



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Modalidad tradicional)

TESIS

**ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE
PIGMENTOS BETALAÍNICOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS**

PRESENTA

NOÉ ISRAEL CONTRERAS OVALLE

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

TUTOR

DR. EUGENIO MARTÍN PÉREZ MOLPHE BALCH

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

DRA. MARÍA DEL SOCORRO SANTOS DÍAZ

DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN

Aguascalientes, Ags. A 9 de Marzo del 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **NOÉ ISRAEL CONTRERAS OVALLE** con ID 115763 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS BETALAÍNICOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de noviembre de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'EPMB'.

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch
Tutor de tesis

c.c.p. - Interesado
c.c.p. - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p. - Jefatura del Depto. de Química
c.c.p. - Consejero Académico
c.c.p. - Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado del estudiante **NOÉ ISRAEL CONTRERAS OVALLE** con ID 115763 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS BETALAÍNICOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de noviembre de 2017

Dra. María del Socorro Santos Díaz
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaria de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de _____
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como Miembro del Comité Tutorial designado del estudiante **NOÉ ISRAEL CONTRERAS OVALLE** con ID 115763 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS BETALAÍNICOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de noviembre de 2017.


Dr. Juan Jauregui Rincón
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

NOÉ ISRAEL CONTRERAS OVALLE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS BETALAÍNICOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE CACTÁCEAS"** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 12 de Marzo de 2019

"Se lumen proferre"

EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



"Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"
Editorial del Colegio de Postgraduados

Revista Agrociencia

SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA
Y PESQUERÍA FEDERAL



7 de febrero de 2019

DR. EUGENIO PÉREZ MOPHE-BALCH

eperezmb@correo.uaa.mx

Por este conducto comunico a usted que la contribución con clave: 18-128 intitulada: **EFFECT OF CULTURE MEDIA ON THE PRODUCTION OF BETAAINS FROM HAIRY ROOT CULTURES OF FOUR CACTI SPECIES**, cuyos autores son: Noé Israel **Contreras-Ovalle**, Juan **Jáuregui-Rincón**, María del Socorro **Santos-Díaz**, Eugenio **Pérez-Molphe-Balch**, se encuentra aceptada para publicación.

DR. SERGIO S. GONZALEZ MUÑOZ

DIRECTOR DE AGROCIENCIA

SSGM/yfm

Tlafoc Kochila.

• Oficina Central • Carretera # 8, Esquina Avenida Hidalgo •
• 56210, San Luis Huastla, Tlaxcala, Estado de México •
• 01(2095) 928.4427 • 01(2095) 928.4013 •

• Colegio de Postgraduados • Campus Montedfilo • Estadística •
• Carretera México-Texcoco, Km. 36.5, 58750, Montedfilo •
• Texcoco, Estado de México •

• Apartado Postal 199, 56100, Texcoco •
• Apartado Postal 58, 56210, Chapingo •
• editorialcpic@cpes.mx •

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado, que permitió mejorar mi nivel académico y mi calidad de vida, y a la vez me brindó la oportunidad de servir a mi país y mejorar mi entorno.

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes** por su **programa de Doctorado en Ciencias Biológicas**, su **Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Edif. 207)**, sus instalaciones y equipos de alta calidad, y sus apoyos estudiantiles, que permitieron el desarrollo y buen término de mi proyecto de tesis.

Al **Laboratorio de Toxicología y Farmacología (Edif. 202)**, y al **Laboratorio de Química (Edif. 204A)** de esta universidad, por las facilidades y el apoyo otorgado para utilizar algunos de sus equipos e instalaciones.

A mi tutor, el **Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**, por su apoyo, su paciencia, y las facilidades para desarrollar este proyecto; es un gran ejemplo de trabajo y ética, una excelente persona y un gran investigador.

A la **Dra. María del Socorro Santos Díaz**, por su apoyo y excelentes consejos, su gran capacidad de análisis y su disciplina, son excelentes herramientas que llevaré conmigo.

Al **Dr. Juan Jáuregui Rincón**, por su gran ayuda y consejos para enriquecer y sacar adelante este proyecto; aprecio su objetividad, su buena disposición y actitud.

A la **Dra. Alejandra Palomeque Carlín**, por los materiales de trabajo que amablemente me proporcionó para la realización de este proyecto, por sus enseñanzas, su amistad y su apoyo incondicional.

A la **Dra. Angélica Hernández Quintero** por el apoyo que me proporcionó en el manejo estadístico de datos, para lograr una mejor comprensión de los resultados.

A mis **Maestros y maestras** de los diferentes cursos del doctorado, ya que sin su enseñanza, consejo y apoyo no hubiera sido posible alcanzar esta meta.

A mi esposa **Becky Eunice Torres García** por creer en mí, por su paciencia y perseverancia, por su cariño y todo el apoyo que me brindó durante este proyecto. Me ha vuelto a demostrar que todo lo que uno se propone, puede hacerse realidad.

A mis hijas **Ariadna Elizabeth y Diana Estefanía**, por regalarme su alegría y su cariño, y sobre todo por su gran comprensión y paciencia. He aprendido a ser mejor padre, a vivir la vida y sobre todo, me han enseñado que nunca se deja de aprender.

A mis padres **José Francisco Contreras y María de Jesús Ovalle Romo**, por su apoyo incondicional, sus consejos, su cariño y los ánimos que me dieron durante este proyecto.

Al **Prof. Emilio Humberto Torres Márquez** y a su esposa **Beatriz García López**, y a mis hermanos **Rocío, Carmen y Julio**, por su ayuda desinteresada y por sus palabras de ánimo para apoyarme a sacar adelante esta gran empresa.

A **Shantal, Leobardo, Isaac, Marthita, Adilene, Lupita** y demás compañeros de laboratorio, por su amistad y su gran apoyo. Con ustedes aprendí que la colaboración y la buena actitud son la clave para tener un ambiente de trabajo agradable. Les deseo sinceramente mucha suerte en sus proyectos de vida y en su ámbito profesional.

A mis **Compañeros de doctorado**, por su amistad y por todos los momentos y consejos que compartimos para sacar adelante nuestros respectivos proyectos. Mucho ánimo y buena suerte en los proyectos que emprendan.

Finalmente, A **Dios**, por permitirme llevar a buen término este proyecto y mejorar día con día como persona, no solo cultivando la sabiduría y el conocimiento, sino también fortaleciendo el espíritu y la fe.

DEDICATORIAS

A mi querida esposa Becky,

Ya que por ti he vuelto a creer que la magia existe; pues esta aventura entre plantas y paisajes maravillosos, creó momentos mágicos e inolvidables a tu lado...

A mis hijas Ariadna y Estefanía,

Ya que de ustedes he aprendido que no todo es trabajar, sino que hay que divertirse en la vida y aprovecharla totalmente, jugando, sonriendo y disfrutando el tiempo y lo que haces, día con día.

A mis Padres,

Ya que su ejemplo y su firme confianza en mí, me han inspirado a llegar muy lejos, más allá de lo que alguna vez imaginé...

ÍNDICE GENERAL

Título	Página
ACRÓNIMOS.....	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
1. ANTECEDENTES	16
1.1. Colorantes	16
1.1.1. Colorantes naturales.....	16
1.1.2. Colorantes inorgánicos.....	17
1.1.3. Colorantes sintéticos.....	17
1.1.4. Perspectivas sobre el uso de colorantes.....	18
1.2. Biotecnología vegetal en la obtención de colorantes naturales.....	19
1.2.1. Pigmentos como fuente de colorantes naturales.....	19
1.2.2. Cultivo <i>in vitro</i>	21
1.2.3. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales <i>in vitro</i>	22
1.2.4. Cultivo de raíces transformadas para la obtención de metabolitos.....	25
1.2.5. Biorreactores utilizados para el cultivo de raíces.....	28
1.3. Panorama actual de los pigmentos betalaínicos.....	31
1.3.1. Determinación de betalaínas en plantas	32
1.3.2. Cactáceas: fuente potencial de betalaínas	35
1.3.3. Cactáceas utilizadas en esta investigación	38
2. JUSTIFICACIÓN.....	44
3. HIPÓTESIS	45
4. OBJETIVOS.....	46
4.1. Objetivo General	46
4.2. Objetivos específicos	46
4.3. Metas.....	46
5. METODOLOGÍA	47

5.1.	Metodología general de trabajo	47
5.2.	Material vegetal	48
5.2.1.	Mantenimiento y propagación del material vegetal	48
5.3.	Extracción y cuantificación de betalainas	49
5.4.	Perfil de extractos betalainicos por cromatografía en capa fina (TLC).....	50
5.5.	Cinéticas de crecimiento y producción de raíces transformadas de cactáceas.....	50
5.6.	Efecto del tipo de medio basal en la producción de betalainas en raíces transformadas de cactáceas (RTC).....	52
5.7.	Efecto que tienen diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la producción de betalainas en RTC	52
5.8.	Efecto de la adición de diferentes complejos nutritivos al medio, sobre la producción de betalainas en RTC	53
5.9.	Efecto de la adición de precursores de la ruta biosintética sobre la producción de betalainas en RTC.....	54
5.10.	Efecto de la luz sobre la producción de betalainas en RTC	55
5.11.	Efecto del estrés abiótico sobre la producción de betalainas en RTC	55
5.12.	Cultivo de RTC en biorreactores.....	56
5.13.	Análisis estadístico de datos	57
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
6.1.	Mantenimiento y propagación del material vegetal	58
6.2.	Cuantificación e identificación de betalainas en materiales de inicio	61
6.2.1.	Perfil de extractos betalainicos por TLC	64
6.3.	Cinéticas de crecimiento y producción de RTC	66
6.4.	Efecto del tipo de medio basal en la producción de betalainas en RTC	74
6.4.1.	Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalainicos.....	74
6.4.2.	Perfil de extractos betalainicos por TLC.....	83
6.5.	Efecto que tienen diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la producción de betalainas en RTC	87
6.5.1.	Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalainicos.....	87
6.5.2.	Perfil de extractos betalainicos por TLC	95
6.6.	Efecto de la adición de diferentes complejos nutritivos al medio, sobre la producción de betalainas en RTC	100

6.6.1.	Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos.....	100
6.6.2.	Perfil de extractos betalaínicos por TLC.....	107
6.7.	Efecto de la adición de precursores de la ruta biosintética sobre la producción de betalaínas en RTC.....	111
6.7.1.	Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos.....	111
6.7.2.	Perfil de extractos betalaínicos por TLC.....	116
6.8.	Efecto de la luz sobre la producción de betalaínas en RTC.....	118
6.8.1.	Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos.....	118
6.8.2.	Perfil de extractos betalaínicos por TLC.....	124
6.9.	Efecto del estrés abiótico sobre la producción de betalaínas en RTC.....	126
6.9.1.	Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos.....	126
6.9.2.	Perfil de extractos betalaínicos por TLC.....	133
6.10.	Cultivo de RTC en biorreactores.....	137
6.10.1.	Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos.....	137
7.	CONCLUSIONES.....	145
8.	GLOSARIO.....	149
9.	REFERENCIAS.....	154
10.	ANEXOS.....	160

ÍNDICE DE TABLAS

Título	Página
Tabla 1. Ventajas y desventajas de biorreactores utilizados en el cultivo de raíces.....	29
Tabla 2. Sistemas <i>in vitro</i> selectos, para producción de pigmentos betalaínicos.	34
Tabla 3. Tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal	53
Tabla 4. Tratamientos con complejos nutritivos	54
Tabla 5. Tratamientos con precursores de la ruta biosintética	54
Tabla 6. Concentración de betalaínas en raíces transformadas de cactáceas	61
Tabla 7. Factores de retardo (R_f) para diversos extractos betalaínicos.	66
Tabla 8. Resultados de cinéticas de crecimiento y producción de raíces transformadas de cactáceas.....	73
Tabla 9. Humedad (%) de raíces transformadas de cactáceas.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios	25
Figura 2. Estructura de los plásmidos Ri de <i>A. rhizogenes</i>	27
Figura 3. Sistemas de biorreactores usados para la producción de betalaínas.	30
Figura 4. Estructura química de betalaínas.	31
Figura 5. Ruta biosintética de las betalaínas	33
Figura 6. <i>Echinocactus platyacanthus</i>	38
Figura 7. <i>Escobaria chaffeyi</i>	39
Figura 8. <i>Mammillaria sphacelata</i> var. <i>sphacelata</i>	40
Figura 9. <i>Turbinicarpus laui</i>	41
Figura 10. <i>Turbinicarpus lophophoroides</i>	42
Figura 11. <i>Turbinicarpus pseudopectinatus</i>	43
Figura 12. Diagrama de flujo general.....	47
Figura 13. Diagrama de flujo del subproceso de análisis y selección.	48
Figura 14. Materiales con los que se inició el trabajo.....	58
Figura 15. Materiales con los que se inició el trabajo (continuación).	60
Figura 16. Barrido espectral de extractos betalaínicos	63
Figura 17. Barrido espectral de extractos betalaínicos (continuación).....	63
Figura 18. Cromatografía en capa fina para extractos betalaínicos.....	64
Figura 19. Placas cromatográficas con extractos betalaínicos.	65
Figura 20. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de <i>E. chaffeyi</i>	67
Figura 21. Gráfico de dispersión de contenido de betaxantinas-betacianinas para <i>E. chaffeyi</i>	68
Figura 22. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de <i>T. laui</i>	69
Figura 23. Relaciones entre variables para <i>T. laui</i>	69
Figura 24. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i>	70
Figura 25. Relaciones entre variables para <i>T. lophophoroides</i>	71

Figura 26. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus*.....72

Figura 27. Gráfico de dispersión de contenido de betaxantinas-betacianinas para *T. pseudopectinatus*.....72

Figura 28. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes medios de cultivo.75

Figura 29. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes medios de cultivo.....78

Figura 30. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoriodes* en diferentes medios de cultivo.....79

Figura 31. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes medios de cultivo.81

Figura 32. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes medios de cultivo.....84

Figura 33. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes medios de cultivo.....84

Figura 34. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes medios de cultivo.85

Figura 35. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes medios de cultivo.85

Figura 36. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal.....88

Figura 37. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal.90

Figura 38. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal.....92

Figura 39. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal.....94

Figura 40. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. 95

Figura 41. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. 96

Figura 42. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal..... 98

Figura 43. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal..... 99

Figura 44. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. 101

Figura 45. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos..... 102

Figura 46. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. 104

Figura 47. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. 105

Figura 48. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos..... 108

Figura 49. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. 109

Figura 50. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* y *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos..... 110

Figura 51. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con precursores de betalaínas. 112

Figura 52. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con precursores de betalaínas. 113

Figura 53. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con precursores de betalaínas. 115

Figura 54. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con precursores de las betalaínas..... 117

Figura 55. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con precursores de las betalaínas. 117

Figura 56. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con precursores de las betalaínas. 118

Figura 57. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* bajo diferentes condiciones de luminosidad. 119

Figura 58. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* bajo diferentes condiciones de luminosidad..... 120

Figura 59. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* bajo diferentes condiciones de luminosidad..... 122

Figura 60. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* bajo diferentes condiciones de luminosidad. 123

Figura 61. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *E. chaffeyi* y *T. laui* bajo diferentes condiciones de luminosidad. 124

Figura 62. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus* bajo diferentes condiciones de luminosidad..... 125

Figura 63. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico .. 127

Figura 64. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico .. 128

Figura 65. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico..... 129

Figura 66. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico..... 130

Figura 67. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico..... 132

Figura 68. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico 134

Figura 69. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico 134

Figura 70. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico 135

Figura 71. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico 136

Figura 72. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico 136

Figura 73. Índice de Crecimiento en Fresco y contenido de betalaínas en raíces transformadas de *T. lophophoroides* cultivadas en diferentes tipos de biorreactores 138

Figura 74. Biorreactores usados en el cultivo de raíces transformadas de *T. lophophoroides* y material obtenido 139

Figura 75. Raíces transformadas de *E. chaffeyi* cultivadas en biorreactor RITA y medio de cultivo obtenido. 140

Figura 76. Raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* cultivadas en biorreactor RITA. 141

ACRÓNIMOS

2IP: 2-isopentiladenina

AIA: Ácido indolacético

AIB: Ácido indolbutírico

ANA: Ácido naftalenacético

ANOVA: Análisis de varianza

B5: Medio de cultivo de Gamborg

B: Muestra testigo, blanco o control

BA: Benciladenina

BC: Betacianinas

BX: Betaxantinas

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas, por sus siglas en inglés

CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres, por sus siglas en inglés

CP: Coco en polvo

DKW: Medio de cultivo de Driver y Kuniyuki

DNA: Ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés

EB: Equivalentes de betanina

EI: Equivalentes de indicaxantina

EL: Extracto de levadura

EM: Extracto de malta

GPF: Ganancia en peso fresco

HC: Hidrolizado de caseína

Heller: Medio de cultivo de Heller

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución, por sus siglas en inglés

ICF: Índice de crecimiento en fresco, en inglés FGI: Fresh Growth Index

IUCN: Unión internacional para la conservación de la naturaleza y los recursos naturales, por sus siglas en inglés

LF: Luz fluorescente

LRA: Luz fotosintéticamente activa, Luz led roja:azul=1:8 ($\lambda = 620-630$ y $460-470$ nm)

MS: Medio de cultivo de Murashige y Skoog

MT: meta-Topolina

N6: Medio de cultivo de Chu

N: Nitrógeno

NOM: Norma oficial mexicana

O: Tejido no definido (masas celulares amorfas, parecidas a callo o raíces engrosadas)

OR: Tejido no definido con poca a moderada cantidad de raíces (morfología)

OS: Oscuridad

P: Prolina

PEG: Polietilenglicol

Pf: Peso fresco

PFF: Peso fresco final

PFI: Peso fresco inoculado al Inicio

pH: Potencial de hidrógeno

PP: Plátano en polvo

Ps: Peso seco

R: Raíces bien definidas (morfología)

RCVs: Reguladores de crecimiento vegetal

Rf: Factor de retención, por sus siglas en inglés

RITA: Reactor de inmersión temporal automatizado

RO: Raíces bien definidas con poca a moderada cantidad de tejido no definido (morfología)

RTC: Raíces transformadas de cactáceas

SEMARNAT: Secretaría de medio ambiente y recursos naturales

snm: Sobre el nivel del mar

T: Tirosina

TA: Biorreactor tipo tanque agitado

Td: Tiempo de duplicación

T-DNA: Ácido desoxirribonucleico de transferencia, por sus siglas en inglés

TLC: Cromatografía en capa fina, por sus siglas en inglés

UV: Ultravioleta

White: Medio de cultivo de White

WV3: Medio de cultivo de Coke

μ: Velocidad específica de crecimiento

RESUMEN

Estudio de los factores que afectan la producción de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de cactáceas

El uso de pigmentos naturales en diversos productos ha mostrado beneficios a la salud. Los pigmentos betalaínicos que se encuentran en las cactáceas y otras plantas, tienen gran interés por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. En este trabajo, se estudiaron las raíces transformadas de cuatro especies de cactáceas: *Escobaria chaffeyi*, *Turbincarpus laui*, *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus*, y se evaluó la influencia de diferentes factores sobre la acumulación de biomasa y la producción de pigmentos betalaínicos. Se evaluó el diferente medio de cultivo, la adición al medio de reguladores de crecimiento, de complejos nutritivos y de precursores de la ruta biosintética, la inducción de estrés, el cultivo bajo diferentes condiciones de luminosidad, y el uso de dos tipos de biorreactores. Los resultados mostraron que los medios de cultivo ricos en nitrógeno (MS, N6, DKW o B5) favorecían la acumulación de biomasa, y que el uso de luz fluorescente favorecía la acumulación de biomasa y la de pigmentos betalaínicos. El uso de reguladores de crecimiento, logró aumentar la acumulación de biomasa, un 58 % para *E. chaffeyii* con combinaciones equimolares de ANA-BA o AIB-2IP (a 5 μ M), un 118 % para *T. laui* con la combinación equimolar de AIB-2IP (a 5 μ M), y alrededor de un 70 % para *T. lophophoroides* y un 50 % para *T. pseudopectinatus*, con combinaciones equimolares de AIA-MT, AIB-2IP o ANA-BA (a 5 μ M). La adición de prolina al 0.1 y 1 mM o tirosina al 0.1 mM, también incrementó la acumulación de biomasa cerca de un 95 %. En cuanto a producción de pigmentos betalaínicos, solo *T. pseudopectinatus* logró mayores niveles, con el tratamiento de polvo de plátano a 10 g/L (hasta 128 % en BC y 40 % en BX), y la inducción de estrés por salinidad con NaCl a 50 μ M (hasta un 156 % en BC y 145 % en BX). Por otra parte, el uso de biorreactores de inmersión temporal incrementó la producción de biomasa a valores cercanos al doble (ICF= 5.1) de los encontrados en medio semisólido, pero la producción de betalaínas se mantuvo sin cambios. Este es el primer trabajo en donde se analiza el potencial de las raíces transformadas de cactáceas para la obtención de pigmentos betalaínicos. En general, los niveles de betalaínas son bajos comparados con los reportados para otras especies vegetales en otros sistemas de producción, sin embargo, parece ser una alternativa viable, aunque requiere de más estudios.

ABSTRACT

Study of the factors affecting production of betalainic pigments in cacti hairy roots

The use of natural pigments in some products has shown health benefits. Betalainic pigments found in *cactaceae* and in many other plants, have great interest by their antioxidant, antiinflammatory and anticancer properties. In this work, hairy roots of four *cactaceae* species were studied: *Escobaria chaffeyi*, *Turbincarpus laui*, *T. lophophoroides* and *T. pseudopectinatus*, to evaluate the influence of several factors on biomass accumulation and betalainic pigment production. The evaluated factors were: use of different culture media, addition of plant growth regulators, nutritious complexes and precursors of the biosynthetic pathway to the culture medium, elicitation, plant tissue culture under different lighting conditions, and the use of two types of bioreactors. Results showed that culture media with high levels of nitrogen (MS, N6, DKW or B5) favored biomass accumulation, and fluorescent light favored both biomass and betalainic pigments accumulation. The use of plant growth regulators increased biomass accumulation by 58 % for *E. chaffeyi*, using equimolar combinations of ANA-BA or AIB-2IP (at 5 μ M), 118 % for *T. laui*, using equimolar combinations of AIB-2IP (at 5 μ M), and by 70 % for *T. lophophoroides* and 50 % for *T. pseudopectinatus* using equimolar combinations of AIA-MT, AIB-2IP or ANA-BA (at 5 μ M). The use of proline at 0.1 and 1 mM or tyrosine at 0.1 mM, achieved 95% of biomass accumulation. Regarding to production of betalainic pigments, only *T. pseudopectinatus* achieved high levels, using banana powder at 10 g/L (about 128 % for BC and 40 % for BX), and using elicitation by NaCl at 50 μ M (by 156 % for BC and 145 % for BX). On the other hand, the use of temporary immersion systems as RITA systems, achieved high levels of biomass accumulation (FGI= 5.1), the double of that obtained on semisolid medium, but betalain production remained unchanged. It is the first work where potential of cacti hairy roots is analyzed for betalain pigments production. In general, levels of betalains are low compared to that reported in other species and in other production systems; however, it seems to be a viable alternative, although further studies are required.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, las necesidades crecientes de la población, los requerimientos de mejora en la calidad de vida de las personas y el deterioro de las condiciones medioambientales, entre otros aspectos, están ejerciendo una fuerte presión en los diferentes sectores productivos. Se requieren más y mejores productos, que de ser posible mejoren nuestra salud y la mantengan; prácticas más amigables con el medio ambiente, sustentables, que nos permitan conservar los recursos naturales, mantener nuestra biodiversidad. En fechas recientes, el calentamiento global, ha venido a empeorar el escenario, haciendo más difícil esta tarea y más impredecible nuestro futuro.

Las plantas desde siempre, nos han provisto de infinidad de productos y han ayudado a resolver muchas situaciones de la vida diaria. Han servido como alimento y en la elaboración de diferentes productos industriales, como materias primas para la construcción de hogares, para la obtención de medicamentos, entre muchas otras aplicaciones. Por otra parte, su función ecológica es muy amplia, ya que son base de nuestra cadena alimentaria y han contribuido a nuestra aparición y supervivencia en el planeta. De igual manera, las poblaciones vegetales, se están viendo afectadas por los problemas medioambientales y la presión antropogénica, lo cual ha bajado sus rendimientos y promovido su desaparición. México tiene una posición geográfica privilegiada y posee una gran cantidad de especies vegetales.

La ciencia y la tecnología han colaborado con la industria, para mejorar su productividad. Muchas áreas de la ciencia se han visto envueltas en un desarrollo vertiginoso por esta situación. La biotecnología, que es una de ellas, ha traído consigo asombrosos descubrimientos y grandes avances, en áreas como la agricultura, la medicina, los alimentos, el medio ambiente, entre otras. La biotecnología vegetal, ha promovido el conocimiento y aprovechamiento sustentable de las plantas. Con el descubrimiento de la totipotencialidad de las células vegetales, el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*, la investigación en el genoma vegetal y la identificación y análisis de los metabolitos que producen, entre otras cosas, se ha incrementado la investigación en esta área de forma acelerada. Los avances en la ingeniería genética, que han permitido la transformación de plantas, y los adelantos

que se han dado en el tema de biorreactores para cultivo de tejidos vegetales, han contribuido enormemente.

Se sabe, por ejemplo, que algunos fitoquímicos se producen en zonas específicas de la planta y, luego son traslocados a otras partes de esta; que hay órganos y tejidos vegetales que pueden crecer bajo condiciones controladas y producir dichas sustancias incluso en cantidades mayores que las que la planta produce naturalmente. Además, se conoce que hay factores medioambientales y de otro tipo que pueden incidir positiva o negativamente en la generación y producción de estos fitoquímicos; tal es el caso de la temperatura, la luz, los nutrientes, el estrés, entre otros. Estos factores son específicos para cada especie o género, por lo que las condiciones aplicables a un tipo de planta pueden no ser las adecuadas para otra.

