoxy benzaldehyde. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 62: 211–218.
241. Stalman, M; Koskamp, A.M; Luderer, R; Vernooij, J.H; Wind, J.C; Wullems, G.J; Croes, A.F. 2003. Regulation of anthraquinone biosynthesis in cell cultures of *Morinda citrifolia*. *J. Plant Physiol.* 160: 607-14.
242. Stermitz, F.R; Scriven, L.N; Tegos, G; Lewis, K. 2002. Two flavonols from *Artemisia annua* which potentiate the activity of berberine and norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* 68: 1140–1141.
243. Stern, J.L; Hagerman, A.E; Steinberg, P.D; Mason, P.K. 1996. Phorotannin– protein interactions. *J. Chem. Ecol.* 22: 1887–1899.
244. Strange, R.N; Scott, P.R. 2005. Plant diseases: a threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 83–116.

245. Suresh, K; Srinivas, P.V; Praveen, B; Hara, K; Suryanarayana, U; Madhusudana, J. 2003. Antimicrobial constituents from the rhizomes of *Rheum emodi*. *Phytochemistry*. 62. 203–207.
246. Suzuki, H; Matsumoto, T; Mikami, Y. 1984. Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinone by *Rubia cordifolia* plant cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* 48: 603–610.
247. Suzuki, H; Matsumoto, T; Mikami, Y. 1985. Effects of physical factors and surface active agents on the formation of anthraquinone by *Rubia cordifolia* cells in suspension culture. *Agric. Biol. Chem.* 48: 519–520.
248. Tabata, H. 2004. Paclitaxel production by plant cell culture technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 87: 1–23.
249. Taiz, L; Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*. 3rd edition. Chapter 19 Auxin: The Growth Hormone. Published by Sinauer Associates (ed). USA. pp: 422-460.
250. Tamokou, J.D; Kuate, J.R; Njateng, G.S.S; Mpetga-Simo, D.J; Njouendou, A.J; Tane, P; Amvam-Zollo, P.H. 2008. Antimicrobial activity of Dichloromethane-methanol (1:1 v/v) extract from the stem Bark of *Coula edulis* Bail. (Olacaceae). *Res. J. Microbiol.* 3: 414-422.
251. Tegegne G; Pretorius J.C. 2007. In vitro and in vivo antifungal activity of crude extracts and powdered dry material from Ethiopian wild plants against economically important plant pathogens. *BioControl*. 52: 877–888.
252. Terras, F.R; Schoofs, H.M; De Bolle, M.F; Van Leuven, F; Rees, S.B; Vanderleyden, J; Cammue, B.P; Broekaert, W.F. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301–15309.
253. Thomson, R.H. 1971. *Naturally Occurring Quinones* 2nd ed. Academia Press. USA. pp. 734.
254. Tinivella, F; Hirata, L.M; Celan, M.A; Wright, S.A.I; Amein, T; Schmitt, A; Koch, E; Van der Wolf, J.M; Groot, S.P.C; Stephan, D. 2009. Control of seed-borne pathogens on legumes by microbial and other alternative seed treatments. *Eur. J. Plant Pathol.* 123: 139–151.
255. Trejo, G; Rodríguez, M. 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales. *Interciencia*. 32: 669-674.

256. Trujillo, R; Concepción, O; Borroto, J; Blanco, M; Nápoles, L, Rivas, M; Carvajal, C; Pérez, A; Hernández, M; Scull, I. 2005. Efecto de diferentes auxinas en la acumulación de antraquinonas durante el cultivo de callos y segmentos nodales de vitroplantas de *Morinda royoc* L. Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005). Centro de Bioplantas. ISBN: 959-16-0300-2. 203-411.
257. Van der Plas, L.H.W; Eijkelboom, C; Hagendoorn, M.J.M. 1995. Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 43: 111–116.
258. Van Tegelen, L.J.P; Bongaerts, R.J.M; Croes, A.F; Verpoorte, R; Wullems, G.J. 1999. Isochorismate synthase isoforms from elicited cell cultures of *Rubia tinctorum*. *Phytochemistry*. 51: 263-269.
259. Vanisree, M; Lee, C.Y; Lo, S.F; Nalawade, S; Lin, C.Y; Tsay, H.S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22.
260. Vanisree, M; Tsay, H.S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source the production of biological important secondary metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2: 29-48.
261. Verpoorte, R; Contin, A; Memelink, J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 1: 13–25.
262. Vinale, F; Ghisalberti, E.L; Flematti, G; Marra, R; Lorito, M; Sivasithamparam, K. 2010. Secondary metabolites produced by a root-inhabiting sterile fungus antagonistic towards pathogenic fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 380–385.
263. Wang, C; Wu, J; Mei, X. 2001. Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 404–410.
264. Wayne, P.A. 2002a. National for Committee Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, approved standard, NCCLS document M27-A.
265. Wayne, P.A. 2002b. National for Committee Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In 12th informational Supplement M100–S12. NCCLS document M100–S12.