Se hace necesario entonces, investigar más sobre nuevas formas de obtención de productos vegetales de interés y procedimientos más adecuados de aprovechamiento de estos recursos, analizando los mecanismos de generación de sus fitoquímicos. Este trabajo pretende generar conocimientos sobre los factores que influyen en la obtención de pigmentos betaláinicos, en raíces transformadas de cactáceas, como una alternativa a los que ya se producen en otras especies vegetales. Estos pigmentos son una clase de fitoquímicos, que tienen potencial como colorantes alimenticios, y que adicionalmente tienen propiedades nutracéuticas.

1. ANTECEDENTES

1.1. Colorantes

Los colorantes son sustancias químicas naturales o sintéticas, que dan o renuevan color a alimentos, textiles, y a otro tipo de productos para hacerlos más atractivos (Poloni & de Luca 2007; de Boer 2014). Dentro de esta definición se incluyen a los *tintes* (líquidos o sustancias solubles en el vehículo y que forman soluciones) y a los *pigmentos* (sustancias generalmente insolubles en el vehículo y forman suspensiones). Basándose en solubilidades, dependiendo del vehículo, una sustancia puede ser un tinte o un pigmento, por lo que en muchas ocasiones se usa el término genérico de colorante (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003).

Desde la antigüedad los hombres utilizaban los colorantes de origen animal, vegetal y mineral, para adornarse, decorar objetos, hacer pinturas y teñir textiles; sin embargo, la estabilidad de los dos primeros tipos de colorantes disminuía rápidamente al lavarse o exponerse a la luz solar, lo cual generó una preferencia por los de origen mineral, que posteriormente se sustituyeron por otros obtenidos por síntesis química. (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003; Poloni & de Luca 2007). Se puede decir, por lo tanto, que su aplicación se encuentra en constante expansión y en distintas áreas de la industria. Los colorantes se pueden clasificar de acuerdo con su origen, aplicación, estructura, legislación, etc. Una clasificación muy general los divide en colorantes naturales u orgánicos, colorantes inorgánicos y colorantes sintéticos o artificiales (Haude 1997; Delgado-Vargas & Paredes-López 2003).

1.1.1. Colorantes naturales

Los colorantes naturales son derivados de vegetales y animales, y el color se debe a los pigmentos que poseen. Estos colorantes deben ser inocuos, especialmente si han de usarse como aditivos para alimentos, medicamentos o cosméticos. En general, son considerados colores no duraderos cuando son expuestos a la luz, aunque algunos tienen una marcada resistencia y excelente poder tintóreo bajo ciertas condiciones de aplicación (Haude 1997).

Algunos autores han sugerido el uso del término biocolorantes, debido a que son extraídos de fuentes biológicas (plantas, animales y microorganismos) (Chattopadhyay *et al.* 2008; Rymbai *et al.* 2011); sin embargo, en este texto se utilizará el término colorante natural para hacer alusión a este tipo de colorantes (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003).

En muchas partes del mundo, se tienen referencias ancestrales del uso de colorantes naturales; en México, desde los inicios de la época colonial. Se incluían para tonos rojo-naranjas, las secreciones de diferentes especies de moluscos, la grana cochinilla obtenida de insectos, los extractos de rubia roja, de achiote, de palo de Campeche y de la planta de henna. Para los tonos amarillos se usaban la cosmos amarilla, el bejuquillo fideo y otras especies vegetales del género *Cuscuta*. Como colorantes azules, se utilizaban los extractos de la planta añil o índigo. Estos colorantes han tenido diversos usos, los cuales abarcan desde el teñido de tejidos, cosméticos, medicamentos y alimentos, hasta su uso en la pintura (Haude 1997; Poloni & de Luca 2007).

1.1.2. Colorantes inorgánicos

Estos colorantes son obtenidos de compuestos metálicos o minerales. Se incluyen óxidos de hierro (con coloraciones rojizas a amarillas) y carbonatos de calcio (color blanco), que fueron ampliamente usados en escritura y pintura (Haude 1997). En la industria alimenticia, solo algunos siguen en uso como el dióxido de titanio, el carbón y el CaCO_3 , entre otros; muchos de ellos han sido dejados de lado por sus efectos tóxicos (compuestos de plomo, cromo, mercurio y cobre). En comparación con los naturales, son considerados en su mayoría estables y permanentes (Downham & Collins 2000b; Delgado-Vargas & Paredes-López 2003; Chattopadhyay *et al.* 2008).

1.1.3. Colorantes sintéticos

Son aquellos colorantes obtenidos por medio de síntesis química. Su estabilidad y permanencia es variable. Pueden dividirse en orgánicos e inorgánicos, aunque también pueden ser clasificados tomando en cuenta otros criterios, como por ejemplo su estructura química o su forma de aplicación (Haude 1997). A mediados del siglo XIX se inicia la síntesis química, con la obtención de un colorante púrpura (malveína) por William Henry Perkin en

1856, al lograr la oxidación de la anilina. Durante algún tiempo se les llamó anilinas a los colorantes de este tipo. Más adelante en 1868 se sintetizó alizarina y hacia 1880 se logró la síntesis del índigo (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003).

En la actualidad, la mayor parte de los colorantes (90 %) son sintetizados a partir del petróleo o del alquitrán de hulla; desplazando casi totalmente a los colorantes naturales, esto debido a su disponibilidad, a su bajo costo, a la capacidad de producción y a la amplia gama de productos novedosos que se podían elaborar (Downham & Collins 2000a; Poloni & de Luca 2007). Dentro de estos colorantes sintéticos, destacaron los colorantes azoicos, que sustituyeron a los colorantes débiles del tipo antraquinona, que eran utilizados anteriormente (Hunger 2007).

1.1.4. Perspectivas sobre el uso de colorantes

La versatilidad de los colorantes sintéticos y sus ventajas económicas, desplazaron a los otros tipos de colorantes y desarrollaron la síntesis química. Sin embargo, los colorantes sintéticos tienen efectos indeseables, por ejemplo, alergenicidad y toxicidad (Poloni & de Luca 2007; Rymbai *et al.* 2011; de Boer 2014). Otros autores argumentaron que movimientos activistas ambientalistas produjeron una aversión mundial hacia los aditivos alimentarios sintéticos (o también llamados "productos químicos"), derivado de la fuerte presión industrial que se venía presentando (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003; Rymbai *et al.* 2011).

Los colorantes de tipo natural han mostrado ser benéficos a la salud, al agregarse a productos alimenticios y medicamentos (Poloni & de Luca 2007; de Boer 2014). Esto aunado a que los consumidores han desarrollado una cultura hacia los productos orgánicos ("lo natural es mejor"), por un sentido ecológico y de sustentabilidad, entre otros aspectos, ha provocado que se preste atención nuevamente a todos los productos de origen natural (Chattopadhyay *et al.* 2008; Rymbai *et al.* 2011) .

Como se mencionó anteriormente, las fuentes principales de colorantes naturales son los tejidos animales y vegetales, y hoy también es posible obtenerlos de algas y hongos. Desde el punto de vista de producción, las plantas y los microorganismos son los más adecuados,

por el conocimiento que se tiene de sus técnicas de cultivo y procesamiento (de Boer 2014). Sin embargo, a pesar de que se dispone de una gran cantidad de plantas con pigmentos saludables y atractivos; del total, el 70 % no ha sido suficientemente estudiado y solo del 5 % se tienen datos de su composición química. El conocimiento de las fuentes de pigmentos naturales, su distribución, su disponibilidad y sus propiedades es limitado (Rymbai *et al.* 2011).

1.2. Biotecnología vegetal en la obtención de colorantes naturales

En la naturaleza existe un gran número de colorantes, y a pesar de que se han utilizado en diversas aplicaciones, sus usos siguen siendo limitados; esto es debido a la falta de estudios para su implementación exitosa y a la falta de capacidad tecnológica, para su obtención y aprovechamiento de una manera económicamente viable y adecuada. Sin embargo, se tiene a la fecha un adelanto importante en las herramientas analíticas y tecnológicas, que pueden hacer de estos procesos, una alternativa viable de producción. Una clave ha sido el desarrollo de la biotecnología, que ha permitido aprovechar las fuentes naturales para obtener colorantes de este tipo.

1.2.1. Pigmentos como fuente de colorantes naturales

La mayoría de los pigmentos son considerados productos del metabolismo secundario, aunque en las plantas algunos de ellos forman parte del metabolismo primario. En los animales, son de utilidad en el camuflaje y en el apareamiento; en las plantas pueden servir, por ejemplo, para coloración de flores y frutos, atracción de polinizadores, protección del daño fotooxidativo, entre otras funciones. En hongos se cree tienen la función de atraer animales y propiciar la dispersión de las esporas (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003).

Existe un gran número de estructuras de pigmentos y aún siguen apareciendo nuevas. Se pueden encontrar en los seres vivos, los siguientes tipos de pigmentos (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003; Chattopadhyay *et al.* 2008):

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Derivados tetrapirroles: Grupo relativamente pequeño de compuestos, aunque el más abundante de manera global. Están basados estructuralmente en el tetrapirrol en la forma cíclica o lineal. Incluyen las clorofilas y las bilinas [grupos hemo, fitocromos]. Sus funciones abarcan la fotosíntesis, el desarrollo metabólico, transporte de oxígeno, vitaminas (Hendry 1996).
 - Derivados isoprenoides o terpenoides: Son un grupo de compuestos ampliamente distribuidos, abarcando todos los reinos. A este grupo corresponden los carotenoides [licopeno, carotenos, zeaxantina, etc.], a los iridoides (crocina) y algunas quinonas. Tienen funciones como hormonas, pigmentos y fitoalexinas.
 - Compuestos heterocíclicos nitrogenados no tetrapirroles: Forman un gran grupo de compuestos nitrogenados heterocíclicos no relacionados. Se pueden encontrar aquí compuestos de dos tipos principalmente indigoides (derivados indol) y pirimidinas sustituidas (Hendry 1996). Se incluyen purinas, pterinas, flavinas, fenazinas, fenoxazinas, betalaínas, entre las más importantes. Sus funciones son diversas, como constituyentes de ácidos nucleicos, factores de crecimiento, en la respiración celular, entre otras.
 - Derivados benzopiranos: Compuestos heterocíclicos oxigenados. Se incluyen a los flavonoides (antocianinas, flavonoles, flavonas, etc.) y a los taninos. Dentro de sus principales funciones se tiene que actúan como atrayentes de polinizadores, protectores del daño fotooxidativo, y como fitoalexinas.
 - Quinonas: Son el grupo más grande de pigmentos, en cuanto a número y estructura. Son compuestos aromáticos monocíclicos o policíclicos que tienen dos grupos hidroxilo. Se pueden subdividir en benzoquinonas, naftoquinonas (vitamina K) y antraquinonas (ácido carmínico) principalmente. Participan en reacciones redox (transportadores de electrones) en los cloroplastos y mitocondrias (plastoquinonas, ubiquinonas), como cofactores de enzimas, en mecanismos de defensa.
 - Melaninas: Son polímeros de compuestos fenólicos o monómeros indólicos. Forman generalmente macromoléculas complejas no homopoliméricas. Se dividen en alomelaninas, eumelaninas y faeomelaninas. Como funciones principales se encuentran la protección ante temperaturas extremas, daño por radiación y diversos tipos de estrés.

Dentro de estas estructuras, destacan por su interés y aplicación como colorantes: β -caroteno, licopeno, xantofilas, luteína, anato, crocina, quercetina, luteolina, antocianinas, clorofilas, betacianinas, y curcumina (Rymbai *et al.* 2011).

Los metabolitos obtenidos de plantas, especialmente los secundarios, y entre ellos los pigmentos vegetales, pueden obtenerse utilizando las herramientas de la biotecnología vegetal, como son el cultivo *in vitro* y la transformación genética, entre otras más novedosas. Si se toma en cuenta además, que muchos de estos metabolitos son producidos como compuestos de defensa contra factores bióticos o abióticos con los que interactúan las plantas, se conoce la ruta metabólica y las características generales de desarrollo y producción del metabolito en el cultivo, esto permite agregar otras estrategias de producción, que acopladas a las herramientas mencionadas, pueden incrementar la generación y obtención de metabolitos de interés (Santos-Díaz *et al.* 2005; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).

1.2.2. Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* es una alternativa biotecnológica para la obtención de valiosos compuestos activos de plantas; es independiente de factores climáticos y de otras condiciones limitantes, ya que se cultivan las plantas o partes de ellas, en medio nutritivo bajo condiciones axénicas y controladas. Básicamente, existen tres tipos de cultivos *in vitro* para el fin arriba mencionado: el cultivo de células en suspensión, el de células inmovilizadas y el de órganos o tejidos (Arias *et al.* 2009).

El cultivo de órganos vegetales ha despertado un gran interés en la producción de metabolitos secundarios, utilizándose dos tipos de órganos principalmente: raíces y brotes. En el caso de raíces, se ha utilizado la transformación genética para aumentar la eficiencia. Los órganos así obtenidos, presentan ventajas con respecto a los otros tipos de cultivo: no requieren reguladores de crecimiento, mantienen la estabilidad genética, producen el metabolito por más tiempo, crecen rápidamente y se pueden cultivar a altas densidades de biomasa. Sus limitaciones se han centrado en la transferencia de masa y en la optimización de las condiciones de cultivo en recipientes adecuados (Wahby 2007; Arias *et al.* 2009).

1.2.3. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*

Las estrategias para aumentar el rendimiento en estos cultivos se pueden describir como sigue:

- Selección de líneas altamente productoras: Debido a que la población de la que se parte es generalmente heterogénea, se pueden realizar exámenes, macroscópicos, microscópicos o químicos sobre el material de trabajo, seleccionando el que presente las mejores características deseables, por ejemplo, velocidad de crecimiento, niveles de producción del metabolito que se busca y estabilidad. Posteriormente, se subcultivan solo aquellos materiales que presenten las características que se desean conservar (Georgiev *et al.* 2007; Arias-Zabala *et al.* 2009; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Optimización de la composición del medio de cultivo: Consiste en hacer modificaciones sobre los componentes básicos de los medios de cultivo, para lograr una mayor producción del metabolito de interés. Se basan mayormente en cambiar la concentración o las fuentes de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg), las fuentes de carbono y en la adición de reguladores de crecimiento vegetal. Hoy en día el uso de sistemas de análisis estadísticos es de utilidad para predecir las mejores combinaciones de componentes (Santos-Díaz *et al.* 2005; Georgiev *et al.* 2007; Arias-Zabala *et al.* 2009; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Optimización de las condiciones de cultivo: Consiste en modificar las condiciones de luminosidad, temperatura, presión osmótica y pH para verificar un aumento de la concentración de metabolitos de interés. Aquí se puede contemplar también, el número de subcultivos, el tipo y edad del explante y las condiciones de inóculo. La edad y tamaño del inóculo ha mostrado fuerte influencia en el crecimiento de cultivos de raíces transformadas y su producción de fitoquímicos (Santos-Díaz *et al.* 2005; Georgiev *et al.* 2007; Arias-Zabala *et al.* 2009; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Inmovilización celular: En el caso de cultivos celulares, se hace necesario el cultivar las células en soportes inertes y permeables a los nutrientes y productos metabólicos, para eliminar problemas debido a fuerzas de corte, que dañan las células y no permiten su

reutilización, trayendo además altos niveles de producción de biomasa y concentración del metabolito (Pérez-Alonso & Jiménez 2011).

- Adición de precursores: Consiste en agregar al medio de cultivo, moléculas que intervienen en la ruta biosintética de un metabolito, para incrementar el rendimiento del proceso. Aquí se explota el potencial biosintético de las enzimas presentes en el cultivo celular (Arias-Zabala *et al.* 2009; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Uso de incitadores: Consiste en inducir la expresión de genes asociados a la síntesis de metabolitos secundarios de defensa en plantas, por medio de la exposición de las células o tejidos vegetales, a factores externos. Estos factores pueden ser clasificados por su origen en factores bióticos (quitosano, metiljasmonato, oligosacáridos, extractos fúngicos o de otros microorganismos, etc.) o factores abióticos (metales pesados, estrés térmico, estrés osmótico, salinidad, anaerobiosis, etc.) (Arias-Zabala *et al.* 2009; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Biotransformación: Esta estrategia se ha desarrollado para explotar el potencial enzimático de las especies vegetales, ya que se ha demostrado que pueden catalizar reacciones estereoespecíficas para producir nuevos compuestos, compuestos conocidos más económicos y descifrar rutas metabólicas. Solo se ha usado en cultivos celulares de plantas y para productos de alto valor económico (Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Recuperación del producto *in situ* (permeabilización celular y cultivo en sistemas de dos fases): En la permeabilización, se utilizan solventes y adsorbentes para extraer el metabolito de interés y estimular e incrementar la producción del mismo en el tejido vegetal en cultivo. Como los metabolitos secundarios se almacenan generalmente en las vacuolas y su capacidad de almacenaje limita la producción del metabolito, esta estrategia es adecuada para mejorar su producción. Agregando una segunda fase al sistema, también se hace posible mejorar la producción; en la primera fase se dan las condiciones de crecimiento del material vegetal y la producción del fitoquímico; en la segunda se propicia la liberación del metabolito. Es muy adecuada para productos que inhiben su biosíntesis o son fácilmente degradables (Georgiev *et al.* 2007; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Escalamiento del proceso a biorreactores: Consiste en utilizar recipientes adecuados tecnológicamente, de diversos diseños, para colocar el material vegetal e implementar las condiciones de trabajo determinadas en laboratorio. De esta manera se hace posible

obtener cantidades del metabolito de interés a escala industrial. La complejidad de estas operaciones en ocasiones resulta prohibitiva y requiere generalmente de un proceso de optimización de las condiciones de trabajo, para permitir su producción de una manera económicamente viable (Pérez-Alonso & Jiménez 2011).

- Transformación genética: Es una estrategia que permite el mejoramiento genético de los cultivos, al permitir la transferencia y expresión de material genético foráneo en plantas de interés. Uno de los sistemas más eficientes es el de *Agrobacterium rhizogenes*, aunque se tienen algunos otros también aplicables a plantas. Si por ejemplo la raíz acumula un cierto metabolito, generando su variante de raíz transformada, sin agregar ninguna otra modificación genética por el momento, se tiene el potencial de generar una mayor cantidad de metabolito de dicha planta, por el simple hecho de tener un sistema de raíces creciendo rápidamente, fácil de mantener pues no requiere de reguladores de crecimiento adicionales y estable genéticamente, a diferencia de los cultivos de tejido calloso o cultivos celulares. Las aplicaciones en este sentido son interesantes (Veena & Taylor 2007a; Pérez-Alonso & Jiménez 2011).
- Ingeniería metabólica: Se tiene la posibilidad de llevarla a cabo de diferentes maneras, una puede ser sobreexpresando enzimas requeridas para la síntesis de los productos deseados, otra es modificando el flujo metabólico hacia el producto de interés, y finalmente, se pueden crear nuevas rutas metabólicas en las ya existentes, que favorezcan la acumulación de metabolitos no producidos normalmente en la planta. Esta estrategia requiere del conocimiento de los productos y las rutas completas de biosíntesis del metabolito de interés (Pérez-Alonso & Jiménez 2011).

En el diagrama de la Figura 1, se muestra como ejemplo, el caso específico de aplicación de las estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios, en un cultivo de raíces transformadas.

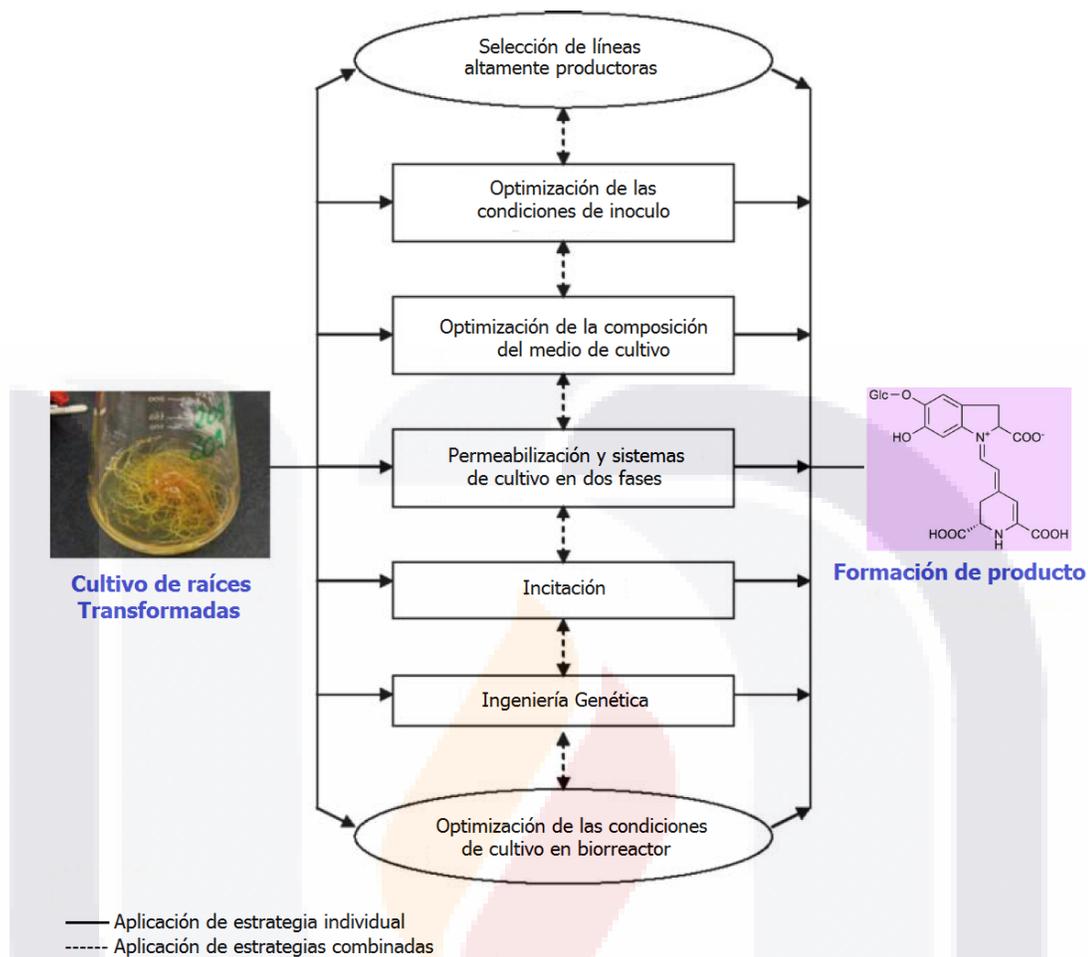


Figura 1. Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios. Ejemplo de aplicación en cultivos de raíces transformadas (Tomada y modificada de Georgiev *et al.* 2007).

1.2.4. Cultivo de raíces transformadas para la obtención de metabolitos

Muchos metabolitos de interés en plantas son acumulados en las raíces. El utilizar directamente las raíces de las plantas es una forma destructiva de obtener dichos metabolitos, por lo que se ha generado un gran interés en la obtención de cultivos de raíces y en especial de raíces transformadas (también llamadas raíces pilosas o "hairy roots" por su terminología en inglés) de varias especies de plantas medicinales y de otro tipo (Guillon *et al.* 2006). Las raíces pilosas generadas se caracterizan por crecimiento radical plagiotrópico, un alto grado de ramificaciones laterales, gran cantidad de raíces y mejores

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tasas de crecimiento, similares a las de los tejidos callosos indiferenciados, aunque con órganos radicales altamente diferenciados y funcionales (Veena & Taylor 2007b).

La bacteria *Agrobacterium rhizogenes*, fue identificada hace más de 70 años como agente causal de la enfermedad de las "raíces pilosas". Es una bacteria del suelo, Gram-negativa, de forma de bastón, que infecta células heridas de plantas debido a la producción de compuestos fenólicos en el sitio de la herida, que funcionan como atrayentes de la bacteria. Hay diversidad de cepas de *A. rhizogenes* y un amplio rango de hospederos, aunque naturalmente el número de hospederos es limitado, en condiciones de laboratorio cientos de especies de plantas han sido susceptibles a la infección de *A. rhizogenes*, entre ellas dicotiledóneas, monocotiledóneas y algunas gimnospermas. Dentro de los tejidos vegetales susceptibles de infección se encuentran hojas, tallos, peciolo, raíces, entre otros. La respuesta varía con la cepa, con la especie de planta y el tipo de tejido utilizado (Veena & Taylor 2007b).

Una clasificación agrupa a los miembros de *A. rhizogenes*, por el tipo de opinas que producen, en cepas de tipo agropina (siendo representativo el plásmido *A4*), las de tipo manopina (*8196*), las de tipo cucumopina (*2659*) y las de tipo mikimopina (*1724*), aunque hay muchas más clasificaciones. El plásmido Ri de la bacteria contiene genes involucrados en el desarrollo de las raíces pilosas, en la síntesis de opinas y genes que tienen aún una función desconocida (Figura 2). Contiene una región de material genético, llamada T-DNA, capaz de integrarse en el genoma de la planta, expresar sus genes e interferir con el funcionamiento normal de la misma. Se afecta particularmente el balance hormonal, cambiando el contenido de los reguladores de crecimiento, su metabolismo y sensibilidad (Veena & Taylor 2007b; Sharma *et al.* 2013; Pavlova *et al.* 2014).

Las cepas de tipo agropina difieren a las de otros tipos en la estructura de su plásmido Ri, ya que contiene dos plásmidos T-DNA, derecho e izquierdo (T_R y T_L respectivamente). En el caso de las cepas de tipo agropina, varios *loci* del plásmido T_L han mostrado ser esenciales para la inducción y desarrollo de las raíces transformadas (genes *rol A*, *rol B*, *rol C* y *rol D*). El gen *rol B* ha demostrado ser absolutamente esencial para la inducción de raíces pilosas. El plásmido T_R de las cepas tipo agropina contiene genes (*aux1*, *aux2*, *RolB TR*, *mas1*, *mas2*

y *ags*) que controlan la biosíntesis de opinas y auxinas (Veena & Taylor 2007b; Sharma *et al.* 2013).

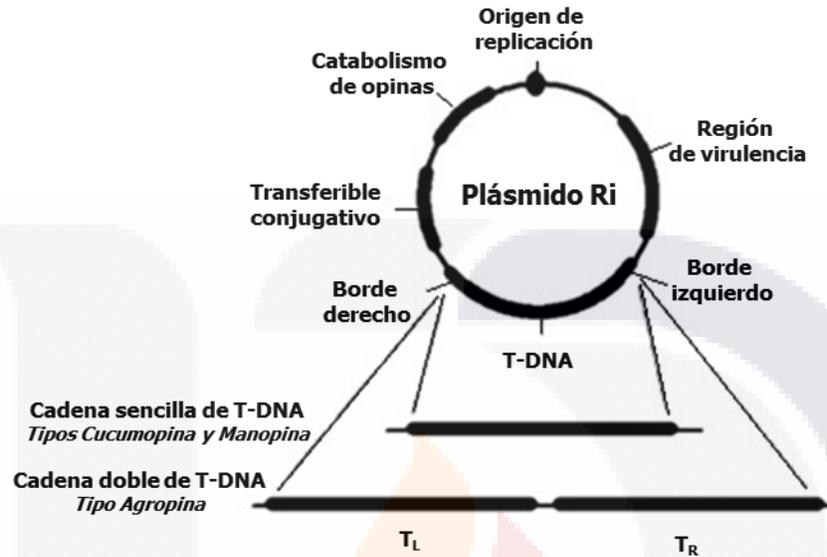


Figura 2. Estructura de los plásmidos Ri de *A. rhizogenes* (Tomada y adaptada de Veena y Taylor 2007).

La interacción entre *A. rhizogenes* y la planta involucra una serie de eventos complejos en secuencia. Primeramente, *Agrobacterium* reconoce moléculas señalizadoras (compuestos fenólicos) que liberan las células vegetales al ser heridas y comienza a darse una respuesta quimiotáctica de la bacteria para adherirse a dicha célula. Se comienza la etapa de infección con la inserción de los fragmentos de T-DNA del plásmido Ri, mediada por la acción de los genes de la región de virulencia. Finalmente, la expresión de los genes de T-DNA transferidos codifican para la síntesis de auxinas y otras funciones rizogénicas que resultan en la formación de raíces en el sitio de infección en la planta (Sharma *et al.* 2013).

La importancia de las raíces transformadas o pilosas, en la producción de metabolitos secundarios, se resume en diferentes características de interés (Sharma *et al.* 2013):

- Su habilidad única de crecer *in vitro* en la ausencia de reguladores de crecimiento vegetal exógenos, con raíces plagiotrópicas y neoplásicas.
- Exhibir la misma o mayor capacidad biosintética para la producción de metabolitos secundarios, comparada con las plantas madre
- Mantener la estabilidad genética

- Generar productos útiles que solo se obtienen *in vitro* en tejidos organizados (raíces) pero no en suspensiones celulares o cultivos de tejido caloso.
- Producir metabolitos exclusivos de partes aéreas

1.2.5. Biorreactores utilizados para el cultivo de raíces

Las raíces se cultivan para micropropagar plantas, como alternativa al cultivo de otros órganos o tejidos, o por el hecho de que contienen cantidades importantes de metabolitos de interés. Estos metabolitos pueden ser extraídos directamente de las raíces después de hacer su cosecha, o pueden ser extraídos de forma continua o en lotes, si son liberados por las mismas al medio. El reto de hoy en día para su uso masivo, es precisamente el que se refiere al escalado a biorreactores y al manejo a nivel industrial (Martin & Vermette 2005).

Los biorreactores son contenedores con ambientes estériles, que incluyen los nutrientes líquidos, los sistemas de entrada-salida para aire y líquido, y están diseñados para optimizar y monitorear las condiciones de cultivo. En general, permiten controlar las condiciones microambientales tales como pH, gases disueltos, aireación y temperatura. Los biorreactores utilizados para cultivar raíces y sobre todo raíces pilosas, pueden dividirse en biorreactores de fase líquida (reactores sumergidos) y de fase gaseosa. Algunos otros tipos incluyen versiones híbridas de estos. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, en la Tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de los tipos de biorreactores más ampliamente utilizados en el cultivo de raíces (Stiles & Liu 2013).

Dentro de los parámetros a controlar en un biorreactor, la principal limitante en el escalado es el abastecimiento de oxígeno al material en desarrollo. Sin embargo, otros factores que también pueden afectar el crecimiento y la productividad de los cultivos de raíces pilosas, son la luz, algunos gases presentes en el medio (etileno), la temperatura, los nutrientes y el inóculo (Stiles & Liu 2013).

Existe una gran diversidad de configuraciones para crear las condiciones ambientales necesarias para el adecuado desarrollo de raíces pilosas (Figura 3). Inicialmente los biorreactores de tanque agitado de más de 20 L probaron ser eficientes; sin embargo, el daño mecánico a las frágiles raicillas era considerable en estas condiciones, limitando su

densidad final en el cultivo. Posteriormente, se usaron biorreactores de tipo columna de burbujeo y de tipo tanque agitado modificados, los cuales generan menor daño mecánico, y permiten la inmovilización de las raíces por medio de una malla horizontal u otro tipo de soportes (Martin & Vermette 2005).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de biorreactores utilizados en el cultivo de raíces.

Tipo de biorreactor		Ventajas	Desventajas
Reactores de fase líquida	Tanque agitado	El mezclado y el rompimiento de burbujas previenen la agregación celular y mejoran la oxigenación	Alto esfuerzo de corte y consumo de energía, configuración complicada, exposición a contaminantes, dificultad para optimizar múltiples variables
	Airlift y columna de burbujeo	Bajo esfuerzo de corte, diseño y construcción simple, baja contaminación, poco mantenimiento	Espumeo inducido por grandes volúmenes de aire, crecimiento no uniforme de raíces dentro del reactor (raíces flotan en la superficie)
Reactores de fase gaseosa	De Niebla nutritiva	Abundante suministro de oxígeno, baja concentración de azúcares y alta utilización de espacio	Construcción compleja, alto consumo de energía, gran trabajo de instalación.
	De cama por goteo	Abundante suministro de oxígeno y bajo consumo de energía	Puede producir una capa de líquido viscoso en la superficie de las raíces creando una barrera a la transferencia de masa, gran trabajo de instalación.

(Tomada y adaptada de Stiles y Liu 2013).

La fisiología y morfología de las raíces transformadas, impone consideraciones especiales en el diseño de los biorreactores. Se debe minimizar el rompimiento celular y facilitar la transferencia de nutrientes y oxígeno en camas de raíces densamente empacadas; así como evitar la formación de cúmulos. La inmovilización de raíces pilosas por el uso de mallas o soportes de poliuretano promueve su crecimiento y desarrollo en tanques sumergidos de tipo tanque agitado, en biorreactores de columna de burbujeo, en los de tipo airlift y en los de tipo rotatorio. Las limitaciones de intercambio gaseoso y el transporte de nutrientes pueden inhibir el crecimiento del material vegetal, sin embargo, los biorreactores de goteo o de rocío (niebla), los de tipo RITA[®] y algunos otros de reciente creación, han eliminado estos inconvenientes con buenos resultados (Eibl & Eibl 2008).

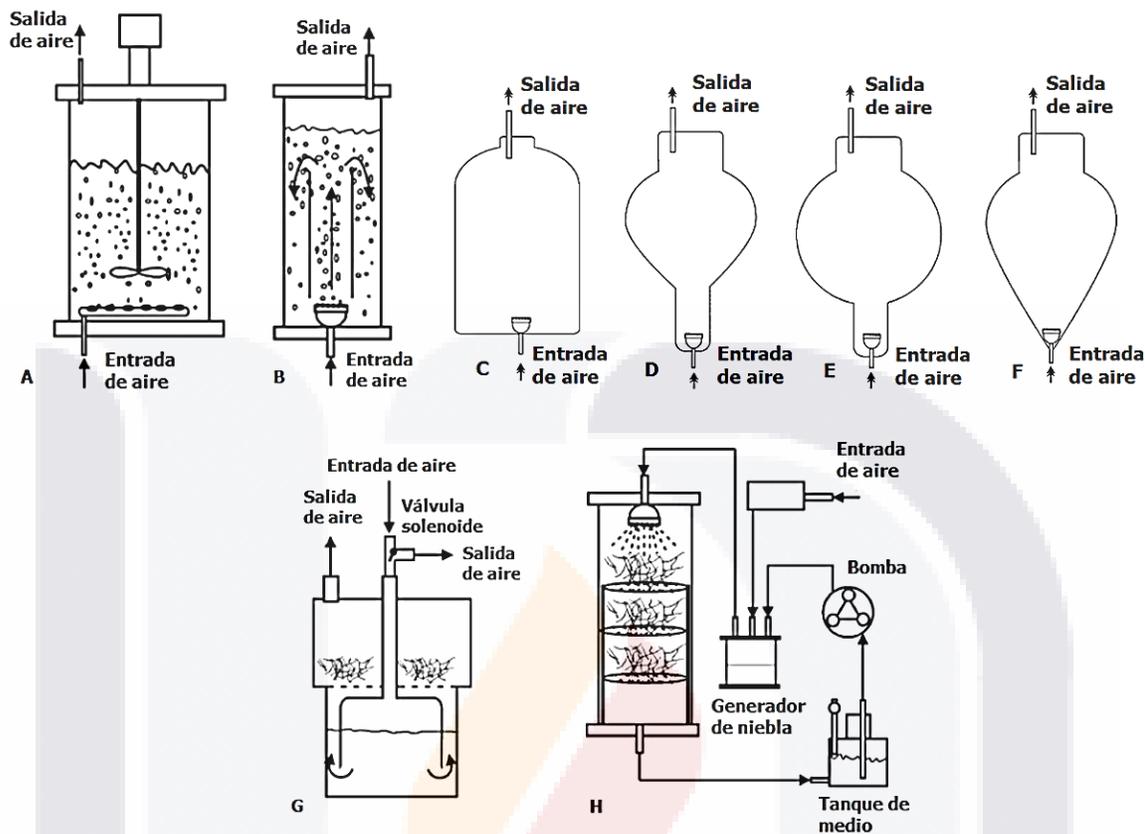


Figura 3. Sistemas de biorreactores usados para la producción de betalaínas. A) Tanque agitado, B) Airlift columna, C) Airlift tambor, D) Airlift globo, E) Airlift bulbo, F) Airlift cono, G) RITA® y H) De niebla o rocío. (Tomada y modificada de Georgiev *et al.* 2008).

Para la producción de pigmentos betalaínicos en sistemas de cultivo *in vitro*, a partir de raíces pilosas de betabel, se han usado diversas configuraciones de biorreactores. Por ejemplo, biorreactores de tanque agitado con alimentación continua y por lote, de tipo niebla, de tipo airlift (cono, globo, bulbo, tambor y columna) y biorreactores de inmersión temporal tipo RITA®, que han permitido obtener niveles de recuperación comparables a los alcanzados en matraces (Georgiev *et al.* 2012). El tipo ideal de biorreactor para producir pigmentos como los de tipo betalaínico, a partir de cualquier tipo de tejido vegetal, necesita ser investigado detenidamente para establecer el sistema adecuado de producción y de escalamiento del proceso.

1.3. Panorama actual de los pigmentos betaláinicos

Los pigmentos betaláinicos son una clase de pigmentos solubles en agua, obtenidos de plantas, que se clasifican dentro de los compuestos heterocíclicos nitrogenados no tetrapirroles. Son pigmentos restringidos a la mayoría de los miembros del orden de las *Cariofilales* y a algunos géneros de hongos basidiomicetos. Son mutuamente excluyentes de las antocianinas, el otro tipo de pigmento más abundante en plantas. Se dividen en **betacianinas** rojo-violetas, y **betaxantinas** amarillas (Figura 4). La estructura básica de las betalainas es una dihidropiridina sustituida, que sirve como cromóforo principal, con un sistema de dobles enlaces conjugados. Son derivadas del ácido betalámico al condensarse con ciclo-DOPA (ciclo-3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina), aminoácidos o aminas. (Herbach *et al.* 2006; Pavokovi & Krsnik-Rasol 2011).

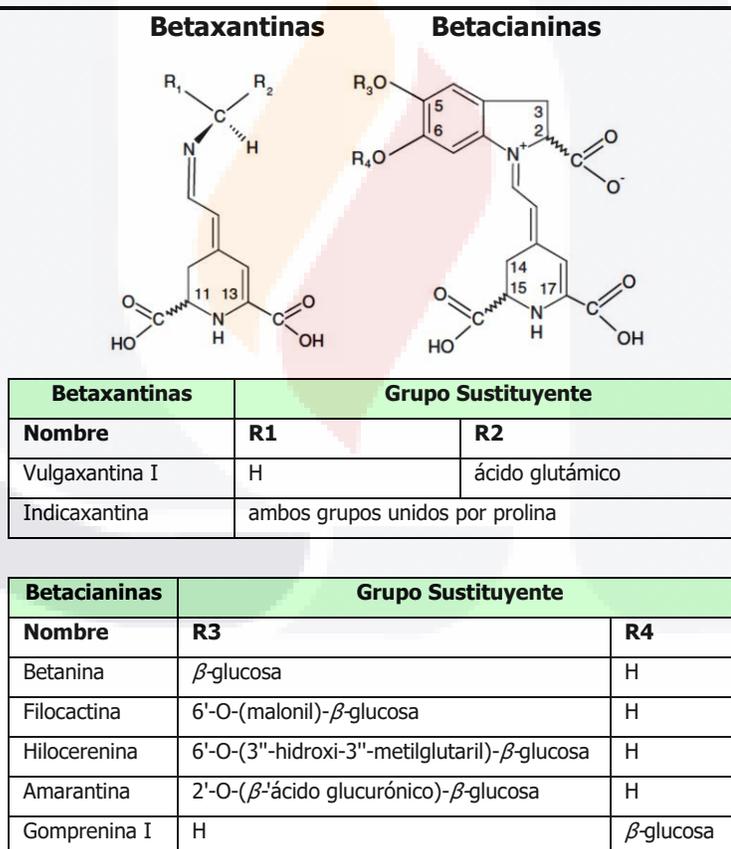


Figura 4. Estructura química de betalainas. Betaxantinas y Betacianinas. (Tomada y adaptada de Herbach *et al.* 2006).

Su ruta biosintética consta de varias reacciones enzimáticas y espontáneas (Figura 5). Las betalaínas son sintetizadas en el citoplasma y luego son almacenadas en las vacuolas. El punto de inicio de la ruta biosintética es el aminoácido tirosina, aunque la tiramina también puede funcionar así para algunas otras betalaínas. Su función en la naturaleza es impartir color a flores y frutos principalmente, para atraer a polinizadores y ayudar en la dispersión de la semilla; se ha observado además que son agentes protectores inducidos por radiación UV en algunas especies, o por infecciones virales en betabel, por ejemplo (Georgiev *et al.* 2008; Pavokovi & Krsnik-Rasol 2011; Nakatsuka *et al.* 2013).

Las betalaínas, han atraído un especial interés por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas; además son químicamente estables en un rango más amplio de pH que otros pigmentos vegetales (Georgiev *et al.* 2008; Pavokovi & Krsnik-Rasol 2011).

La fuente principal de estos pigmentos ha sido la raíz del betabel (con la betanina, la más abundante de las betalaínas), pero se necesitan pigmentos de este tipo principalmente en la gama de amarillos. Se tienen algunas fuentes alternativas, como las plantas de los géneros *Amaranthaceae* y *Cactaceae*, entre otras. Se usan en la industria para dar color a productos lácteos, carne, jaleas, aderezos, bebidas frías y postres congelados. Aparte de las plantas cultivadas normalmente, como técnicas de producción se han explorado los cultivos celulares y las raíces transformadas en biorreactores (Tabla 2), para obtener cantidades comparables de pigmentos de una manera sustentable; sin embargo, aún es necesario investigar más sobre su optimización (Santos-Díaz *et al.* 2005; Pavokovi & Krsnik-Rasol 2011).

1.3.1. Determinación de betalaínas en plantas

La preparación de las muestras de tejidos biológicos, para la extracción de pigmentos, es frecuentemente tediosa y consume una gran cantidad de tiempo. La exactitud del análisis depende de muchos parámetros, así como de la preparación de la muestra (almacenaje, proceso, etc.). Además, la extracción completa del pigmento requiere comúnmente de varios pasos y puede requerir una mezcla de diversos solventes. Esto es cierto cuando la muestra contiene pigmentos de diferentes polaridades y/o presenta una matriz compleja;

en raros casos, los pigmentos pueden ser extraídos en un proceso de un solo paso (Schoefs 2005).

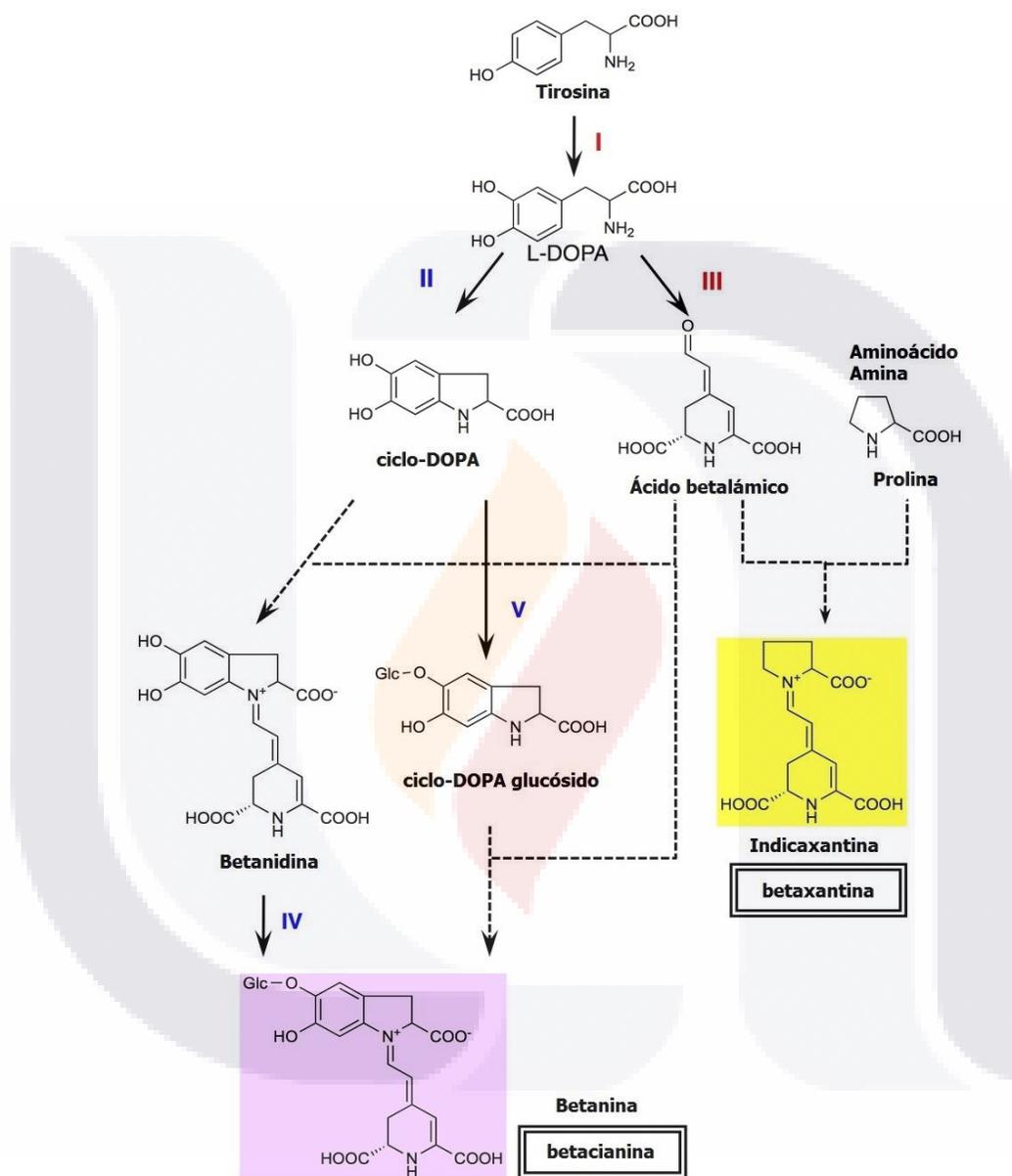


Figura 5. Ruta biosintética de las betalainas. Las flechas continuas muestran reacciones enzimáticas, las flechas punteadas muestran reacciones espontáneas. I. Tirosina hidroxilasa; II. L-DOPA oxidasa; III. DOPA 4,5-dioxigenasa; IV. Betanidin 5-O-glucosiltransferasa; V. ciclo-DOPA 5-O-glucosiltransferasa. (Tomada y adaptada de Nakatsuka *et al.* 2013).

Tabla 2. Sistemas *in vitro* selectos, para producción de pigmentos betaláinicos.

Especie	Tipo de cultivo	Pigmentos producidos	Contenido de pigmentos
<i>B. vulgaris</i> var. Boltardy	Raíces pilosas	betacianinas	0.7 mg/g pf
		betaxantinas	1.3 mg/g pf
<i>B. vulgaris</i> L. cv. Detroit Dark Red	Células en suspensión	betacianinas	22 mg/g ps
<i>B. vulgaris</i> L. var. Ruby Queen	Raíces pilosas	betacianinas	202 mg/L
<i>B. vulgaris</i> var. bikores monogerm	Cultivo de callo:		
	* fenotipo amarillo	betaxantinas	4.3 µmol/g ps
	* fenotipo naranja	betaxantinas	12.2 µmol/g ps
	* fenotipo rojo	betacianinas	11.2 µmol/g ps
* fenotipo violeta	betacianinas	28.0 µmol/g ps	
<i>B. vulgaris</i> L. var. altissima	Callo transformado	betacianinas	13.8 mg/g ps
<i>Myrtillocactus geometrizans</i> (Mart. ex. Pfeiff) Console	Tejidos de tallo	betalaínas	-
<i>Chenopodium rubrum</i> L.	Células en suspensión	betacianinas	3-4 mg/g ps
<i>Portulaca grandiflora</i> Hook	Células en suspensión	betaxantinas	-
<i>Portulaca</i> sp.	Células en suspensión	betacianinas	5.3 mg/g pf
<i>Mammillaria candida</i>	Cultivo de callo	Betaxantinas modificadas	-

Tomada y modificada de Pavokovi y Krsnik-Rasol 2011. Pf: peso fresco, ps: peso seco

Los pigmentos betaláinicos, son pigmentos solubles en agua debido a que su esqueleto básico generalmente se encuentra acilado con una o más cadenas polares (ej: glucósidos). Además, dependiendo del pH, el átomo de oxígeno del heterociclo puede estar cargado positivamente. De aquí que se recomienda la extracción con agua, metanol, etanol u otros solventes polares, en obscuridad y a bajas temperaturas. Después de la extracción es recomendable hacer una prepurificación del extracto por extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) en Sephadex, Amberlita XAD-7 o minicolumnas C18 activadas con metanol acidificado. Por su naturaleza estructural, las betalaínas son compuestos básicos y se pueden lograr buenas purificaciones con una ligera acidificación con ácido clorhídrico o etanol acidificado (0.4 a 1 % de HCl) (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003; Schoefs 2005).

Las metodologías comunes usadas en el análisis de betalaínas han incluido separaciones analíticas como electroforesis y cromatografía en capa fina (TLC). En la purificación preparativa, se recomienda el uso de intercambio iónico seguido por cromatografía en

columna usando poliamida, Polyclarc-AT o polivinilpirrolidona, Sephadex G-15 y G25. Actualmente el método de elección es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con soportes en fase reversa (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003).

Para la cuantificación de los pigmentos betalaínicos, se han usado espectroscopía UV-visible y métodos matemáticos, utilizando sus máximos de absorción en la región visible; el procedimiento es rápido y preciso y no se requiere separación alguna. La metodología de la HPLC permite se acople a arreglo de diodos, espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear para la cuantificación y caracterización de estos compuestos, de tal forma que la separación y cuantificación de éstos pueda realizarse simultáneamente (Delgado-Vargas & Paredes-López 2003).

1.3.2. Cactáceas: fuente potencial de betalaínas

Las cactáceas son un grupo de plantas de variada morfología; tallos cilíndricos, globulares o planos; con formas de vida arborescentes, columnares, globulares, barreliiformes y articuladas. Son plantas suculentas, con hermosas flores y su metabolismo fotosintético tipo CAM les confiere una gran adaptación al ambiente árido, lo cual ha favorecido la aparición de regiones de una gran riqueza biológica (Ortega-Baes *et al.* 2010).

Estas plantas son en su mayoría endémicas del hemisferio occidental; México es considerado uno de los centros de diversidad de esta familia. Dicha familia, según datos recientes, comprende 124 géneros y 1427 especies (Ortega-Baes *et al.* 2010), aunque en algún momento se llegó a afirmar que estaba conformada por alrededor de 2000 especies (Prieto-García *et al.* 2006). En nuestro país se han localizado 586 especies de cactáceas (Ortega-Baes *et al.* 2010), y se estima que un poco más del 70 % son endémicas. Se encuentran distribuidas en regiones áridas y semiáridas del país que representan cerca de la mitad del territorio mexicano y contienen el 20 % de la flora nacional (Goettsch & Hernández 2006).