266. WHO. 2008. The world health report 2008. Primary health care. Now more than ever. Disponible en: http://www.who.int/entity/whr/2008/08_report_es.pdf Consultado 11 de Octubre 2010.
267. Wijnsma, R; Verpoorte, R. 1986. Anthraquinones in the Rubiaceae. Herz, W; Grisebach, H; Kirby, G.W; Tamm, Ch. (ed). En: Progress in the chemistry of organic natural products, Springer Verlag, Viena, New York. 49. pp: 79-149.
268. Wilken, D; Jiménez, E; Hohe, A; Jordan, M; Gómez, R; Schmeda, G; Gerth, A. 2005. Comparison of secondary metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. En: T. Hvos-Elf, W. Preil, (eds.) Liquid culture systems for *in vitro* plants propagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp: 525–538.
269. Wink, M; Alfermann, A.W; Franke, R; Wetterauer, B; Distl, M; Windhoevel, J; Krohn, O; Fuss, E; Garden, H; Mohagheghzadeh, A; Wildi, E; Ripplinger, P. 2005. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. Plant Genet. Resources. 3: 90–100.
270. Wu, S; Zu, Y; Wu, M. 2003. High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. J. Biotechnol. 106: 33-43.
271. Wurms, K; Labbé, C; Benhamou, N; Bélanger, R.R. 1999. Effects of Milsana and Benzothiadazole on the ultra-structure of powdery mildew haustoria on cucumber. Phytopathology. 89: 728–736.
272. Xiang, W; Song, Q.S; Zhang, H.J; Guo, S.P. 2008. Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*. Fitoterapia. 79: 501–504.
273. Yan, Q; Shi, M; Ng, J; Wu, J.Y. 2006. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Sci. 170: 853–858.
274. Yang, X; Yang, L; Wang, S; Yu, D; Ni, H. 2007. Synergistic interaction of physcion and chrysophanol on plant powdery mildew. Pest Manag. Sci. 63: 511–515.
275. Yang, X; Yang, L; Ni, H; Yu, D. 2008. Effects of physcion, a natural anthraquinone derivative, on the infection process of *Blumeria graminis* on wheat. Can. J. Plant. Pathol. 30: 391–396.

276. Yang, X; Ma, X; Yang, L; Yu, D; Qian, Y; Ni, H. 2009. Efficacy of *Rheum officinale* liquid formulation on cucumber powdery mildew. *Crop Prot.* 28: 1031–1035.
277. Yanwen, W; Wenyuan, G; Xiaohe, X; Yi, L. 2005. Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in *Rheum officinale* Baill on *Staphylococcus aureus* growth. *Thermochim. Acta.* 429: 167–170.
278. Yesil-Celiktas, O; Nartop, P; Gurel, A; Bedir, E; Vardar-Sukan, F. 2007. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli. *J. Plant Physiol.* 164: 1536-1542.
279. Yu, K.W; Gao, W.Y; Son, S.H; Paek, K.Y. 2000. Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mayer). *In Vitro Cell. Dev-Plant.* 36: 424-428.
280. Yu, K.W; Murthy, H.N; Hahn, E.J; Paek, K.Y. 2005. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. *Biochem. Eng. J.* 23: 53–56.
281. Zárate, R; Jaber-Vazdekis, N; Cequier-Sánchez, E; Gutiérrez-Nicolás, F; Ravelo, A. 2008. Biotechnology for the production of plant natural products. En: *Studies in Natural Products Chemistry*, (ed.) Elsevier Science Publishers, The Netherlands. vol. 34. pp: 309-392.
282. Zenk, M.H; El-Shagi, H; Schulte U. 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med. Suppl.* 79-101.
283. Zhao, J; Zhu, W.H; Hu, Q. 2001. Selection of fungal elicitors to increase indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* suspension cell culture. *Enzyme Microb. Technol.* 28: 666–672.