El desierto Chihuahuense es uno de los ambientes áridos más importantes de Norteamérica; cubre el 20.6 % del territorio de nuestro país y se extiende al sur de Texas, Nuevo México y Arizona en los Estados Unidos de América. Se tienen a la fecha, identificadas 329 especies de cactáceas en este desierto, lo que representa cerca del 22 % del total de esta familia.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Este lugar es por lo tanto el centro de especies de cactáceas de mayor riqueza en el mundo (Goettsch & Hernández 2006).

Las cactáceas se han usado desde la época prehispánica en rituales, en la medicina tradicional, así como alimento para humanos y ganado (Jiménez-Sierra & Eguiarte 2010; Shetty *et al.* 2012). Han llamado la atención por sus características fisiológicas y las adaptaciones que han desarrollado a las condiciones en las que crecen. Los fitoquímicos que producen, incluyen mucílagos, fibras, pigmentos y antioxidantes, por mencionar algunos. Dentro de los grupos de compuestos identificados hay carotenoides, betalainas, alcaloides, compuestos fenólicos (como los flavonoides), carbohidratos complejos, vitamina C, entre otros. Estos fitoquímicos, varían con la especie, la variedad, el tipo de tejido, el estado de desarrollo de la planta, las condiciones ambientales, entre otros factores (Anderson 2001; Nazareno & Padrón-Pereira 2011). A pesar de esto, hay muchos fitoquímicos que no se han investigado suficientemente en estos materiales, debido a la falta de herramientas de análisis adecuadas o de estándares.

Las cactáceas han servido para tratar enfermedades por cientos de años, se han usado cladodios, frutos, semillas y flores; para enfermedades urinarias, del riñón, en cáncer de próstata, para controlar niveles de azúcar y colesterol, en problemas estomacales, etc. (Nazareno 2014). Las hojas jóvenes de estas plantas son usadas para preparar platillos, ensaladas o directamente para alimentar el ganado; sus frutos, tiernos o inmaduros permiten preparar diversos postres. Eran usadas por nuestros ancestros por sus propiedades estimulantes del sistema nervioso, por ser reguladoras de la presión sanguínea, el sueño, el hambre, entre otros efectos. Han servido también como tintes por la capacidad que tienen sus pigmentos o los productos obtenidos de estas plantas, de impartir color a diversos productos, no terminando ahí sus aplicaciones (Shetty *et al.* 2012).

Se ha observado también, que las cactáceas tienen la capacidad de fijar el suelo y prevenir la erosión, a la vez de que sirven como cercas vivas. Algunas otras especies presentan flores de exquisita belleza que las hacen muy apreciadas por los coleccionistas. Sus múltiples usos, además de la destrucción de su hábitat por el sobrepastoreo y las necesidades antropogénicas, han provocado la reducción de sus poblaciones en los ambientes naturales.

La mayoría de estas plantas por su metabolismo, presentan una capacidad reducida para reestablecerse demográficamente, al ritmo acelerado de las perturbaciones externas, lo cual las ha clasificado como uno de los grupos más amenazados del reino vegetal (Hernández & Godínez-A. 1994; Prieto-García *et al.* 2006; Jiménez-Sierra & Eguiarte 2010).

Para ejercer control sobre el comercio ilegal, se encuentra la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), que cita en sus apéndices las especies que se encuentran amenazadas; algunas aparecen en el apéndice I, porque su comercio es prohibido, y todas se citan en el Apéndice II, para regular su comercio y evitar su posible amenaza (CITES 2015). A su vez, la Lista Roja de Especies Amenazadas, de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales (IUCN) categoriza a las especies por su riesgo relativo de extinción a nivel global (IUCN 2014) e incluye alrededor de 104 especies de cactáceas como especies vulnerables (Ortega-Baés *et al.* 2010).

En México se cuenta con la NOM-059-SEMARNAT-2010 para proteger a las diferentes especies de flora y fauna del país que se encuentran en riesgo; y aunque las cactáceas se encuentran bajo protección especial, según esta norma, una buena parte de las especies se encuentran amenazadas o en peligro de extinción (SEMARNAT 2010). Debido a esto, se requieren estrategias adecuadas para asegurar su protección y explotación de una manera controlada y sustentable. La biotecnología posee herramientas que pueden proporcionar alternativas de conservación y aprovechamiento, para atacar esta problemática.

Por lo anterior, es importante conservar y aprovechar de una manera adecuada la riqueza vegetal, y elaborar productos de alto valor agregado. Por esas y otras razones, se propone en este trabajo el estudiar el potencial de las cactáceas, como fuentes alternativas en la obtención de pigmentos betalaínicos, para su utilización como colorantes naturales, utilizando las herramientas biotecnológicas para su aprovechamiento de una manera sustentable.

1.3.3. Cactáceas utilizadas en esta investigación

Para este proyecto se utilizaron raíces transformadas de algunas especies de cactáceas, obtenidas del banco de germoplasma *in vitro*, de la unidad de Biotecnología Vegetal de La Universidad Autónoma de Aguascalientes (ver apartado 5.2 para más información). En los siguientes párrafos, se describen brevemente sus principales características, y algunos otros datos de interés sobre estas plantas.

Echinocactus platyacanthus

Planta de la familia de las cactáceas conocida comúnmente como biznaga, biznaga dulce, biznaga gigante o biznaga burra. Su tallo es globoso, gruesamente columnar; de color verde oscuro, con costillas gruesas (Figura 6). Tiene espinas largas y gruesas en sus areolas. Los ejemplares adultos llegan a medir de 50 cm a 2 m de altura con 40 a 90 cm de diámetro. Presentan ápice hundido, con abundante lana amarillenta que forma una zona circular o elíptica. Las flores son diurnas de 5 a 7 cm de diámetro y de color amarillo brillante. El fruto es seco, largamente oblongo, de 5 a 7 cm de longitud, amarillento, con escamas numerosas, con lana y pelos axilares cubriendo las paredes del fruto. Las semillas son negras de alrededor de 2.5 mm de longitud. Su crecimiento es lento, son monopódicas pero su meristemo apical al ser dañado produce ramificación del tallo (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada R. 1991; Jiménez-Sierra & Eguiarte 2010).



Figura 6. *Echinocactus platyacanthus* (Tomada de Anderson 2001).

Es una planta endémica del desierto Chihuahuense en México. Tiene usos en ornamentación, como forraje y para el consumo humano (acitrón, dulce tradicional). Se puede localizar en los estados de Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (Jiménez-Sierra & Eguiarte 2010). La legislación mexicana, debido a su uso extendido, la ha clasificado como especie en riesgo y sujeta a protección especial según se especifica en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2010).

Escobaria chaffeyi (E. dasyacantha spp. chaffeyi)

Cactácea de tallo cilíndrico corto, de 6 a 12 cm de altura y 5 a 6 cm de diámetro, casi cubierto por las espinas (Figura 7). Su tubérculo es corto, con surco angosto de color verde pálido. Presenta espinas diferenciadas en radiales y centrales (las centrales son más cortas que las radiales, con la punta parda a negra). Sus flores son de 15 mm de longitud, de color crema, a veces purpúreo. Sus frutos son de 2 cm de longitud, de color rojo carmesí y contiene semillas negras. Se puede localizar en los estados de San Luis Potosí, Zacatecas y Coahuila (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada R. 1991), aunque se ha sugerido que solo se encuentra en Zacatecas (Anderson 2001). Esta especie es apreciada por los coleccionistas por su alto valor ornamental; se ha clasificado como especie en riesgo y está sujeta a protección especial según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2010).



Figura 7. *Escobaria chaffeyi* (Tomada de www.cactus-art.biz/schede/ESCOBARIA/photo_gallery_escobaria.htm).

***Mammillaria spachelata* var. *sphacelata*.**

Las cactáceas del género *Mammillaria* son plantas de formas globosas o cilíndricas, aisladas o cespitosas, terrestres o rupícolas, con o sin látex; presentan tubérculos bien individualizados en forma de mamilas, que están dispuestas en series de espirales; en sus axilas pueden presentar lana y cerdas; muestran espinas diferenciadas, en radiales y centrales; flores diurnas, una en cada axila de los tubérculos (De la Cerda Lemus 1989).

La especie *sphacelata*, presenta tallos cespitosos, ramificados, cilíndricos, de 10 a 20 cm de altura y de 2 a 3 cm de diámetro (Figura 8). Tubérculos dispuestos en series espiraladas, cónicos, con el ápice desde redondeado a obtuso, de color verde claro, ocultos por las espinas. Axilas con algo de lana y en raras ocasiones con cerdas. Espinas diferenciadas en radiales y centrales. Flores infundibuliformes (corola en forma de embudo), laterales de 15 mm de longitud, color rojo carmín. Fruto encorvado-claviforme, rojo. Semillas globosas, de color negro brillante. Se le puede localizar en los estados de Puebla y Oaxaca en zona de matorrales; por el momento no es una especie que se encuentre amenazada (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada R. 1991).

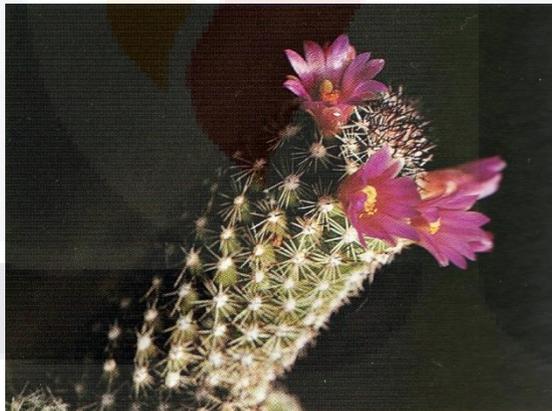


Figura 8. *Mammillaria spachelata* var. *sphacelata* (Tomada de Anderson 2001).

Turbnicarpus laui

Planta solitaria, globosa achatada, verde-amarillenta de 0.5 a 1.5 cm de altura y 1.2 a 3.5 cm de diámetro (Figura 9). Tubérculos amplios cónicos, de 3 a 5 mm de altura. Espinas radiales blancas parduzcas más o menos derechas de 12 a 22 mm de longitud. Flores blancas con tinte rosado, de alrededor de 2.5 cm de largo por 3.5 cm de diámetro. Frutos

verdosos a cafés, ligeramente elongados de 5 a 7 mm de longitud y 5 mm de diámetro. Semillas de 1.1 mm de longitud, negras. Se localiza en San Luis Potosí creciendo en matorrales rosetófilos (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada R. 1991; Anderson 2001).



Figura 9. *Turbinicarpus laui* (Tomada de Anderson 2001).

Se encuentra bajo protección especial según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2010). Su población está disminuyendo debido a colecta ilegal e incendios. Su distribución es altamente dependiente de las condiciones edáficas. Se le puede localizar solo en la localidad de Cerritos y Villa Juárez en San Luis Potosí, a 100 m snm en una pequeña extensión de algunos kilómetros. Crece en suelo calcáreo y descubierto, en zonas de matorral. Se encuentra clasificada como especie críticamente amenazada, según la IUCN en su Lista Roja de Especies Amenazadas (Fitz-Maurice *et al.* 2013b).

Turbinicarpus lophophoroides

Nombre común Biznaguita. Es una planta simple, de tallo globoso y algo aplanado, de alrededor de 3.0 cm de altura y de 4.5 cm de diámetro, de color verde grisáceo; ápice, cuando está en floración, provisto de abundante lana blanca o grisácea (Figura 10). Tubérculos flojamente dispuestos en costillas, de alrededor de 3 mm de altura, con la base tetragonal o hexagonal. Espinas radiales de hasta 8 mm de longitud y una espina central de 1 cm de longitud. Flores en los tubérculos apicales, de color blanco a ligeramente purpúreo. Fruto tipo baya de color verde claro. Semillas globosas hasta ovoideas de 1.2 mm de longitud y 0.8 cm de diámetro, negras hasta de color castaño rojizo. Raíz gruesamente napiforme (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada R. 1991).

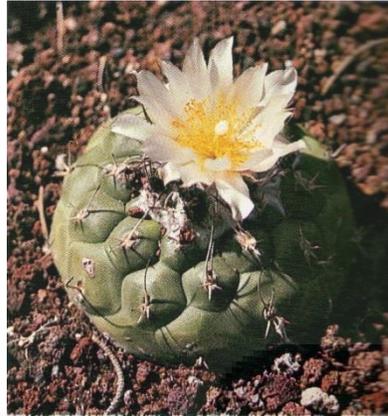


Figura 10. *Turbinicarpus lophophoroides* (Tomada de Anderson 2001).

Es una especie que se localiza en la parte sur de San Luis Potosí, entre 870 y 1150 m snm. Se le ubica en llanuras inundables en las temporadas de lluvia. Se encuentra asociada con otras especies de cactáceas y pastizales, adaptada a suelos salinos. También crece en matorrales abiertos (Flores *et al.* 2008). El tamaño de población va en decremento debido a las actividades antropogénicas, parasitismo por insectos y colecta ilegal menor. La especie es altamente dependiente de las condiciones edáficas (Smith *et al.* 2013). Al igual que muchas especies de su familia se encuentra protegida por la legislación mexicana.

Turbinicarpus pseudopectinatus

Planta solitaria, globosa, de 2 a 3 cm de alto y 2-3.5 cm de diámetro, verde azulada, aunque se observa blanca por sus densas espinas (Figura 11). De tubérculos elongados verticalmente de 3 mm de alto. Espinas radiales blancas de 1 cm de longitud. Flores blancas con nervaduras centrales rojizas a magentas. Frutos verdosos, casi redondos de 7 a 8 mm de longitud. Algunas veces se le llama peyote, pero no hay evidencia que indique sus propiedades psicotrópicas, ni usos ceremoniales (Anderson 2001).

Es una cactácea endémica del sur del desierto Chihuahuense. Se distribuye en pastizales y bosques de encino y pino. Se le encuentra asociada con especies de *Agave lechuguilla*, *Agave striata*, *Hechtia glomerata* y *Yucca carnerosana* en suelo profundo y calcáreo entre 1200 y 2000 m snm. Se distribuye en los estados de Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí (Flores *et al.* 2008). Es una planta que no se encuentra amenazada, aunque con el

número de especímenes colectados y exportados se ha reducido su población en últimas fechas. El desarrollo agrícola no parece ser problema para esta especie, sin embargo, el pisoteo por el ganado y la erosión por sobrepastoreo puede ser un problema en algunas zonas (Fitz-Maurice *et al.* 2013a). Al igual que otras especies de *Turbinicarpus* se encuentra protegida por la legislación mexicana.

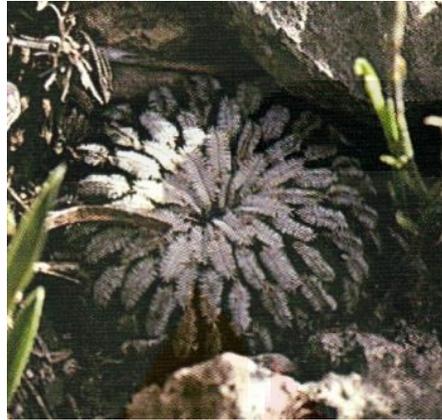


Figura 11. *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Tomada y modificada de Anderson 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

La investigación sobre la síntesis de metabolitos es escasa. La obtención de betalaínas, ha despertado un gran interés a nivel industrial, no solo por servir como colorantes naturales, sino también por sus propiedades nutraceuticas.

La Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, trabaja en la conservación y multiplicación de especies amenazadas. Se incluyen especies de la familia de las cactáceas, agaváceas y nolináceas. Cuenta con un banco de germoplasma *in vitro* del cual se obtiene el material sin necesidad de sacrificar plantas de la naturaleza. Se utilizan técnicas de clonación *in vitro* y modificación de plantas, para propagarlas en cantidades importantes y devolverlas a sus lugares de origen y evitar la desaparición de especies, para mejorarlas, hacerlas más productivas u obtener productos útiles a partir de ellas.

En el caso de cactáceas, se viene trabajando en el estudio de sus metabolitos (alcaloides y pigmentos, entre otros de interés). Se han desarrollado con éxito protocolos de transformación de estas especies y se ha logrado obtener materiales únicos, que incluyen raíces transformadas.

En este proyecto se pretende estudiar la generación y obtención de pigmentos betalaínicos, característicos de las cactáceas, a través de sus raíces transformadas. El cultivo de este tipo de raíces es una opción que se ha explorado en otras especies vegetales para obtener diversidad de metabolitos; de aquí que es evidente la necesidad de probar su potencial productor de betalaínas en diferentes condiciones de cultivo y explorar su producción a nivel de biorreactor, para generar el conocimiento necesario que permita su aprovechamiento. Los genotipos modificados a estudiar se escogieron ya que a simple vista parecen tener potencial de generar pigmentos betalaínicos.

3. HIPÓTESIS

La modificación de diversos factores, relacionados con el medio y condiciones de cultivo, afecta significativamente la producción de pigmentos betaláinicos, en cultivos de raíces transformadas de varias especies de cactáceas; el cultivo en biorreactor puede convertirse en una fuente potencial de estos pigmentos.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar el efecto de diversos factores sobre la producción de pigmentos betalaínicos en cultivos de raíces transformadas de varias especies de cactáceas, y analizar la producción de estos pigmentos en algunos de estos cultivos una vez llevados a biorreactores.

4.2. Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar la producción de betalaínas en líneas de raíces transformadas de varias especies de cactáceas.
- 2.- Conocer el efecto de algunos factores, en la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro*. Entre los factores a probar se proponen:
 - a) Diferente medio basal
 - b) Reguladores de crecimiento
 - c) Complementos nutritivos o complejos orgánicos en el medio de cultivo
 - d) Precursores directos de la ruta biosintética de las betalaínas
 - e) Diversos tipos de estrés al cultivo para incitar la producción de metabolitos
- 3.- Escalar los cultivos a nivel de biorreactor y verificar que mantienen su capacidad de producir betalaínas

4.3. Metas

- 1.- Se caracterizará la producción de betalaínas en líneas de raíces transformadas de al menos cuatro especies de cactáceas.
- 2.- Se analizarán líneas transformadas de al menos dos especies, seleccionándose las que hayan generado los resultados más interesantes en cuanto a cantidad y tipos de betalaínas producidas.
- 3.- Se trabajará con las raíces de al menos una especie, seleccionándose la que presente la mayor producción de pigmentos y se cultivará en biorreactores.

5. METODOLOGÍA

5.1. Metodología general de trabajo

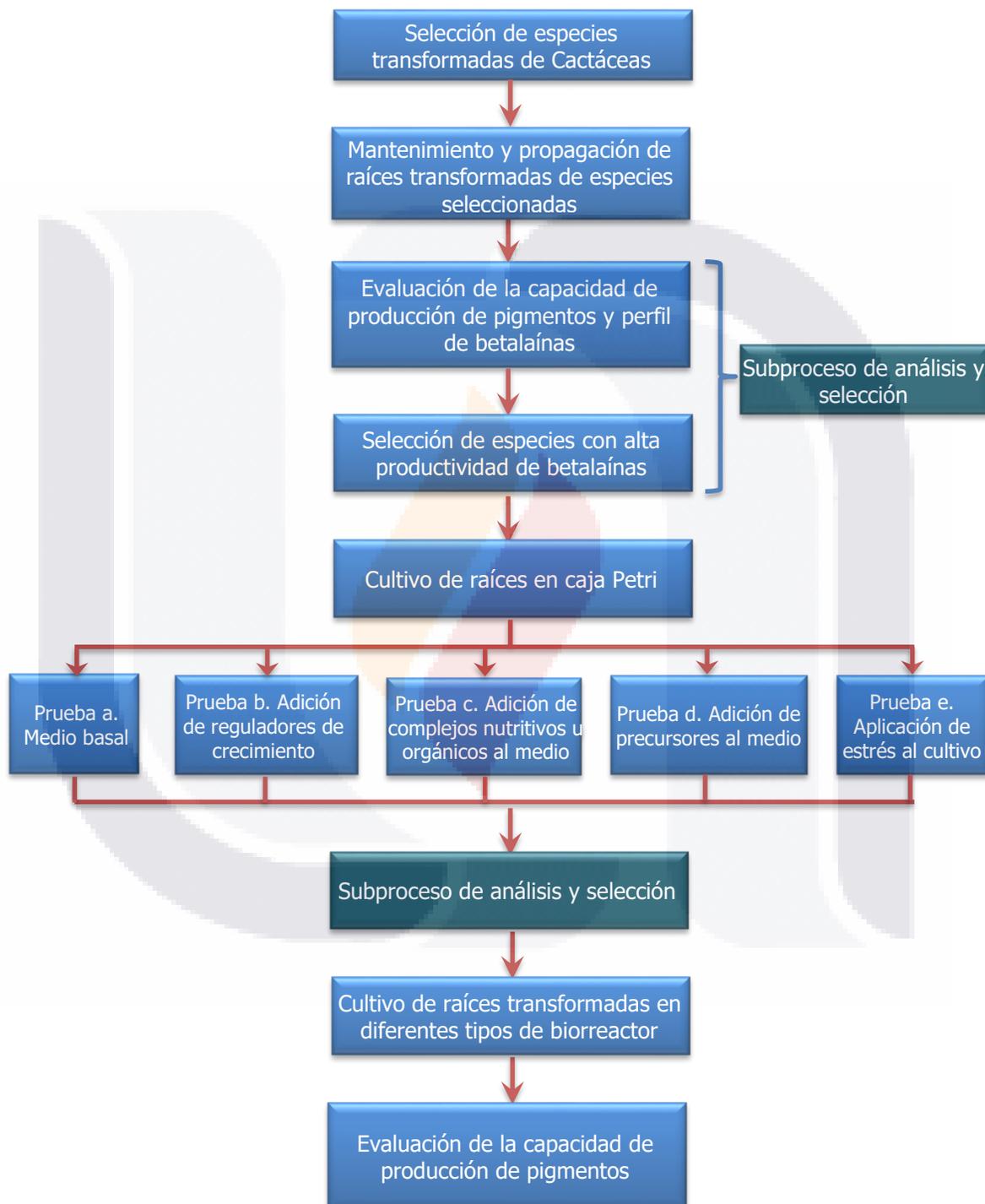


Figura 12. Diagrama de flujo general.
Se muestran las operaciones que constituyen el procedimiento de trabajo general del proyecto de tesis.

Con el fin de explicar con mayor detalle lo que se realizará en las diferentes etapas, el presente proyecto se divide en procesos y subprocesos (Figura 12 y Figura 13).

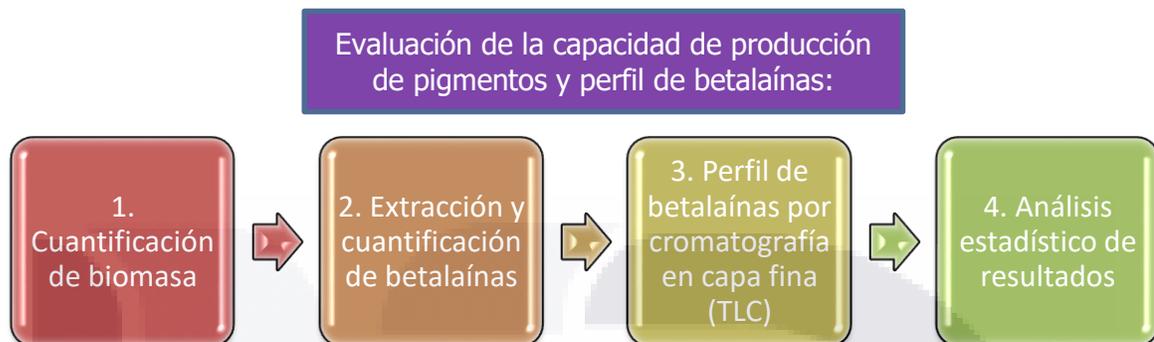


Figura 13. Diagrama de flujo del subproceso de análisis y selección.

5.2. Material vegetal

Se trabajó con raíces transformadas de las especies de cactáceas: *Echinocactus platyacanthus*, *Escobaria chaffeyi*, *Mammillaria sphacelata* var. *sphacelata*, *Turbinicarpus laui*, *Turbinicarpus lophophoroides* y *Turbinicarpus pseudopectinatus*. Estas especies se obtuvieron del Banco de Germoplasma *in vitro*, de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Dichas plantas fueron transformadas con la cepa de *Agrobacterium rhizogenes* A4/pESC4 y fueron mantenidas en condiciones *in vitro* hasta su uso, para evitar la pérdida del material vegetal generado. Estos materiales se seleccionaron por su visible capacidad de producir pigmentos presumiblemente de tipo betalaínico.

5.2.1. Mantenimiento y propagación del material vegetal

Los cultivos de las raíces se mantuvieron en medio basal MS adicionado con 125 mg/L de cefotaxima, 30 g/L de sacarosa y 10 g/L de agar, sin reguladores de crecimiento. Se manejó un periodo de subcultivo adecuado a las necesidades de cada material, sin que se rebasaran los tres meses. Las condiciones de fotoperiodo fueron de 16 h luz/8 h oscuridad.

5.3. Extracción y cuantificación de betalaínas

Para realizar la extracción de las betalaínas, se usó la metodología propuesta por García-Cruz y colaboradores, con modificaciones (García-Cruz *et al.* 2013). Se pesaron por triplicado 2.0 g de material fresco, se agregaron 10 mL de una solución de metanol: agua (80:20 v/v) y se molieron perfectamente en un mortero. Las mezclas resultantes se transfirieron a tubos de plástico de 50 mL, se sonicaron por 10 min., y después se colocaron en agitación por otros 20 min. De ahí se llevaron a centrifugación a 2200 x g por 10 min. El sobrenadante se recuperó y se procedió a realizar una segunda extracción en el material residual, con la misma cantidad de solvente y los pasos de sonicación-agitación-centrifugación anteriormente establecidos. Se reunieron los sobrenadantes de ambas extracciones, se filtraron en papel Ahlstrom 631 y los extractos obtenidos se almacenaron en tubos de plástico protegidos de la luz.

El procedimiento de extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para evitar el deterioro de los pigmentos betalaínicos. Los extractos se almacenaron a -20 °C para su uso posterior. La cuantificación de las betalaínas se realizó por espectrofotometría a partir del extracto metanólico obtenido, se leyeron las absorbancias a 538 nm para determinar betacianinas y a 483 nm para determinar betaxantinas. Los resultados se calcularon usando la siguiente fórmula (Castellanos-Santiago & Yahia 2008):

$$B = (A \times DF \times MW \times V \times 100) / (\epsilon \times W \times L),$$

Donde

B = contenido de betacianinas o betaxantinas, en mg equivalentes de pigmento/100 g peso fresco

A = absorbancia a 538 nm para betacianinas o 483 nm para betaxantinas

DF = factor de dilución al momento de la lectura

MW = peso molecular de betanina (550 g/mol) o indicaxantina (308 g/mol)

V = volumen de la solución (mL)

ϵ = coeficiente de extinción molar para betanina (60,000 L/mol·cm) o para indicaxantina (48,000 L/mol·cm)

W = peso del material (g)

L = longitud de la celda (1 cm)

5.4. Perfil de extractos betalaínicos por cromatografía en capa fina (TLC)

Para la cromatografía en capa fina se utilizó la metodología propuesta por Contreras-Ovalle (Contreras-Ovalle 2011b). Se utilizaron los extractos metanólicos obtenidos en la etapa de extracción de betalaínas y se determinó el perfil de dichos extractos, enfocándose en la observación de los patrones de bandas característicos de los pigmentos betalaínicos (betacianinas y betaxantinas). Se utilizaron placas para TLC de sílica gel de 10 x 5 cm., y una mezcla de elusión cuaternaria de 2-propanol-etanol-agua-ácido acético (24.75: 35: 40: 0.25). Se utilizaron extractos concentrados, que se obtuvieron evaporando al vacío buena parte del solvente de extracción, y se aplicaron en la cantidad necesaria, a 1 cm del margen de la placa en forma de línea. El proceso se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente, hasta que el frente de corrida alcanzó los 9 cm. contados desde el margen de la placa (8 cm. desde el punto de aplicación).

Se identificó visualmente la presencia de bandas características para betacianinas y betaxantinas, utilizándose como referencia los extractos de tuna roja y betabel (con betalaínas ya caracterizadas), obtenidos de vegetales del mercado local. Se determinaron además los factores o coeficientes de retardo (R_f) en donde fue posible, para su comparación.

5.5. Cinéticas de crecimiento y producción de raíces transformadas de cactáceas

Preparación del medio.

Se usó medio MS (Murashige & Skoog 1962) adicionado con 3% de sacarosa, 8 g/L de agar como agente gelificante y se ajustó a un pH de 5.7 antes de llevarlo a autoclave. Se agregaron 125 mg/L de cefotaxima y se vaciaron 25 mL de medio en cajas Petri estériles desechables.

Inoculo y condiciones de cultivo.

Se inocularon 2.0 ± 0.5 g de raíces transformadas de las diferentes especies de cactáceas por caja, se sellaron y se almacenaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Determinación de peso en fresco

Se tomaron muestras por triplicado de las raíces de las diferentes especies y siguiendo la metodología de Suresh *et al.* (2004), se extrajeron del medio de cultivo y se eliminó la humedad superficial de los tejidos con gasa; se pesaron y se obtuvo el peso en fresco final (PFF), a diferentes tiempos (cada 5 días) durante el desarrollo de los cultivos.

Determinación de peso seco y humedad

Por otra parte, se tomaron algunas muestras de las raíces, se pesaron y se llevaron a $60 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 hrs., después de este proceso volvieron a pesarse y se obtuvo el valor de la humedad y el peso en seco para cada especie vegetal (Suresh *et al.* 2004). Se obtuvo el peso seco final (P_2) al tiempo t_2 , y el peso seco al inicio (P_1) en el tiempo t_1 , para cada especie vegetal, y con esto se calcularon los siguientes índices de crecimiento:

$$\text{Velocidad específica de crecimiento } (\mu) = \frac{\ln P_2 - \ln P_1}{t_2 - t_1} \text{ (Hoffmann \& Poorter 2002)}$$

$$\text{Tiempo de duplicación (Td)} = \ln 2 / (\mu) = 0.693 / \mu \text{ (Jeong } et al. 2009)$$

Determinación de la concentración de pigmentos betaláinicos

Para obtener las cinéticas de producción, se tomaron muestras por triplicado y se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betaláinicos, según la metodología propuesta en el punto 5.3. Se evaluó el cambio de concentración de betacianinas y de betaxantinas en material vegetal fresco, durante el desarrollo de los cultivos, en los mismos tiempos en los que se determinó el peso fresco final.

Determinación del tiempo óptimo de cosecha.

Se determinó el tiempo óptimo de cosecha de las raíces (en días), con las cinéticas de crecimiento y producción. Se tomó en cuenta el crecimiento máximo y la producción máxima

de betalaínas en las distintas especies vegetales analizadas. Estos datos se utilizaron para delimitar el tiempo de cultivo en las diferentes pruebas a realizar durante el proyecto.

5.6. Efecto del tipo de medio basal en la producción de betalaínas en raíces transformadas de cactáceas (RTC)

Se cultivaron las raíces transformadas de las especies seleccionadas en siete diferentes medios basales: B5 (Gamborg *et al.* 1968), DKW (Driver & Kuniyuki 1984), Heller (Heller 1953), MS (Murashige & Skoog 1962), N6 (Chu *et al.* 1975), White (White 1963), y Westvaco WV3 (Coke 1996), para determinar la capacidad de crecimiento y de producción de pigmentos betalaínicos. Todos los medios se complementaron con 3 % de sacarosa y 8 g/L de agar como agente gelificante. Se agregaron las vitaminas del medio MS (10 mL/L) y se ajustó el pH a 5.7 antes de llevar a la autoclave. Se agregó a cada medio 125 mg/L de cefotaxima y se vaciaron en cajas Petri estériles desechables conteniendo al final 25 mL de medio semisólido. Las cajas fueron inoculadas con 1.5 ± 0.2 g de raíces transformadas de las diferentes especies, se sellaron y se incubaron a 25 °C, bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

Al realizarse la cosecha de los diferentes materiales a los 45 días de cultivo, se determinó el PFF y de aquí se calculó la ganancia en peso fresco (GPF), tomando en cuenta el Peso Fresco inoculado al Inicio (PFI) con la fórmula:

$$GPF = PFF - PFI,$$

Enseguida se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betalaínicos en cada una de las muestras y se llevó a cabo la separación e identificación de dichos pigmentos en TLC.

5.7. Efecto que tienen diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la producción de betalaínas en RTC

En esta prueba se utilizaron tres auxinas: a) ácido indolacético (AIA), b) ácido indolbutírico (AIB), c) ácido naftalenacético (ANA); y tres citocininas: a) meta-Topolina (MT), 2-isopentiladenina (2IP) y benciladenina (BA). Se hicieron además algunas combinaciones

auxina-citocinina a) AIA-MT, b) AIB-2IP, c) ANA-BA. En total se probaron dieciséis tratamientos de acuerdo a lo establecido en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal

T1 Testigo		
T2 AIA (5)	T3 AIB (5)	T4 ANA (5)
T5 MT (5)	T6 2IP (5)	T7 BA (5)
T8 AIA - MT (3 - 7)	T9 AIA - MT (5 - 5)	T10 AIA - MT (7 - 3)
T11 AIB - 2IP (3 - 7)	T12 AIB - 2IP (5 - 5)	T13 AIB - 2IP (7 - 3)
T14 ANA - BA (3 - 7)	T15 ANA - BA (5 - 5)	T16 ANA - BA (7 - 3)

T: Tratamiento. Testigo: medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal. AIA: ácido indolacético, AIB: ácido indolbutírico, ANA: ácido Naftalenacético, MT: meta-topolina, 2IP: 2-isopentiladenina, BA: benciladenina. () Concentración(es) μM .

Como inoculo, se utilizaron 1.5 ± 0.2 g de raíces transformadas de las distintas especies, se agregaron a las cajas Petri con 25 mL de medio MS (3 % sacarosa, 8 g/L de agar, 125 mL/L de cefotaxima) previamente preparado según los diferentes tratamientos, se sellaron y se incubaron a 25 °C, bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Después de cumplido su tiempo de cultivo (45 días), se recolectaron las muestras de los diferentes tratamientos y se determinó el PFF y la GPF; se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betalaínicos y se determinó el perfil por TLC.

5.8. Efecto de la adición de diferentes complejos nutritivos al medio, sobre la producción de betalaínas en RTC

En esta prueba se utilizó medio MS (3 % sacarosa, 8 g/L agar) y se utilizaron cinco diferentes complejos nutritivos: a) coco en polvo (C), b) extracto de levadura (L), c) extracto de malta (M), d) hidrolizado de caseína (HC), e) plátano en polvo (PP). Estos complejos se agregaron a dos concentraciones distintas, dependiendo del complejo nutritivo (Tabla 4). En total se probaron once tratamientos.

Tabla 4. Tratamientos con complejos nutritivos

Tratamiento	B (Testigo)	CP (Coco en Polvo)		EL (Extracto de Levadura)		EM (Extracto de Malta)		HC (Hidrolizado de Caseína)		PP (Plátano en Polvo)	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Concentración (g/L)	-	30	10	3	0.5	1	0.2	1	0.1	30	10

Testigo: medio MS sin complejos nutritivos

Como inóculo, se utilizaron 1.5 ± 0.2 g de raíces transformadas de las distintas especies; se agregaron a las cajas Petri con 25 mL de medio MS previamente preparado según los diferentes tratamientos, se sellaron y se incubaron a 25 °C, bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Después de cumplido su tiempo de cultivo (45 días), se recolectaron las muestras de los diferentes tratamientos y se determinó el PFF y la GFP; se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betalaínicos y se determinó el perfil por TLC.

5.9. Efecto de la adición de precursores de la ruta biosintética sobre la producción de betalaínas en RTC

En esta prueba se utilizó medio MS (3 % sacarosa, 8 g/L agar) y se adicionaron dos aminoácidos involucrados directamente en la ruta biosintética de las betalaínas: prolina (P) y tirosina (T). Estos aminoácidos se usaron a dos concentraciones: 1 mM y 0.1 mM. Se preparó también una mezcla equimolar de prolina y tirosina (P-T) con concentraciones de 0.5 mM para cada aminoácido, para observar el efecto combinado. En total se probaron 6 tratamientos de acuerdo a la Tabla 5.

Tabla 5. Tratamientos con precursores de la ruta biosintética

B Testigo	PA Prolina (1 mM)	PB Prolina (0.1 mM)
P-T Prolina-Tirosina (0.5-0.5 mM)	TA Tirosina (1 mM)	TB Tirosina (0.1 mM)

Testigo: medio MS sin precursores.

Como inóculo, se utilizaron 1.5 ± 0.2 g de raíces transformadas de las distintas especies; se agregaron a las cajas Petri con 25 mL de medio MS previamente preparado según los diferentes tratamientos, se sellaron y se incubaron a 25 °C, bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Después de cumplido su tiempo de cultivo (45 días), se recolectaron las muestras de los diferentes tratamientos y se determinó el PFF y la GPF; se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betalaínicos y se determinó el perfil por TLC.

5.10. Efecto de la luz sobre la producción de betalaínas en RTC

En esta prueba se utilizó medio MS (3 % sacarosa, 8 g/L agar). Se utilizaron tres condiciones de luminosidad diferentes: Como testigo luz fluorescente (LF, lámpara Magg F21T5 21W/4100K), luz fotosintéticamente activa (LRA, lámpara led T8 24W rojo:azul=1:8, longitud de onda=620-630 nm [rojo] y 460-470 nm [azul]) y oscuridad (OS). Como inóculo, se utilizaron 1.5 ± 0.2 g de raíces transformadas de las distintas especies; se agregaron a cajas Petri con 25 mL de medio MS, se sellaron y se incubaron a 25 °C, bajo las condiciones de luminosidad especificadas. Las que se cultivaron bajo luz de algún tipo, tuvieron un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Después de cumplido su tiempo de cultivo (45 días), se recolectaron las muestras de los diferentes tratamientos y se determinó el PFF y la GPF; se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betalaínicos y se determinó el perfil por TLC.

5.11. Efecto del estrés abiótico sobre la producción de betalaínas en RTC

Para esta prueba se utilizaron 25 mL de medio MS (3 % sacarosa, 8 g/L agar) en caja Petri, 1.5 ± 0.2 g de raíces transformadas de las diferentes especies y se probaron cuatro factores para incitar a los cultivos:

Irradiación (Luz), sometiendo a los cultivos a dos tratamientos (A: Irradiancia de 44000 ± 9000 W/m² con luz fluorescente y B: luz UV con una irradiancia de 2.2 W/m² (con una lámpara germicida de 15 W [General Electric, modelo G15T18] a una distancia de 54 cm de

la fuente), por 4 horas para luz fluorescente y 20 min para luz UV (en su periodo de luz) y después del día 17 de cultivo, después de estos tratamientos se regresaron a las condiciones de cultivo de referencia; **Temperatura**, sometiendo a los cultivos a dos condiciones de temperatura (A: 40 ± 1 °C y B: 10 ± 1 °C), por 4 horas de su periodo de luz y después del día 17 de cultivo para tenerlos en su fase de crecimiento exponencial, después de esta variación se regresaron a las condiciones de cultivo de referencia; **Déficit hídrico**, agregando polietilenglicol 8000 (PEG) al medio en dos concentraciones (A: 1000 μ M y B: 500 μ M) también desde el inicio del cultivo; **Salinidad**, agregando NaCl al medio en dos concentraciones (A: 50 mM y B: 25 mM) desde el inicio del cultivo.

En todos los casos las **condiciones de cultivo de referencia (Testigo)** fueron medio MS mantenido a 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y una irradiancia de 11000 ± 1800 W/m² con luz fluorescente (flujo de fotones de 53.2 ± 8.4 μ moles/m²/s). Después de cumplido su tiempo de cultivo de 45 días, se cosecharon las muestras de los diferentes tratamientos y se determinó el PFF y la GPF, se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betalaínicos y se determinó el perfil por TLC. El objetivo de estos experimentos fue exponer a las raíces de cactáceas a diferentes tipos de estrés, a fin de simular algunas de las condiciones a las que se enfrentan en su ambiente natural.

5.12. Cultivo de RTC en biorreactores

Para verificar la capacidad de producción de pigmentos betalaínicos a nivel biorreactor y determinar si alguno de los sistemas probados era más adecuado, se cultivaron raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophoroides* en medio MS líquido (30 % sacarosa), a 25 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, bajo luz fluorescente (flujo de fotones de 36.4 ± 5.6 μ moles/m²/s) en dos tipos de biorreactores: a) uno con un sistema de inmersión temporal automatizado (RITA®, Marca Vitropic modelo R01B, con un tiempo de inmersión de 5 min y 175 min de tiempo de espera y b) un sistema tipo tanque agitado (TA, Marca Thermo Scientific Nalgene No. 2605-0001) con agitación continua a 60 ± 5 rpm. El inóculo en peso fresco (gramos de raíz/litro de medio) para estos biorreactores fue de 7.5 g/L, colocándose en el RITA® 1.50 \pm 0.05 g de raíces con 200 mL de medio y en el TA 3.35 \pm 0.05 g de raíces con 450 mL de medio.

Después de cumplido su tiempo de cultivo de 45 días, se cosecharon las muestras de los diferentes sistemas, se determinó el PFF y posteriormente se realizó la extracción y cuantificación de pigmentos betalaínicos. Para evaluar el rendimiento de biomasa en cada sistema, se calculó el Índice de Crecimiento en Fresco (ICF) según la fórmula:

$$\text{ICF} = (\text{PFF} - \text{PFI}) / \text{PFI} \text{ (Jacob \& Malpathak 2005);}$$

El inóculo de *T. lophophoroides*, se obtuvo de material que previamente había logrado crecer en medio líquido (0.5 g de raíces transformadas con 20 mL de medio MS líquido [30 % sacarosa], en frascos de vidrio de 100 mL, en agitador orbital a 80 rpm, bajo luz fluorescente, T= 25 °C y fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad).

5.13. Análisis estadístico de datos

Para el análisis estadístico de los datos, obtenidos en las diferentes pruebas, se utilizó el programa Minitab® 16.2.2. En su mayoría, se utilizó la prueba de ANOVA con un solo factor y las comparaciones múltiples de Tukey a un nivel de confianza del 95 %, y se usó un diseño completamente al azar. Cuando se utilizó alguna prueba o diseño diferente se hizo mención en el apartado correspondiente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Mantenimiento y propagación del material vegetal

Las raíces transformadas de cada especie, se subcultivaron, para propagarlas y asegurar su supervivencia y disponibilidad en cantidades suficientes para los análisis y pruebas posteriores. Se manejó un subcultivo de no más de 3 meses, dependiendo del material vegetal y sus necesidades. Al momento se tiene una buena cantidad de raíces en buenas condiciones y sin contaminación.

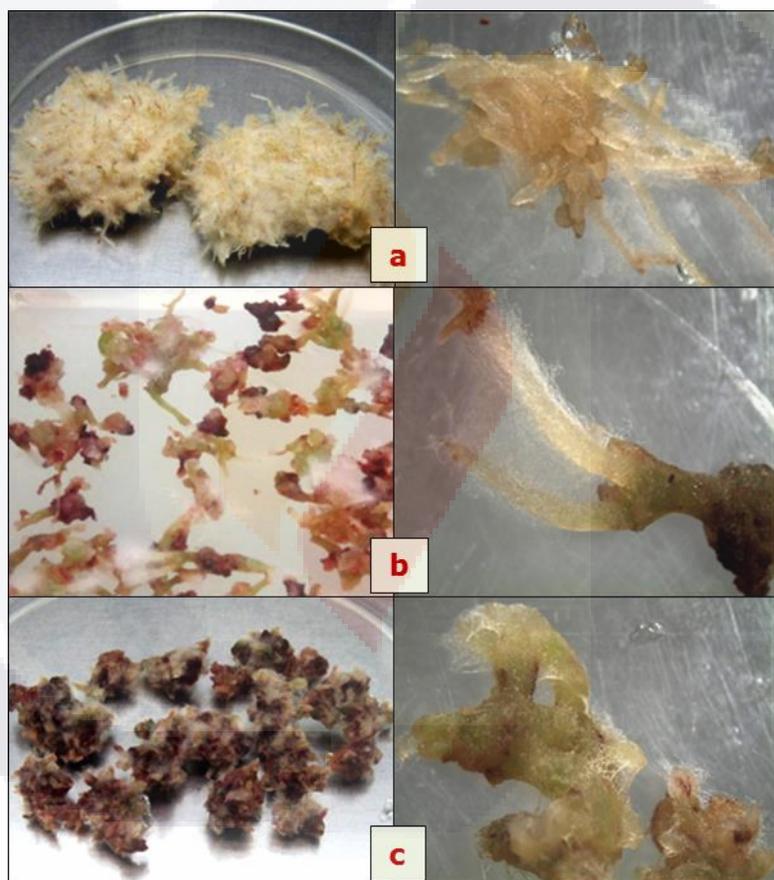


Figura 14. Materiales con los que se inició el trabajo. Raíces transformadas de: a) *Equinocactus platyacanthus*, b) *Escobaria chaffeyi*, c) *Mammillaria sphacelata* var. *sphacelata*.

Como se observa en las imágenes, los fenotipos son distintos entre especies y la heterogeneidad del material se observa entre muestras de la misma especie. *Equinocactus platyacanthus* (Figura 14a), presenta un fenotipo de raíces blancas a rojizas, bien definido, que se aglomeran y crecen semejando césped, muy compactas. La longitud de las raicillas

no rebasa los 0.5 cm. Su crecimiento es lento y su consumo aparente de medio es relativamente bajo. Cuando maduran se tornan marchitas y mueren.

La especie *Escobaria chaffeyi* (Figura 14b), presenta raicillas poco definidas y engrosadas de la base, mezcladas con callo, de colores que van desde el blanco y pasan por el verde claro, hasta el color rojo púrpura, lo que puede indicar la presencia de pigmentos presumiblemente betaláinicos. Crece tejido indiferenciado blanco que puede colorearse o diferenciarse en raíz verdosa, que puede elongarse y permanecer de este color o tornarse rojiza. Los ápices de las raíces son delgados con numerosas vellosidades, de escasos milímetros de longitud, no pasando de 0.5 cm, que pueden aparecer de tejido calloso o raíces. Su crecimiento es rápido y el consumo aparente de medio es relativamente alto. Al madurar se tornan café oscuro, se marchitan y mueren. Colorean el medio de un tono café.

La especie *Mammillaria sphacelata* var. *sphacelata* (Figura 14c), presenta raíces poco diferenciadas y engrosadas de la base, mezcladas con callo friable. De esta base aparecen los ápices radicales en gran número y con infinidad de raicillas, con colores que van del verde amarillento al rojo púrpura, lo cual parece indicar la presencia de pigmentos betaláinicos. Con longitudes que no rebasan los 0.5 cm. Su crecimiento es lento y su consumo de medio aparente es relativamente bajo. Al madurar se tornan color crema y pierden la capacidad de multiplicarse.

La especie *Turbincarpus laui* (Figura 15a), presenta un fenotipo parecido a *Mammillaria sphacelata*, con raíces poco diferenciadas más o menos gruesas, mezcladas con callo friable. De la base surgen los ápices radicales y raicillas en gran cantidad. Su coloración va desde verde claro hasta rojo o color crema, característico de las raíces normales. Con longitudes que no rebasan los 0.5 cm. Su crecimiento es acelerado y su consumo de medio es relativamente alto. Presenta algunas aglomeraciones celulares rosa-rojizas pigmentadas. Cuando llegan a su etapa adulta, se vuelven verde-grisáceas, se marchitan y mueren.

La especie *Turbincarpus lophophoroides* (Figura 15b), presenta raíces bien definidas, con algunas bases engrosadas sin callo. Los ápices radicales crecen en gran cantidad y con un alto número de raicillas. Su coloración va desde el verde claro hasta el rojo púrpura. Crecen

formando una mata de raíces con longitudes de hasta 1 cm aproximadamente, ramificándose numerosamente. Su crecimiento es lento y su consumo de medio es relativamente bajo. Cuando se encuentran en su etapa adulta, comienzan a colorearse de un tono café-rojizo, se marchitan y mueren, dejando el medio de color café claro.

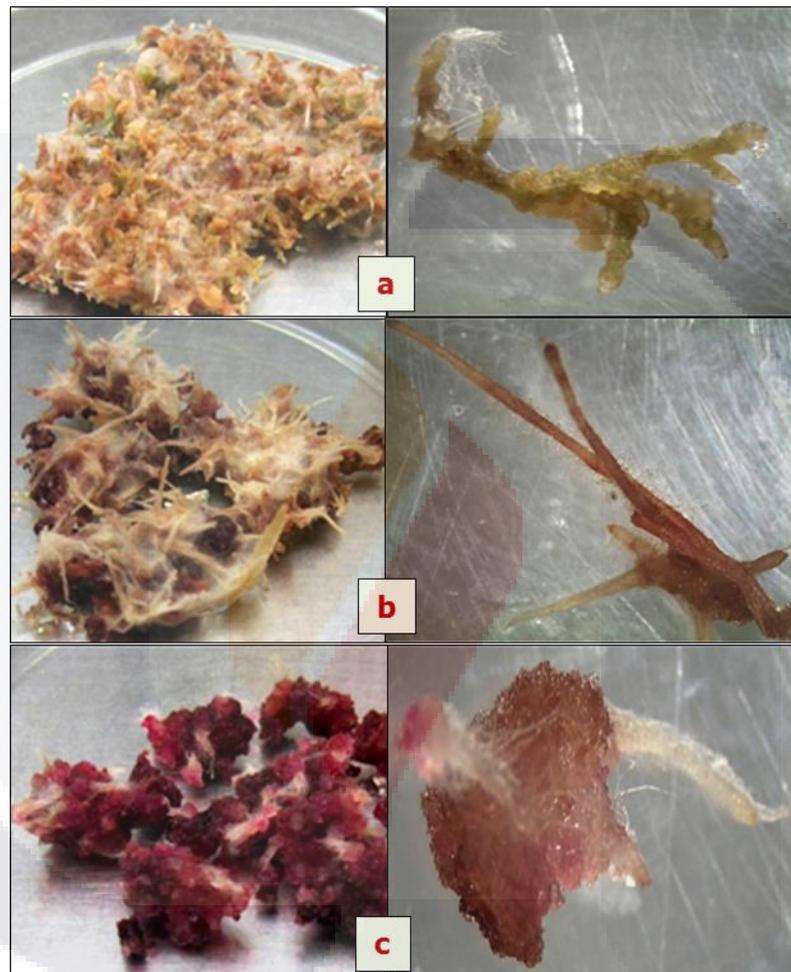


Figura 15. Materiales con los que se inició el trabajo (continuación). Raíces transformadas de: a) *Turbinicarpus laui*, b) *Turbinicarpus lophophoroides*, c) *Turbinicarpus pseudopectinatus*.

Finalmente, la especie *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Figura 15c), presenta raíces poco definidas, con callo en la base, de donde surge más callo o una gran cantidad de raíces con no más de 0.5 cm de longitud. Su coloración va desde el blanco, con algunas que pasan por el verde intenso, rosa violáceo hasta el púrpura intenso, un rojo muy oscuro en algunos tejidos, lo cual indica la gran cantidad de pigmentos que contiene el material. El tejido vegetal es poco compacto, muy suelto y ligero. Su crecimiento es rápido y su consumo de

medio es relativamente alto, ya que agota el de su recipiente casi totalmente, en el lapso de semanas.

Cuando llegan a su edad madura, se colorean intensamente desde un tono rojo-púrpura hasta casi negro. No mueren si aún conservan medio de cultivo, después de algunas semanas, comienzan a generar material de color transparente y joven, que se diferencia a raicillas y comienza nuevamente el proceso de coloración. Cuando el medio se agota se marchitan y mueren.

6.2. Cuantificación e identificación de betalaínas en materiales de inicio

Los resultados de la cuantificación de betalaínas en los materiales de inicio, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de betalaínas en raíces transformadas de cactáceas.

Especie	Betacianinas (mg EB/100 g pf)	Betaxantinas (mg EI/100 g pf)
<i>E. platyacanthus</i>	0.39 ± 0.05 c	0.57 ± 0.05 c
<i>E. chaffeyi</i>	0.78 ± 0.08 b	1.71 ± 0.16 b
<i>M. sphacelata</i> var. <i>sphacelata</i>	0.42 ± 0.02 c	1.43 ± 0.08 b
<i>T. laui</i>	1.35 ± 0.18 a	2.56 ± 0.24 a
<i>T. lophophoroides</i>	0.66 ± 0.01 b	1.62 ± 0.09 b
<i>T. pseudopectinatus</i>	0.79 ± 0.10 b	0.83 ± 0.09 c

EB: Equivalentes de betanina. EI: Equivalentes de Indicaxantina. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

Se observa que la especie *T. laui* muestra los valores más altos en ambos tipos de pigmentos betalaínicos. Las demás especies presentan valores más bajos en uno o en ambos pigmentos. Se escogieron, para realizar las demás pruebas, las especies *T. laui*, *E. chaffeyi*, y *T. lophophoroides*, tomando como base el contenido de betalaínas; se decidió agregar una más (*T. pseudopectinatus*) que aunque no tenía valores tan altos como las otras, tenía una buena cantidad de betacianinas y unas características especiales que se le han observado durante su cultivo *in vitro*, tales como crecimiento rápido, morfología homogénea

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y particular, capacidad de regeneración, alta pigmentación en estado adulto, entre otras que resultaron de interés.

Al comparar los resultados de otros autores con los obtenidos hasta el momento para estos cultivos de raíces se observa que los niveles de betalaínas totales son relativamente bajos con respecto a los reportados para algunas variedades de tuna roja y púrpura (de 7 a 114 mg/100 g de pulpa) (Stintzing *et al.* 2005), betabel (con alrededor de 50 mg/100 g de betabel fresco) (Azeredo 2009) y raíces de betabel (con alrededor de 10 - 150 mg/100 g de raíces en fresco) (Neelwarne 2012); sin embargo, son muy cercanos o ligeramente mayores a los que se han reportado en diferentes variedades de xoconostle (de 0.50 - 4.19 mg/100 g de mesocarpio fresco) (Contreras-Ovalle 2011a) y en tuna amarilla y naranja (1.46 y 1.05 mg Eq. Betanina/100 g pulpa respectivamente) (Stintzing *et al.* 2005).

Por otra parte, en esta etapa de análisis se realizaron barridos de los extractos metanólicos de las especies analizadas y los extractos de referencia, para identificar los picos correspondientes a las betalaínas. Se utilizó un espectrofotómetro y se programaron los barridos desde 400 a 700 nm. Se identificaron para el betabel dos picos característicos a 479 y 536 nm (Figura 16a), lo cual indica la presencia de betaxantinas y betacianinas. En el caso de la tuna roja (Figura 16b) se observan dos picos uno a 487 y el otro a 538 nm; para las especies *M. sphacelata var. sphacelata* (Figura 16c), *T. lophophoroides* (Figura 16d), *T. laui* (Figura 17a) y *E. chaffeyi* (Figura 17d) se ven de igual manera dos picos a 469 y 538 nm, para *T. pseudopectinatus* (Figura 17b) se observan a 471 y 538 nm y para *E. platyacanthus* (Figura 17c) solo un pico definido a 469 nm.

Esto es otro indicador de que los compuestos que se están determinando espectrofotométricamente pertenecen al grupo de las betalaínas, aunque como se observa, las betaxantinas no son del mismo tipo de las que tiene la tuna o el betabel. Las betacianinas son compuestos que se pueden determinar espectrofotométricamente a longitudes de onda de 535 a 540 nm; las betaxantinas tienen diferentes máximos de absorción dependiendo del aminoácido con el que se encuentren conjugadas y van desde 467 hasta 483 nm (Castellanos-Santiago & Yahia 2008; Azeredo 2009).

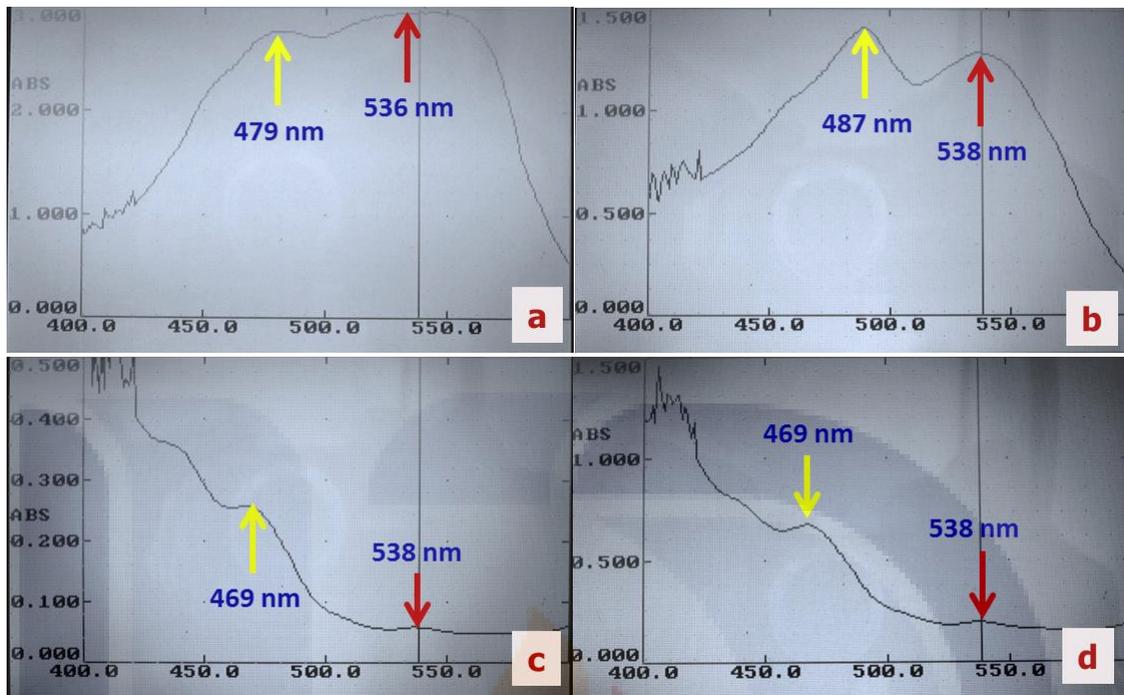


Figura 16. Barrido espectral de extractos betaláinicos. a) Betabel, b) Tuna roja, c) *M. sphacelata* var. *sphacelata*, y d) *T. lophophoroides*. Barrido de 400 a 600 nm. Las flechas amarillas indican la presencia de betaxantinas y las rojas de betacianinas. Los números indican la longitud de onda de máxima absorción.

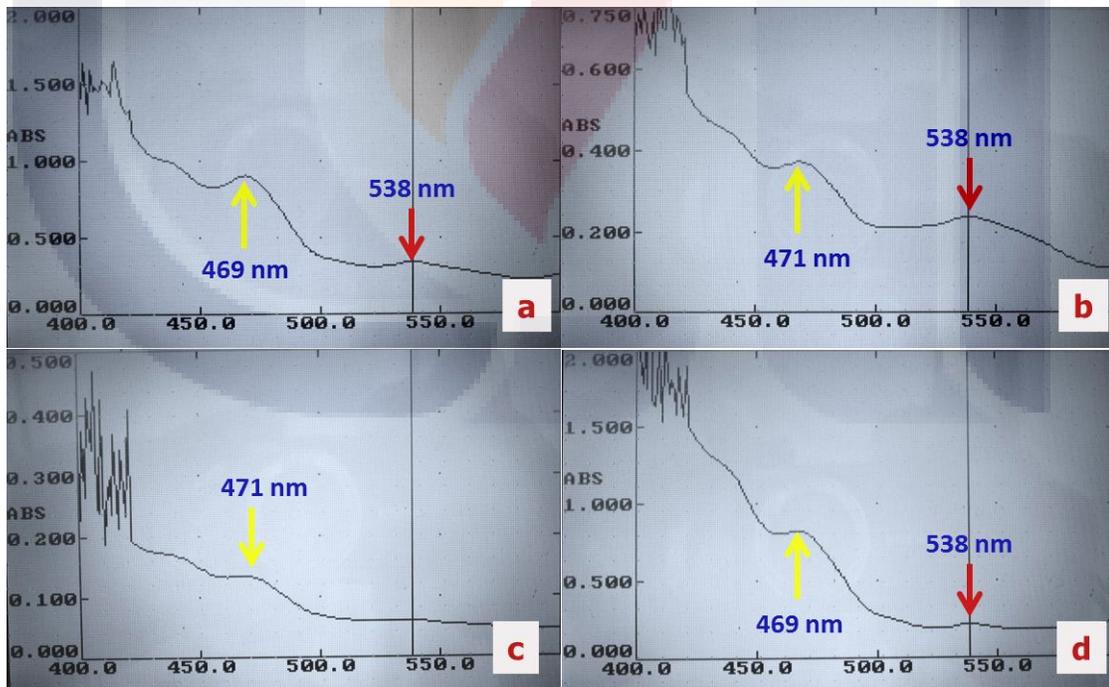


Figura 17. Barrido espectral de extractos betaláinicos (continuación). a) *T. laui*, b) *T. pseudopectinatus*, c) *E. platyacanthus* y d) *E. chaffeyi*. Barrido de 400 a 600 nm. Las flechas amarillas indican la presencia de betaxantinas y las rojas de betacianinas. Los números indican la longitud de onda de máxima absorción.

6.2.1. Perfil de extractos betalaínicos por TLC

Se hizo un ensayo preliminar con extractos de cada uno de los materiales de trabajo seleccionados al inicio (Figura 18). En el caso de *M. sphacelata* y *T. pseudopectinatus*, se observó una banda amarilla muy tenue, para *E. platyacanthus* no fue posible observar alguna banda. Se realizó nuevamente una prueba con extractos más concentrados de *M. sphacelata* y de *E. platyacanthus*, pero se obtuvieron bandas difícilmente identificables.

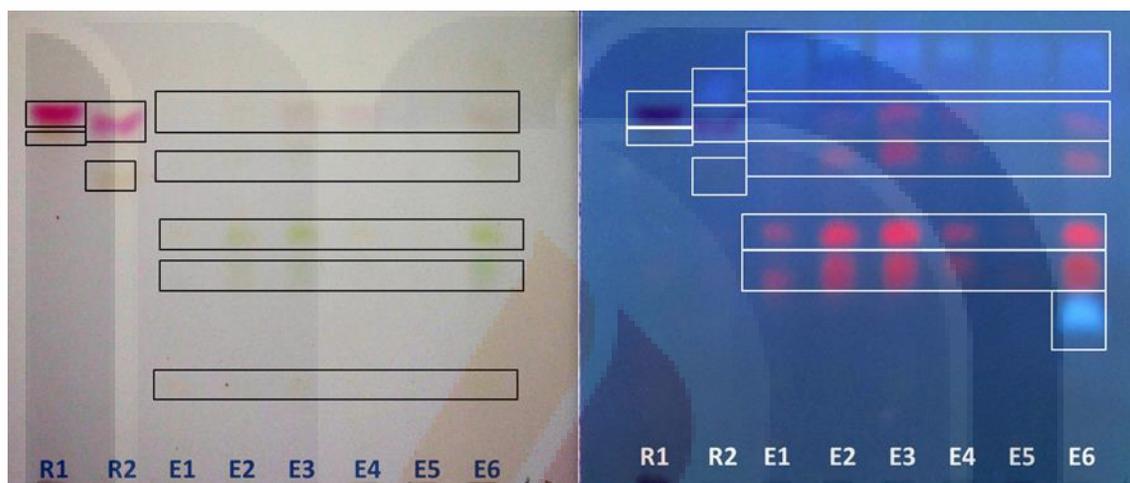


Figura 18. Cromatografía en capa fina para extractos betalaínicos. R1: Betabel, R2: Tuna roja. E1: *M. sphacelata*, E2: *T. lophophoroides*, E3: *T. laui*, E4: *T. pseudopectinatus*, E5: *E. platyacanthus*, E6: *E. chaffeyi*. Se resaltan en cuadro negro las bandas detectadas a simple vista para las diferentes muestras. Se resaltan en cuadro blanco las bandas detectadas bajo luz UV.

Se realizó entonces la cromatografía en las especies seleccionadas, *T. pseudopectinatus*, *E. chaffeyi*, *T. lophophoroides* y *T. laui*; los resultados se muestran en la Figura 19. Los factores de retardo (R_f) para las bandas detectadas se resumen en la Tabla 7. A simple vista se observa buena separación de compuestos.

Se observan en las placas bajo luz visible, bandas de color rojo-violeta (betacianinas) y bandas de color amarillo (betaxantinas) para los extractos de betabel y tuna. Para las muestras de raíces transformadas se ven, desde bandas de color rojo-violeta muy finas hasta varias bandas en distintos tonos, amarillo-verdosas, verdes-grisáceas, cafés y amarillas, que no se observan en los extractos de betabel o tuna. Las determinaciones se hicieron a simple vista debido a la coloración característica de las betalaínas, y por las

recomendaciones que se tienen de estas técnicas para estos pigmentos (Bilyk 1981; Sherma & Fried 2003; Soriano-Santos *et al.* 2007).

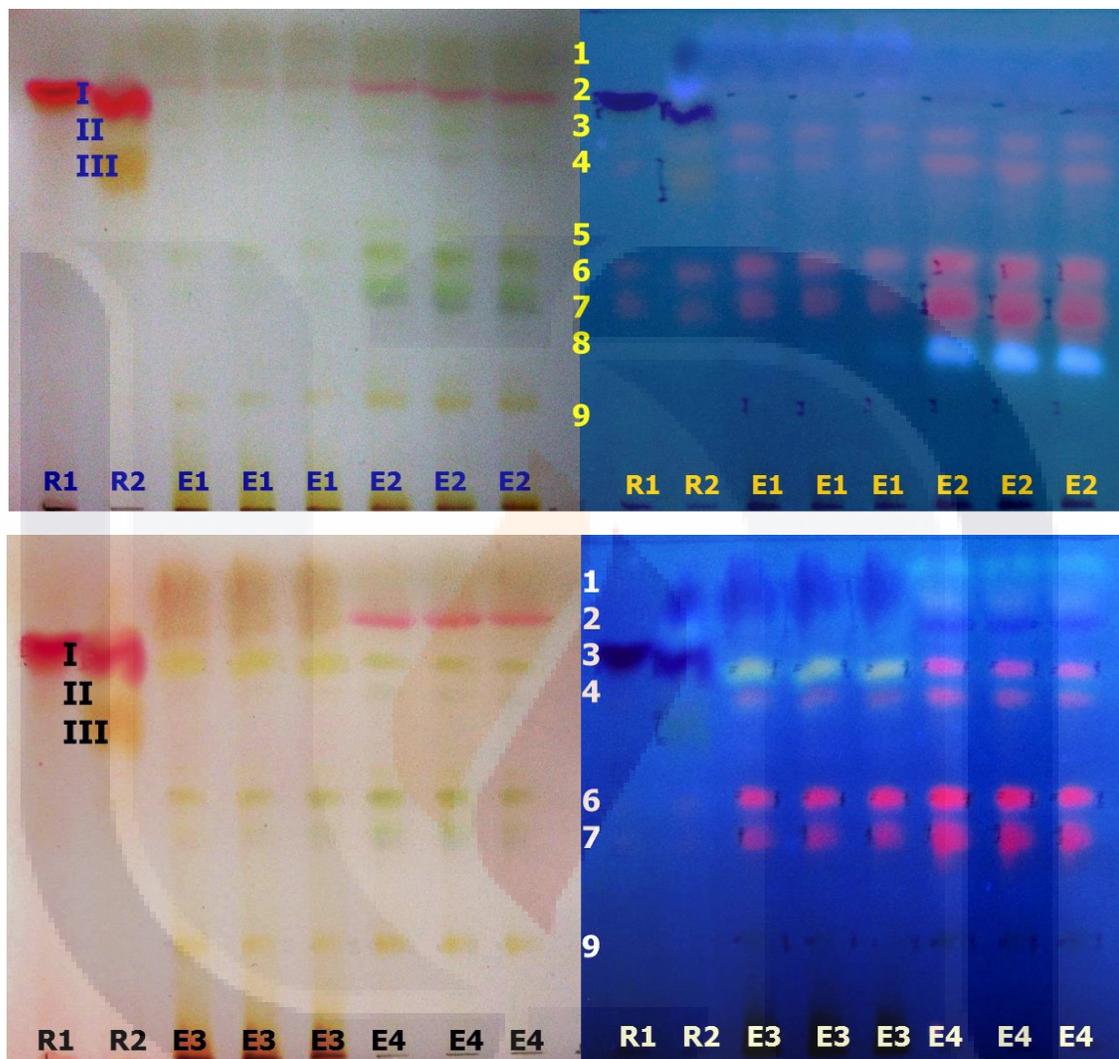


Figura 19. Placas cromatográficas con extractos betalaínicos. Placas izquierdas: luz visible, derechas: luz UV. R1: betabel, R2: tuna roja, E1: *T. pseudopectinatus*, E2: *E. chaffeyi*, E3: *T. lophophoroides*, E4: *T. laui*. I-III: indican diferentes bandas de pigmentos identificadas en betabel y tuna. 1-9: indican diferentes bandas de pigmentos identificadas en las muestras.

En las placas bajo luz UV se encontró que algunas de las bandas se coloreaban de tonos rojos, azules, grisáceos y verdosos. Esto resulta interesante, ya que puede tratarse de algún tipo especial de betaxantinas o de otros tipos de fitoquímicos como compuestos fenólicos, carotenoides o alcaloides solubles en la mezcla solvente utilizada en la extracción (Sherma

& Fried 2003), lo cual las convierte en material de mayor interés por su variedad de compuestos.

Tabla 7. Factores de retardo (R_f) para diversos extractos betalaínicos.

Muestra	R_f I	R_f II	R_f III	R_f 1	R_f 2	R_f 3	R_f 4	R_f 5	R_f 6	R_f 7	R_f 8	R_f 9
Betabel	0.80	0.77	0.69	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tuna	0.78	*	0.64	*	*	*	*	*	*	*	*	*
1	*	*	*	0.89	0.83	0.74	0.68	*	0.47	0.41	0.29	0.20
2	*	*	*	0.87	0.80	0.73	0.67	0.53	0.47	0.40	0.29	0.20
3	*	*	*	0.86	*	0.74	0.68	*	0.49	0.41	*	0.20
4	*	*	*	0.89	0.82	0.73	0.68	*	0.49	0.41	*	0.20

1: *T. pseudopectinatus*, 2: *E. chaffeyi*, 3: *T. lophophoroides*, 4: *T. laui*. *banda no detectada. Los valores de los R_f I de betabel y tuna, así como los de R_f 2 de las raíces transformadas, corresponden a las bandas violetas detectadas. Los valores de R_f II y III corresponden a las bandas amarillas de betabel y tuna. Los demás valores de R_f (1 y 3 al 9) corresponden a compuestos desconocidos.

No se tiene a la fecha conocimiento de parámetros cromatográficos que se puedan comparar con este estudio, ya que algunos otros autores han utilizado placas de TLC de celulosa con mezclas de elusión ajustadas para la separación de pigmentos betalaínicos de betabel (Bilyk 1981; Soriano-Santos *et al.* 2007); sin embargo, se tiene conocimiento de la buena separación de estos pigmentos para diversas Opuntias en placas de sílica (Contreras-Ovalle 2011a) y de los resultados reproducibles de estos experimentos tanto en sílica como en celulosa (Sherma & Fried 2003). Los parámetros determinados muestran al momento que el método es adecuado para obtener un perfil de bandas de los diferentes compuestos betalaínicos presentes en las muestras bajo estudio, aunque hay que tomar en cuenta su concentración en la solución y la cantidad a aplicar a la placa para lograr una óptima respuesta, muy visible y reproducible.

6.3. Cinéticas de crecimiento y producción de RTC

Se obtuvieron las cinéticas y los índices de crecimiento, así como las cinéticas de producción para las raíces transformadas de las diferentes especies bajo estudio (seleccionadas con base en los resultados del apartado 6.2 de este capítulo). Estos parámetros son de gran ayuda para entender los patrones de crecimiento. Se hicieron además análisis de correlación y se encontraron relaciones altamente significativas entre algunas de las variables.

Para el caso de *E. chaffeyi* (Figura 20), se observa una larga fase lag hasta el día 15 - 25 y posteriormente un crecimiento activo hasta el día 35 ($\mu_{max} = 0.047 \text{ días}^{-1}$, $T_d = 14.6 \text{ días}$), periodo en el que quintuplicó su peso inicial en fresco. El contenido de betacianinas presentó sus valores máximos al inicio (hasta el día 5), manteniéndose bajo y constante a partir del día 10. En betaxantinas el comportamiento fue similar al de las betacianinas. Con base en esto, se recomienda hacer la cosecha de esta especie a partir del día 35 de cultivo.

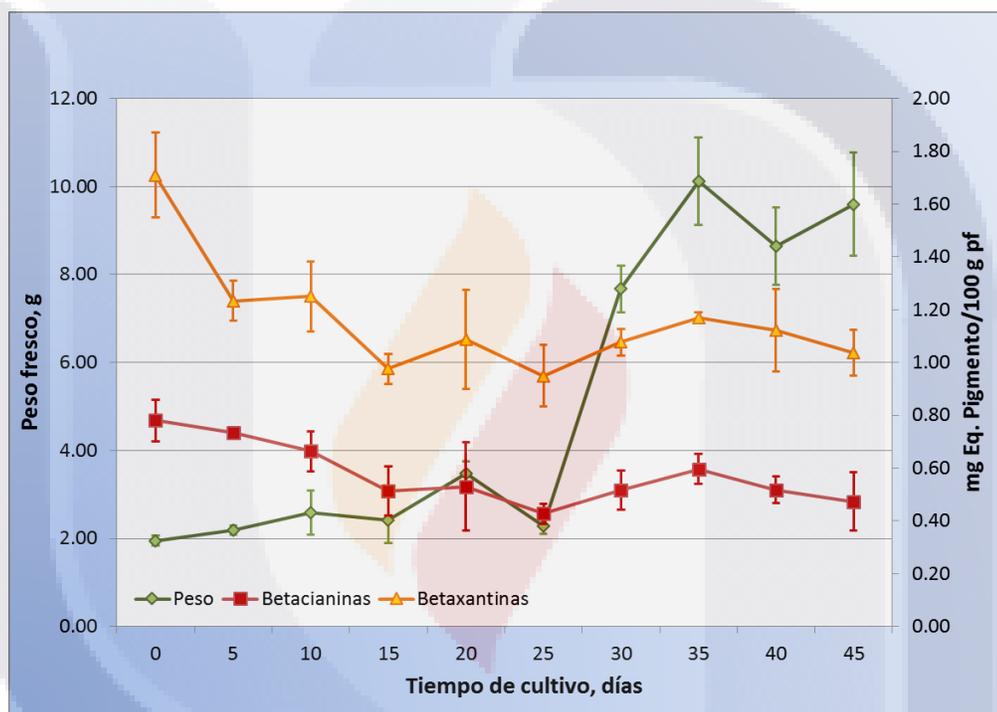


Figura 20. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de *E. chaffeyi*. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

Esta especie mostró correlación altamente significativa y positiva ($p = 0.000$, $r = 0.741$), entre betacianinas y betaxantinas, que indica que conforme aumenta la concentración de uno de los pigmentos, el otro también aumenta, aunque en diferente proporción (Figura 21). Se realizó un análisis de regresión lineal para las variables, y se obtuvo que este modelo solo lograba explicar alrededor de un 55 % de la variación, lo que lo hace poco adecuado como modelo explicativo.

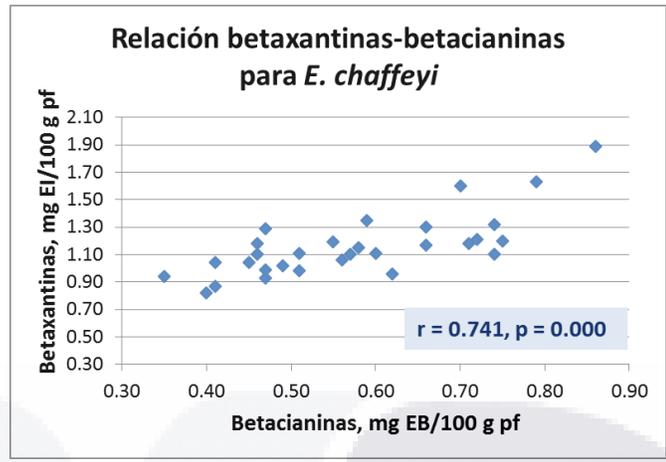


Figura 21. Gráfico de dispersión de contenido de betaxantinas-betacianinas para *E. chaffeyi*. r: coeficiente de correlación de Pearson, p: valor p para la prueba de correlación.

El peso de *T. laui* (Figura 22) varió con el tiempo significativamente y presentó sus valores máximos a partir del día 40 de cultivo; en este periodo de tiempo cuadruplicó su peso inicial en fresco. Su fase lag fue muy corta y comenzó su crecimiento desde los primeros días (μ máx. = 0.045 días⁻¹, Td = 15.5 días). El contenido de betacianinas y betaxantinas permaneció casi constante a lo largo del experimento. Se presentaron diferencias significativas para betacianinas y betaxantinas los días 0, 5 y 50 de cultivo, con las concentraciones más altas. Por consiguiente, se recomienda realizar la cosecha a partir del día 45 de cultivo.

Para esta especie, se encontró correlación altamente significativa y positiva entre las variables peso y tiempo de cultivo ($p = 0.000$, $r = 0.967$), y betacianinas y betaxantinas ($p = 0.000$, $r = 0.9184$), por lo que posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal y se obtuvieron dos buenos modelos explicativos (Figura 23). Para el caso de peso y tiempo de cultivo, el modelo explica un 93 % de la variación; se puede observar por lo tanto un incremento de aproximadamente 0.6 g cada 5 días. Para la relación entre betalaínas, el modelo explica el 84 % de la variación y se puede observar que la concentración de betaxantinas es casi dos veces mayor que la de betacianinas.

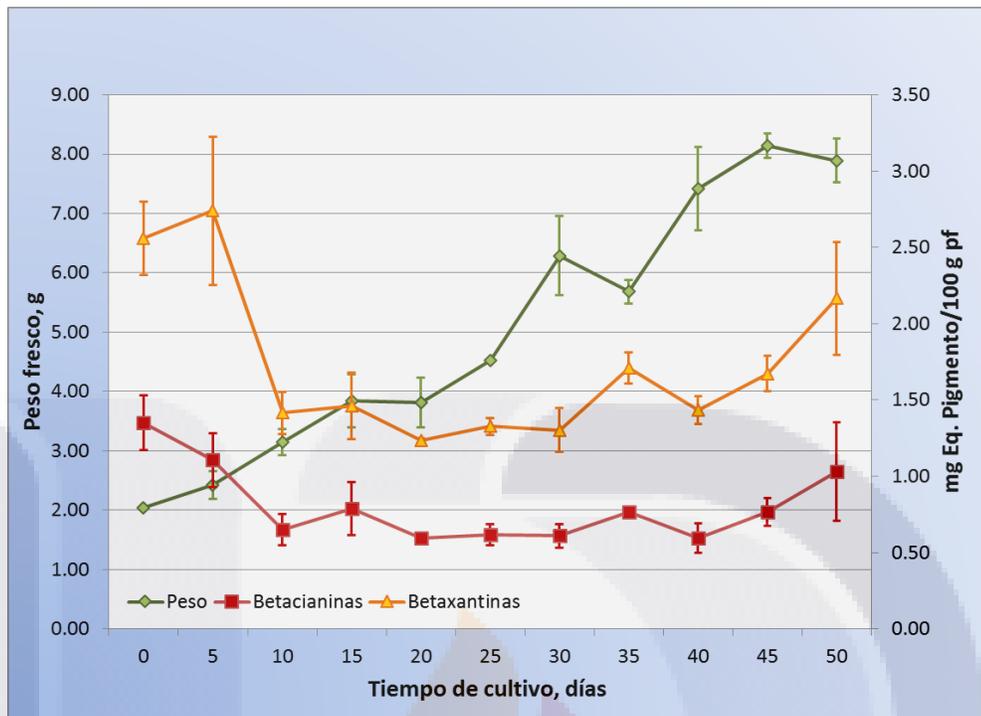


Figura 22. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de *T. laui*. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

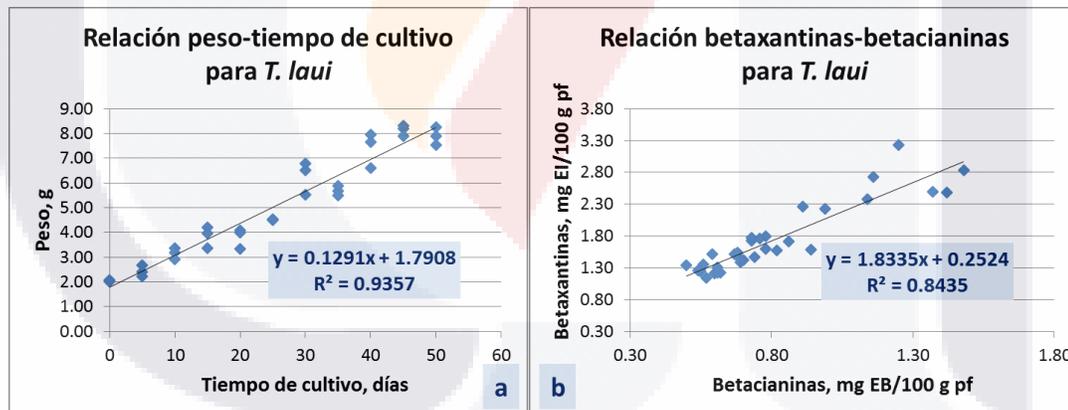


Figura 23. Relaciones entre variables para *T. laui*. a) Análisis de regresión para peso-tiempo de cultivo de *T. laui*. b) Análisis de regresión para betaxantinas-betacianinas de *T. laui*. Se muestran las ecuaciones de regresión lineal y los valores de los coeficientes de determinación (R^2).

La especie *T. lophophoroides* (Figura 24) mostró una fase lag muy corta, teniendo casi desde el inicio un crecimiento activo y moderado, alcanzando sus valores de peso máximos a partir del día 30 de cultivo ($\mu_{max} = 0.030 \text{ días}^{-1}$, $T_d = 22.7 \text{ días}$). En este período logró alrededor de 2.7 veces su peso inicial en fresco. El contenido de betacianinas también tuvo variaciones, disminuyendo conforme pasaban los días, aunque no de manera importante; el

contenido de betaxantinas mostro valores similares en casi todo el tiempo de cultivo. En base a los resultados obtenidos, se recomienda hacer la cosecha de las raíces de esta especie a partir del día 30 de cultivo.

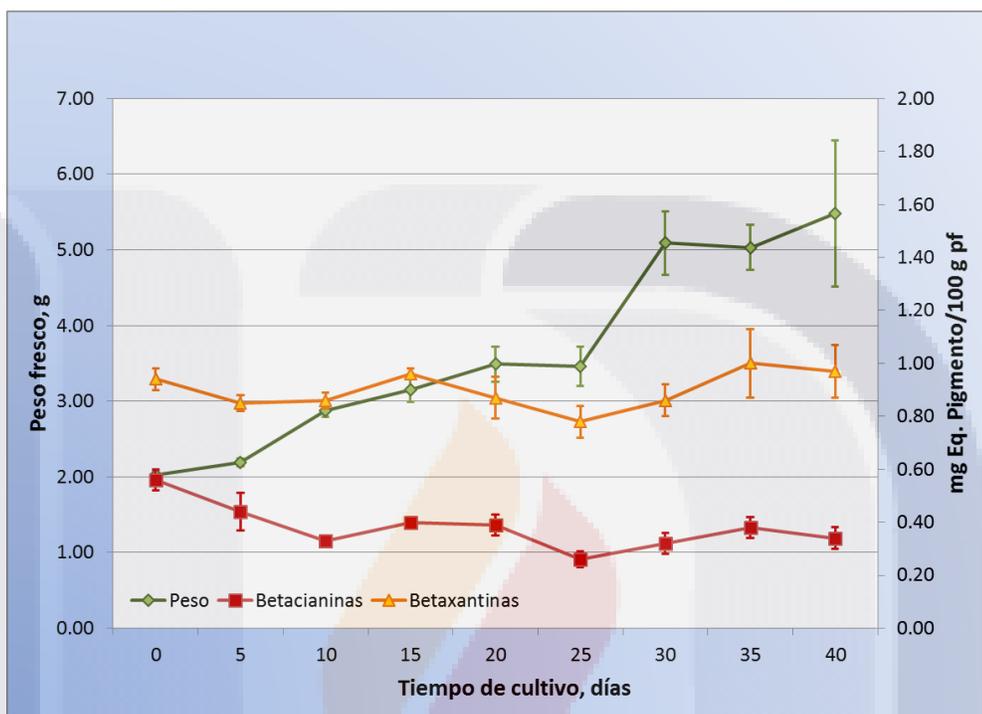


Figura 24. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de *T. lophophoroides*. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

En el análisis de correlación se encontró que había una relación altamente significativa y positiva entre el peso y el tiempo de cultivo ($p = 0.000$, $r = 0.937$) y entre el contenido de betacianinas y el tiempo de cultivo ($p = 0.001$, $r = -0.604$) (Figura 25). Realizando un análisis de regresión lineal, se encontró que el modelo puede explicar el incremento del peso con respecto al tiempo de cultivo en un 88 %, por lo que es un modelo explicativo adecuado, pudiendo encontrar un incremento de alrededor de 0.5 g cada 5 días de cultivo; en el caso del contenido de betalaínas el modelo no es adecuado, ya que explica solo alrededor del 36 % de la variación.

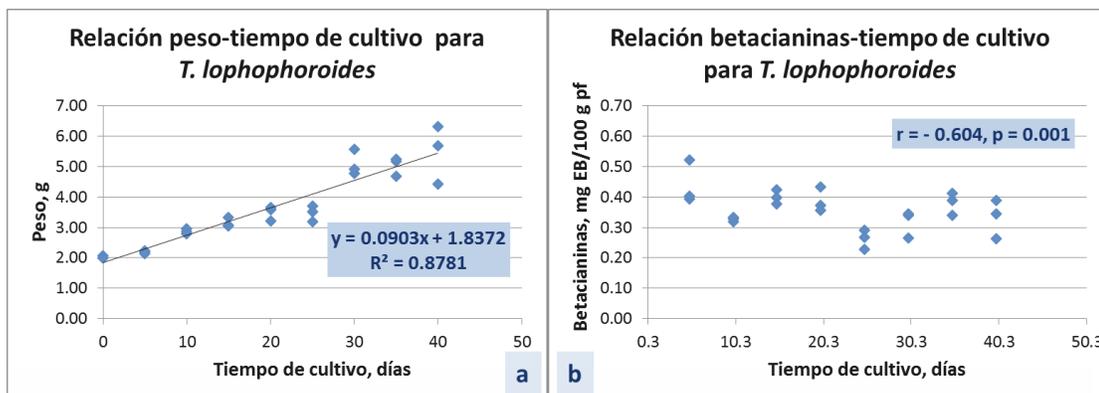


Figura 25. Relaciones entre variables para *T. lophophoroides*. a) Análisis de regresión para peso-tiempo de cultivo, se muestra la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de determinación (R^2). b) Gráfica de dispersión para betacianinas-tiempo de cultivo. r: coeficiente de correlación de Pearson, p: valor p para la prueba de correlación.

T. pseudopectinatus (Figura 26), desde el inicio presentó un crecimiento acelerado; los valores más altos en peso fresco se lograron a partir del día 20 (μ máx. = 0.053 día^{-1} , $T_d = 13.0$ días); para este día el peso se había incrementado 2.5 veces con respecto al inicial. El contenido de betacianinas no varió a lo largo del experimento, mientras que el contenido de betaxantinas presentó los valores máximos el día 5 de cultivo, y a partir del día 45. Debido a que no hubo ningún incremento en la concentración de pigmentos y el crecimiento alcanzó su fase estacionaria, se recomienda hacer la cosecha de esta especie a partir del día 45.

En el análisis de correlación se encontró una relación moderada entre el contenido de betacianinas y betaxantinas para *T. pseudopectinatus* (Figura 27), altamente significativa y positiva ($p = 0.001$, $r = 0.572$). Enseguida se realizó un análisis de regresión lineal, sin embargo, este modelo solo logró explicar un 33 % de la variación, por lo que no se considera adecuado.

Contrastando los resultados obtenidos de las diferentes raíces transformadas de cactáceas, las μ máximas arrojaron valores de 0.030 a 0.053, con T_d de 13 a 22.7 días. Estos valores son comparables a los reportados para cultivos de raíces pilosas de *Arabidopsis thaliana* (0.045 – 0.101 días^{-1}) (Kim *et al.* 2003) y *Whitania somnifera* (8 – 14 días) (Murthy *et al.* 2008), y sus velocidades específicas de crecimiento son menores a las reportadas para *Artemisia Annu*a (0.22 días^{-1} , 3.1 días) y *Atropa belladonna* (0.55-0.30 días^{-1} , 1.3-2.3

días)(Kim *et al.* 2003). En general, se puede afirmar que las raíces transformadas de estas especies de cactáceas son de lento crecimiento, y que incluso hay diferencias entre especies del mismo género.

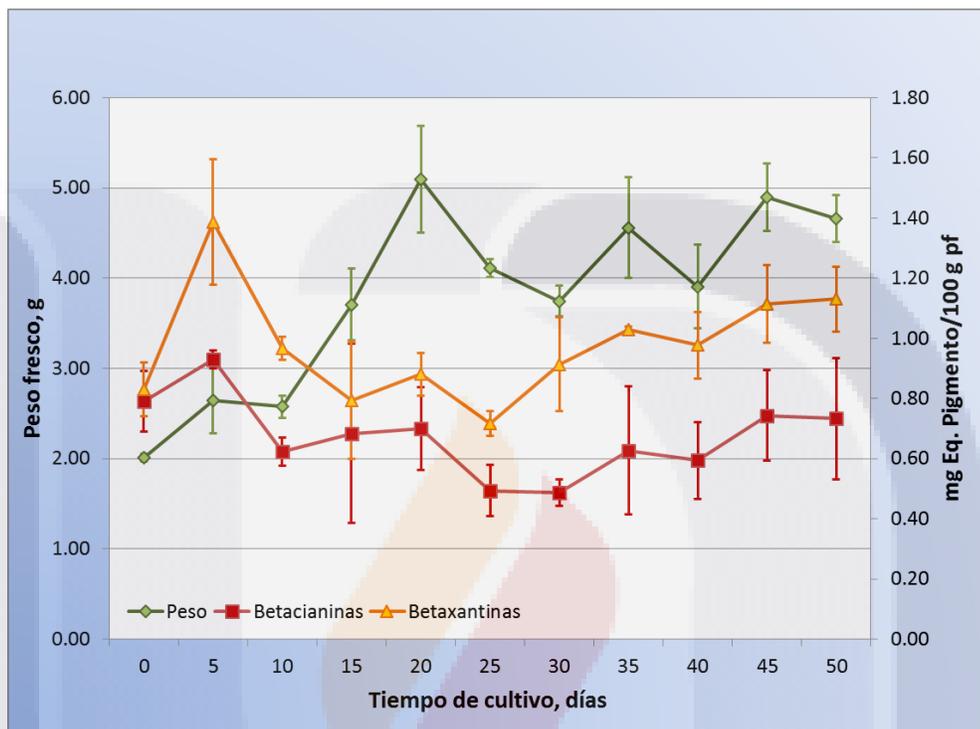


Figura 26. Cinéticas de crecimiento y producción para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus*. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

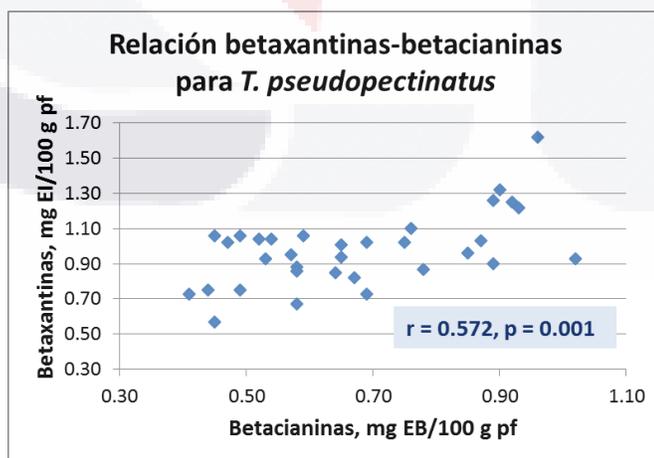


Figura 27. Gráfico de dispersión de contenido de betaxantinas-betacianinas para *T. pseudopectinatus*. r: coeficiente de correlación de Pearson, p: valor p para la prueba de correlación.

En general, hubo una tendencia de los cultivos de raíces transformadas de cactáceas a mantener los niveles de pigmentos similares a los del tejido madre. Algunas muestras de las especies *T. lophophoroides*, *E. chaffeyi* y *T. pseudopectinatus* presentaron una etapa de envejecimiento y comenzaron a tornarse café-rojizas; posteriormente, se marchitaron y murieron. Las diferentes especies mostraron niveles de pigmentos mayores al inicio de la prueba y tuvieron una ligera disminución con el paso del tiempo, como era de esperarse, ya que, al formarse nuevo tejido, éste no tiene la capacidad productora y conforme sus células van madurando, van adquiriendo la capacidad de pigmentación en la cantidad requerida por su metabolismo. En la Tabla 8 se presentan los resultados de las cinéticas de crecimiento y producción obtenidos para las raíces transformadas de las diferentes especies de cactáceas.

Tabla 8. Resultados de cinéticas de crecimiento y producción de raíces transformadas de cactáceas

Especie	Pf_{máx.}¹ (g)	Ps_{máx.}¹ (g)	Pf_{máx.} PFI	μ (día ⁻¹)	Td (días)	BC_{máx.}² ($\frac{\text{mg EB}}{100 \text{ g pf}}$)	BX_{máx.}² ($\frac{\text{mg EI}}{100 \text{ g pf}}$)
<i>E. chaffeyi</i>	10.12	0.60	5.2	0.047	14.6	0.60	1.17
<i>T. laui</i>	8.14	0.53	4.0	0.045	15.5	1.03	2.17
<i>T. lophophoroides</i>	5.48	0.54	2.7	0.030	22.7	0.38	1.00
<i>T. pseudopectinatus</i>	5.09	0.24	2.5	0.053	13.0	0.73	1.13

¹Determinado al tiempo de crecimiento máximo (20 – 45 días según especie). ²Determinado al tiempo de máxima producción de pigmentos (35 – 50 días). Pf: Peso fresco, PFI: Peso fresco inoculado, Ps: Peso seco, μ: velocidad específica de crecimiento, Td: tiempo de duplicación, BC: betacianinas, BX: Betaxantinas, EB: equivalentes de betanina, EI: equivalentes de indicaxantina.

En lo que respecta a la humedad de los diferentes materiales de trabajo, se obtuvieron los datos que se muestran en la Tabla 9. Los materiales poseen un alto contenido de humedad, lo cual era de esperarse por la función que tienen en la planta, además estos niveles son similares a los de otras especies vegetales y frutos, que almacenan estas cantidades de agua en sus tejidos. Se observa que, por cada 100 gramos de raíces en peso fresco, se tienen alrededor de 4.5 a 10 g de material seco, dependiendo de la especie.

Tabla 9. Humedad (%) de raíces transformadas de cactáceas.

Especie	Humedad (%)
<i>E. chaffeyi</i>	94.1 ± 0.8 b
<i>T. laui</i>	93.5 ± 0.4 b
<i>T. lophophoroides</i>	90.2 ± 0.4 c
<i>T. pseudopectinatus</i>	95.2 ± 0.3 a

Se muestran los promedios de cuatro repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Con base en estos resultados, se sugiere realizar la cosecha de los materiales de las distintas especies, alrededor del día 45 de cultivo, para homogeneizar los tiempos de cosecha, afectando lo menos posible la cantidad de metabolitos y el contenido de biomasa. Con esta medida, se pretende también evitar la aparición de tejido calloso y aprovechar el medio de cultivo al máximo

6.4. Efecto del tipo de medio basal en la producción de betalainas en RTC

6.4.1. Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos

Para la especie *E. chaffeyi*, se obtuvieron los datos de ganancia en peso fresco en los diferentes medios de cultivo, así como las concentraciones de pigmentos betalaínicos presentes en las raíces transformados de esta cactácea (Figura 28).

Los resultados para esta especie indican que los medios que dan la mayor ganancia en peso son N6 y MS (10.799 y 9.906 g, respectivamente), alrededor de 200 % más que en el medio White (3.344 g). Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Carlín *et al.* (2015) para la misma especie, que encontró como mejor medio para producción de biomasa al medio DKW, con una ganancia en peso de alrededor de 3 veces el peso inoculado, mientras que con estos resultados observamos que en DKW se tienen alrededor de 5 veces más y en N6 un poco más de 7 veces el peso inoculado. Sin embargo, el tiempo de cosecha y la cantidad inicial de biomasa fueron diferentes a las establecidas en este estudio (30 días y 0.5 g, respectivamente), lo cual puede explicar en parte estas diferencias.

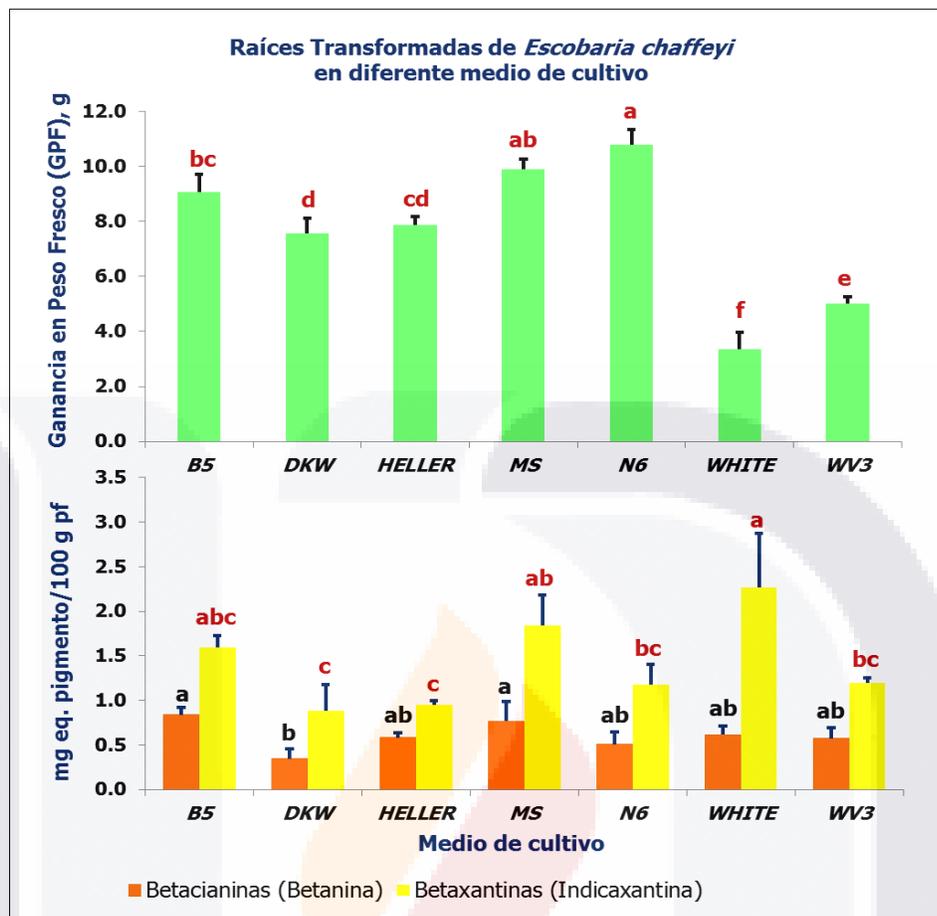


Figura 28. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes medios de cultivo. Pigmento: Betanina (betacianinas) o Indicaxantina (betaxantinas). pf: peso fresco. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes en barras del mismo color, indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

En cuanto a betacianinas, los medios que lograron un mayor contenido de estos pigmentos son B5 y MS (0.84 y 0.77 mg EB/100 g pf, respectivamente), cerca de 150 % más que en el medio DKW (0.34 mg EB/100 g pf). En betaxantinas, el medio que generó mayor contenido de estos pigmentos es el medio White (2.27 mg EI/100 g pf), cerca de 150 % más que en los medios DKW y Heller (0.88 y 0.95 mg EI/100 g pf, respectivamente).

Dos factores del medio de cultivo son importantes para el crecimiento y la morfogénesis vegetal, el contenido de nitrógeno total (N total) y la relación nitrato-amonio (relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$) (Anexo A). La mayoría de las plantas, tejidos y órganos mejoran su asimilación de nitrógeno, y crecen más rápidamente en medios que contienen iones nitrato y amonio, aunque los niveles de iones amonio suelen ser más bajos que los de nitrato; también se ha

descrito, que el crecimiento de raíces es inhibido por los iones amonio y promovido por los iones nitrato (George *et al.* 2008). De aquí la importancia de observar con cuidado estos parámetros. Jacob y Malpathak (2005) observaron que los medios con niveles de nitrógeno total más elevado y con una relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ más alta favorecían la producción de biomasa, teniendo un límite máximo que depende de cada especie. Los resultados de este estudio concuerdan en parte con esto ya que el medio N6 tiene una concentración de 35 mM de N total y una relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ de 4:1 (Carlín *et al.* 2015).

Por el contrario, medios con bajos niveles de N total y bajas relaciones de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ favorecen la producción de metabolitos secundarios, según lo observado por Jacob y Malpathak (2005); en este caso el contenido de betaxantinas no es totalmente acorde con esta afirmación, ya que, aunque se obtienen los niveles máximos en el medio White que tiene una concentración de 3.3 mM de N total y una relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ 3.3:0 (Carlín *et al.* 2015), se dan valores similares en los medios MS y B5, que tienen valores más altos de estos parámetros. La concentración de betacianinas, por otra parte, tiene sus valores máximos en medios con contenidos relativamente altos de N total (27 mM para B5 y 60 mM para MS)(Carlín *et al.* 2015), aunque debiera comportarse de igual manera en DKW. Esto concordaría con lo reportado en otros artículos para raíces pilosas de betabel, en donde no se encontró un efecto significativo en la producción de betacianinas con respecto a la concentración de nitratos en el medio (Neelwarne 2012).

Se encontró una correlación altamente significativa y positiva ($p = 0.003$, $r = 0.608$) entre el contenido de betaxantinas y betacianinas, aunque al realizar un análisis de regresión lineal, se encontró que el modelo solo explica el 37 % de la variación, por lo que no es modelo explicativo muy adecuado. Estos resultados plantean un panorama interesante, ya que se puede seleccionar un sistema de producción de una fase con un solo medio de cultivo para crecimiento y producción de pigmentos, o un sistema de cultivo en dos fases, con un medio para generación de biomasa y uno para producción de pigmentos betalaínicos. Para tomar una decisión sobre el tipo de sistema y el medio adecuado, puede ser necesario también considerar la homogeneidad y la estabilidad del cultivo en cuanto a la morfología del material, ya que aunque las raíces transformadas sean clones del mismo cultivar, estos

clones pueden tener morfología muy variada, así como patrones de crecimiento y producción de metabolitos secundarios también diferentes (Neelwarne 2012).

Para hacer una clasificación morfológica de las raíces transformadas, se tomó en cuenta la cantidad de material con características típicas de raíz y la cantidad de tejido de morfología no definida (engrosado o parecido a tejido calloso) presente en el cultivo vegetal, de aquí se establecieron cuatro categorías para los materiales vegetales bajo estudio: 1) R (raíces bien definidas), 2) RO (raíces definidas con poca a moderada cantidad de tejido de morfología no definida), 3) OR (tejido de morfología no definida con poca a moderada cantidad de raíces definidas) y 4) O (tejido con morfología no definida) (Anexo B). Para *E. chaffeyi*, los medios B5, DKW, Heller y MS produjeron material con morfología OR, y los medios restantes material con morfología O. Considerando este factor, sería mejor utilizar un sistema de una fase, con medio MS o B5, ya que aquí se da un equilibrio adecuado entre morfología, crecimiento y producción de betalaínas.

Para el caso de *T. laui* (Figura 29), se determinó que el medio que genera mayor ganancia en peso es el medio DKW (3.940 g), cerca de 75 % más que en el medio White (2.25 g). El máximo contenido de betacianinas se presentó en el medio Heller (1.10 mg EB/100 g pf), casi cerca de 96 % más que en los medios White y N6 (0.58 y 0.56 mg EB/100 g pf, respectivamente). El contenido de betaxantinas alcanzó sus niveles más altos en el medio DKW (1.78 mg EI/100 g pf), 97 % más que en el medio White (0.90 mg EI/100 g pf).

Según datos de Carlín *et al.* (2015), el contenido de N total para DKW es relativamente alto (47.1 mM) pero su relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ es relativamente baja (1.6:1). Para el contenido de betaxantinas, el medio DKW es ideal, y para el contenido de betacianinas DKW y Heller dan buenos resultados, el medio Heller es un medio con menor nivel de N total y una relación alta de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ (7.1 mM y 7.1:0 respectivamente). Este comportamiento no es similar al que se observó para *E. chaffeyi*, aunque concuerda con lo que algunos autores reportan para otras especies vegetales productoras de betalaínas (Pavokovi & Krsnik-Rasol 2011).

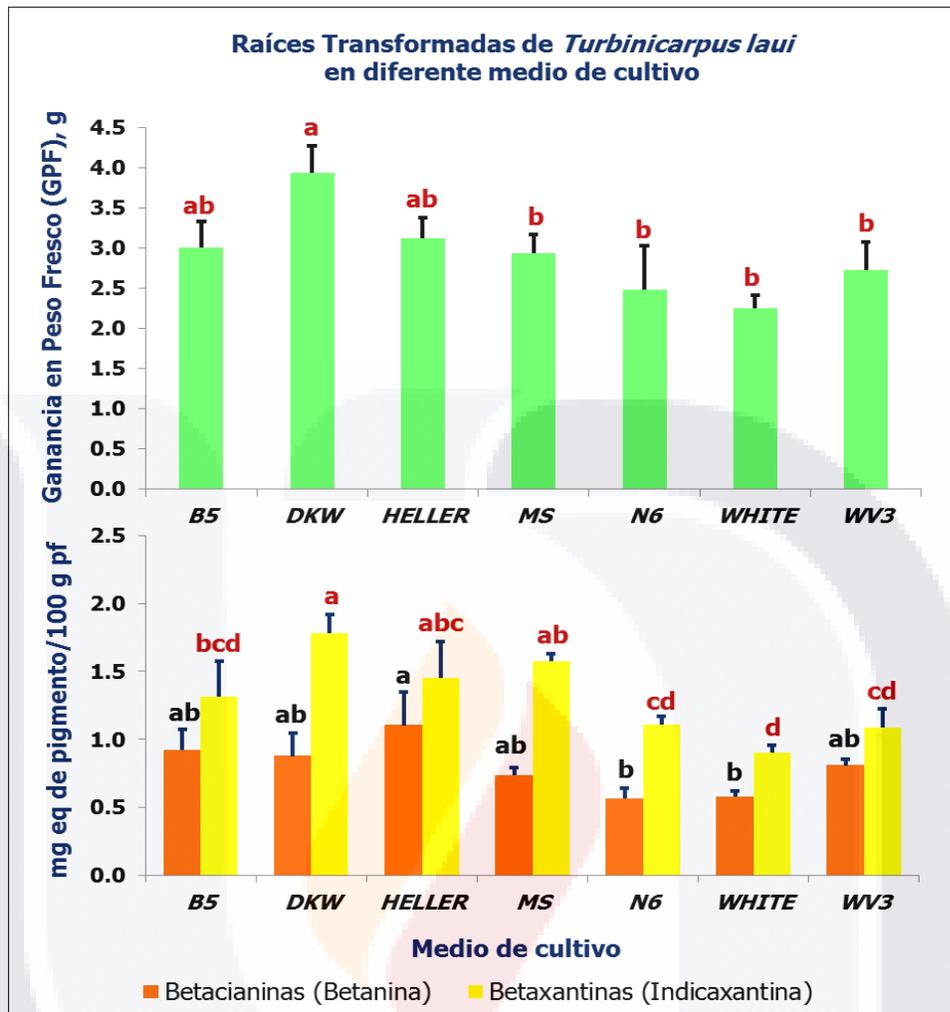


Figura 29. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes medios de cultivo. Pigmento: Betanina (betacianinas) o Indicaxantina (betaxantinas). pf: peso fresco. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes en barras del mismo color, indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Se encontró una correlación altamente significativa y positiva entre el contenido de betacianinas y betaxantinas ($p= 0.002$, $r= 0.625$), así como entre la ganancia en peso y el contenido de betaxantinas ($p= 0.002$, $r= 0.635$); sin embargo, con el análisis de regresión lineal, se encontró que los modelos no son adecuados para explicar las variaciones ya que solo explican el 40 y 39 % de las mismas respectivamente. Para esta especie, se observó una morfología RO para los medios B5, DKW y MS; una morfología OR para los medios Heller y White y una morfología O para el medio N6. De aquí se propone utilizar un sistema de una sola fase con medio DKW, para cultivar *T. laui* y obtener buenos rendimientos.

En el caso de *T. lophophoroides* (Figura 30), se tiene que el medio que produce la mayor ganancia en peso es el medio MS (3.324 g), cerca de 148 % más que en el medio WV3 (1.336 g). Este resultado muestra una ganancia en peso de poco más del doble con respecto al peso del inóculo y es muy cercana a lo reportado por Carlín *et al.* (2015) para la misma especie.

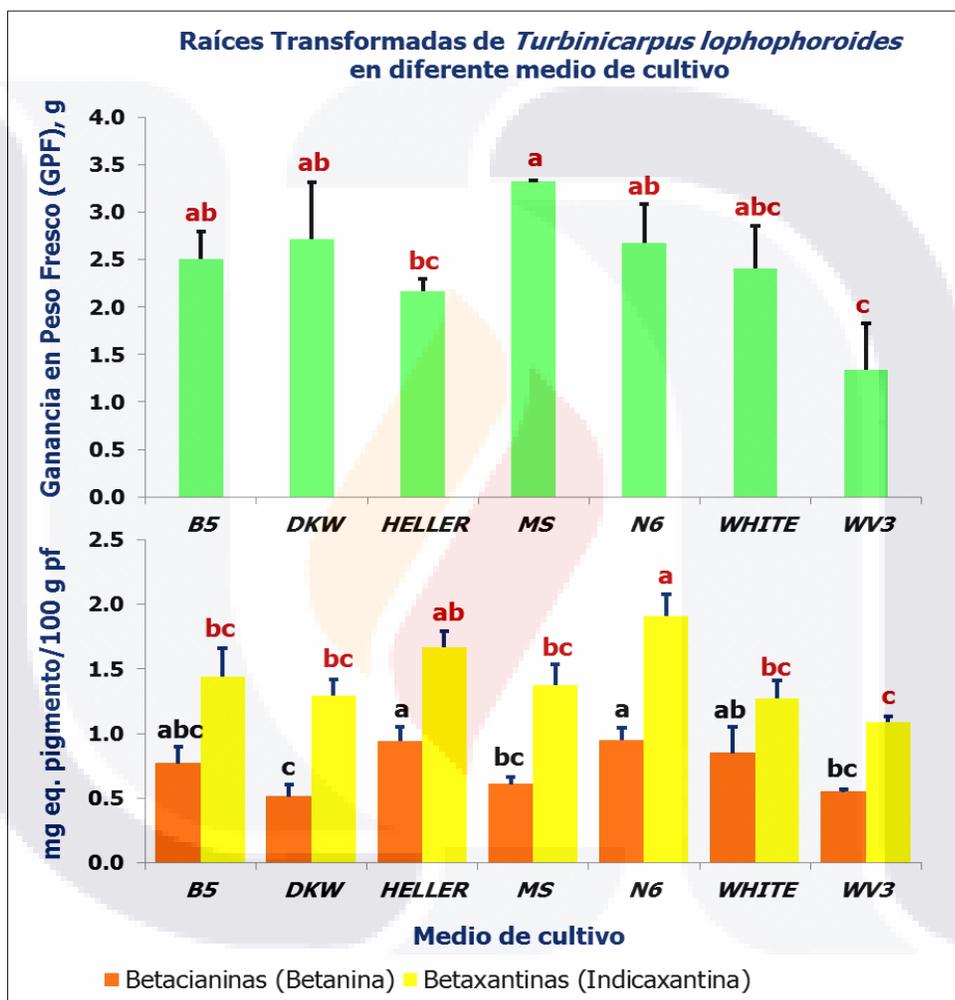


Figura 30. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophorioides* en diferentes medios de cultivo. Pigmento: Betanina (betacianinas) o Indicaxantina (betaxantinas). pf: peso fresco. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes en barras del mismo color, indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

El mayor contenido de betacianinas se obtiene en los medios N6 y Heller (0.95 y 0.94 mg EB/100 g pf, respectivamente), alrededor del 84 % más que en el medio DKW (0.51 mg EB/100 g pf), y el mayor contenido de betaxantinas se logra en los medios N6 y Heller (1.91

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y 1.67 mg EI/100 g pf, respectivamente), poco más del 75 % que en el medio WV3 (1.09 mg EI/100 g pf). Se observa, que aparentemente los medios con contenido de N total más alto favorecen la generación de biomasa, aunque también se genera buena biomasa en White, lo que altera este patrón. El contenido de betaxantinas y de betacianinas no tiene una clara relación con los niveles de N total o con la relación de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$.

Se encontró una correlación altamente significativa y positiva ($p = 0.000$, $r = 0.790$) entre el contenido de betacianinas y betaxantinas para *T. lophophoroides*. Con el análisis de regresión lineal se tiene que el modelo es moderadamente bueno y permite explicar un 62% de la variación (Betaxantinas = $0.589 + 1.14$ betacianinas) con lo que podemos decir que la concentración de betaxantinas es 1.7 veces mayor que la de betacianinas. La morfología para este material vegetal se puede clasificar como R para los medios B5 y DKW, como RO para el medio Heller y WV3, OR para los medios MS y White y O para el medio N6. Por lo que, en este caso, se recomendaría un sistema de cultivo de dos fases con medio B5 o DKW para generación de biomasa y cambiando a un medio Heller en la segunda fase, para obtener buenos rendimientos de betalainas y una morfología más definida.

Para la especie *T. pseudopectinatus* (Figura 31), se genera mayor ganancia en peso en los medios MS y B5 (11.71 y 11.15 g, respectivamente), alrededor de un 464 % más de ganancia que en el medio White (2.076 g). Se encontró una ganancia en peso de poco más de 8 veces el peso del inóculo, que es mayor a la reportada por *Carlín et al.* (2015) para la misma especie. Para betalainas, el mayor contenido de betacianinas se obtiene con el medio B5 (1.89 mg EB/100 g pf), más del 68 % que en el medio N6 (1.12 mg EB/100 g pf) y el mayor contenido de betaxantinas se logra con el medio White (1.88 mg EI/100 g pf), más del 144 % que en el medio MS (0.77 mg EI/100 g pf).

Se sigue observando una relación positiva de N total y la relación de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ con la ganancia en peso para este material vegetal. Para betalainas se observó en esta especie que un medio con valores bajos de N total es más favorable para la producción de betaxantinas; por el contrario, no se observa una relación clara entre el contenido de betacianinas y los valores de N total, aunque parece ser que son favorables los medios con altas proporciones de NO_3 .

Se tiene una correlación altamente significativa y negativa ($p = 0.000$, $r = -0.751$) entre el contenido de betaxantinas y la ganancia en peso del material. Realizando la regresión lineal, se observa, sin embargo, que el modelo no es adecuado para explicar este cambio, ya que solo explica un 56 % de la variación.

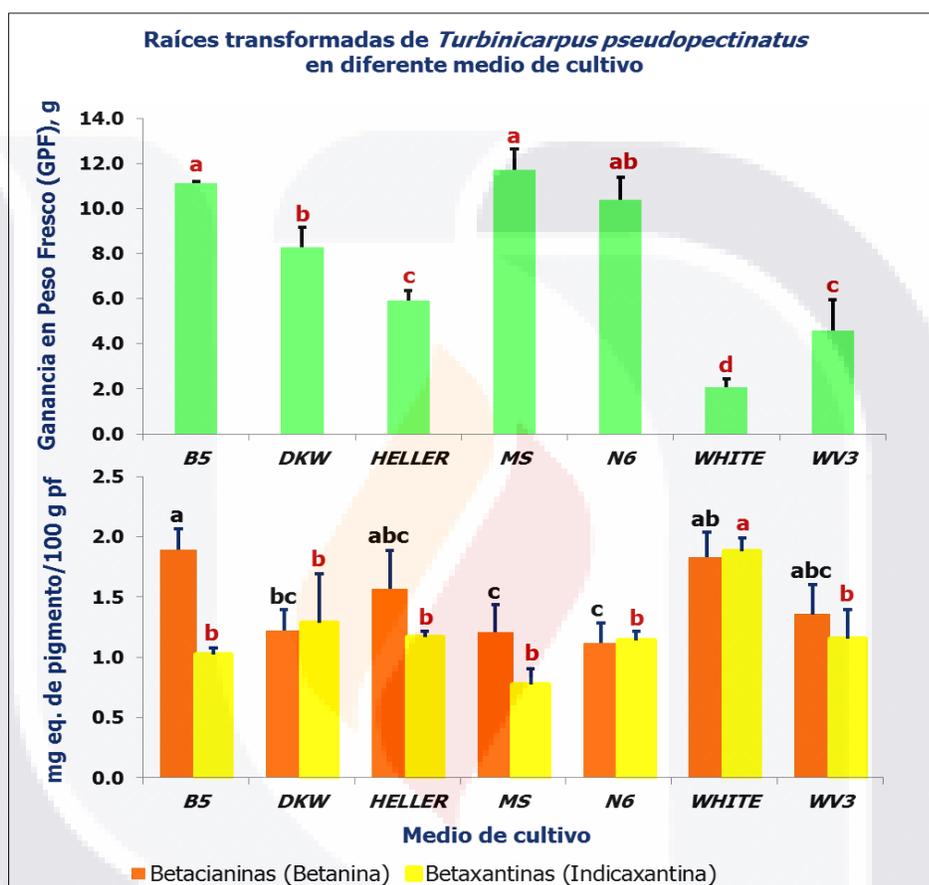


Figura 31. Ganancias en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes medios de cultivo. Pigmento: Betanina (betacianinas) o Indicaxantina (betaxantinas). pf: peso fresco. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes en barras del mismo color, indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

La morfología para esta especie se clasifica como RO para los medios Heller, MS y N6; como OR para los medios B5, DKW y WV3; y como O para el medio White. Por lo que tomando en cuenta toda esta información, se podría seleccionar un sistema de cultivo en dos fases con medio MS para generación de biomasa y cambiando a un medio White o B5 para producción de pigmentos.

La composición iónica de los medios de cultivo (Anexo C), por otra parte, parece tener una gran influencia en el crecimiento y la producción de metabolitos. De los medios utilizados en este estudio, el medio White presenta los niveles más bajos de N total, P y K; el medio N6 presenta los valores más altos de P y K, el medio DKW presenta los valores más altos de Ca, Fe, S, Mn, Zn y Cu, y los medios WV3 y Heller presentan los valores más bajos en algunos micronutrientes. Se sabe por otra parte, de la importancia del ion fosfato en raíces pilosas de betabel, ya que éste ion se consume rápidamente durante el cultivo y al agotarse provoca un incremento en el contenido de betacianinas (Neelwarne 2012).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el medio White que no contiene iones amonio y tiene bajas concentraciones de NO_3 , P y K, provocó un menor crecimiento de las raíces transformadas de *E. chaffeyi* y *T. pseudopectinatus*, pero logró valores altos en acumulación de betacianinas y betaxantinas en estas mismas especies; en *T. lophophoroides* obtuvo los valores más altos en producción de betacianinas y en crecimiento; sin embargo, en *T. laui* arrojó los valores más bajos en crecimiento y en producción de pigmentos betalaínicos. Esto indica de alguna manera cierta relación entre los iones fosfato y la producción no solo de betacianinas sino de betaxantinas, sin embargo, su relación no es muy clara.

Los altos niveles de algunos iones en el medio DKW, pueden estar contribuyendo con el crecimiento y morfología de las raíces transformadas, ya que este medio es el que logró la morfología radical mejor definida, y en algunos casos alcanzó la mejor acumulación de biomasa. Esto parece concordar con lo descrito por George *et al.* (2008), en cuanto a la función que estos componentes tienen en la nutrición vegetal.

En lo que respecta a betacianinas, el medio DKW logró las menores concentraciones en *E. chaffeyi* y *T. lophophoroides*; sin embargo, logró los mejores resultados en *T. laui*. Por lo que las diferencias observadas en las concentraciones de elementos con respecto a los demás medios, parecen no tener una relación clara con la producción de estos pigmentos. Para betaxantinas de igual forma no es posible establecer un patrón claro de comportamiento con respecto al medio usado, ya que con *E. chaffeyi* y *T. pseudopectinatus* el medio White logró las mejores concentraciones de estos pigmentos, pero con *T. laui* ocurrió el caso contrario.

Todo esto indica que aparentemente cada especie tiene sus características nutricionales particulares y que un mismo medio logra diferentes resultados en cuanto a producción de biomasa y de pigmentos betalaínicos.

Comparando con los valores iniciales de cada especie, se tiene que *E. chaffeyi* y *T. lophophoroides* se han mantenido más o menos constantes en su producción de pigmentos betalaínicos; sin embargo, *E. chaffeyi* ha presentado inestabilidad para mantener sus raíces bien definidas, ya que generalmente presenta una buena cantidad de tejido no definido, y las raíces por si solas rara vez son capaces de crecer sino es portando una pequeña masa desdiferenciada; de ahí se genera más tejido pero con escasas raíces pilosas bien formadas, dificultando de alguna manera los análisis que se le realizan. *T. lophophoroides* ha logrado mantener sus raíces bien definidas, aunque en ocasiones ha tendido a hiperhidratarse y a generar algo de tejido no diferenciado.

T. laui no se ha desarrollado adecuadamente bajo las condiciones de cultivo aplicadas, ya que ha tendido a hiperhidratarse y a generar en algunas ocasiones gran cantidad de tejido calloso (inoloro y colorido) y en otros casos hasta pequeños brotes; su producción de pigmentos ha disminuido casi a la mitad de lo que se reportaba inicialmente. *T. pseudopectinatus*, se ha adaptado adecuadamente, ya que ha mantenido un fenotipo muy estable, y ha logrado incrementar su producción de pigmentos betalaínicos a casi el doble de lo reportado inicialmente, tiene un crecimiento acelerado y ha resultado muy sencilla de propagar.

6.4.2. Perfil de extractos betalaínicos por TLC

En lo que respecta a las cromatografías en capa fina, se muestran los resultados para las diferentes muestras que se desarrollaron en los distintos medios de cultivo (Figura 32 a 35). Podemos observar en las placas bajo luz visible, que las bandas rojo-violeta de las muestras y las soluciones de referencia son fácilmente identificables, cosa que no sucede en algunos casos con las bandas amarillas de las muestras y el betabel; la tuna si muestra muy claramente su banda amarilla en estas condiciones. Bajo luz UV se muestran algunas otras bandas complementarias.

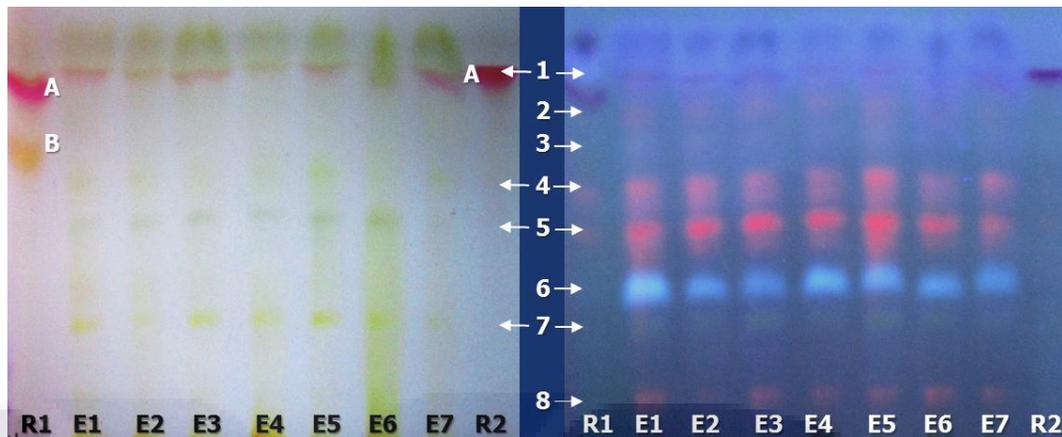


Figura 32. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes medios de cultivo. Placa izquierda: Luz Visible, Placa derecha: Luz UV. R1: Tuna, E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3, R2: Betabel. Bandas 1-8: Muestras. Bandas A y B: Bandas de betalaínas de referencia de Tuna y Betabel.

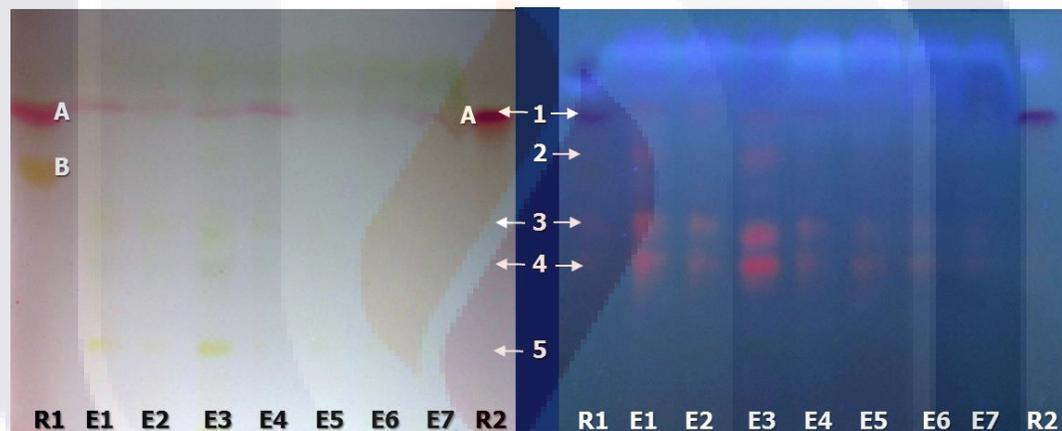


Figura 33. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes medios de cultivo. Placa izquierda: Luz Visible, Placa derecha: Luz UV. R1: Tuna, E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3, R2: Betabel. Bandas 1-5: muestras. Bandas A y B: Bandas de betalaínas de referencia de Tuna y Betabel.

En general, el patrón de bandeo de los diferentes materiales no ha cambiado con respecto al de las muestras de inicio; al principio se tenían de 7 a 8 bandas totales, dependiendo de la especie, aunque en algunas muestras se han perdido o ganado bandas coloridas, ha sido posible observar tanto al grupo de betacianinas como de betaxantinas. La técnica ha presentado problemas para identificar betaxantinas en las muestras de trabajo, y aun en ocasiones betacianinas, sobre todo por las concentraciones tan pequeñas que se tienen de estos pigmentos y la alta inestabilidad de este tipo de fitoquímicos (Herbach *et al.* 2006). Se sabe además que algunas betaxantinas fluorescen bajo luz UV (Gandía-Herrero *et al.*

2005), por lo que al observarlas en estas condiciones, podríamos identificar de alguna manera algunos de estos pigmentos.

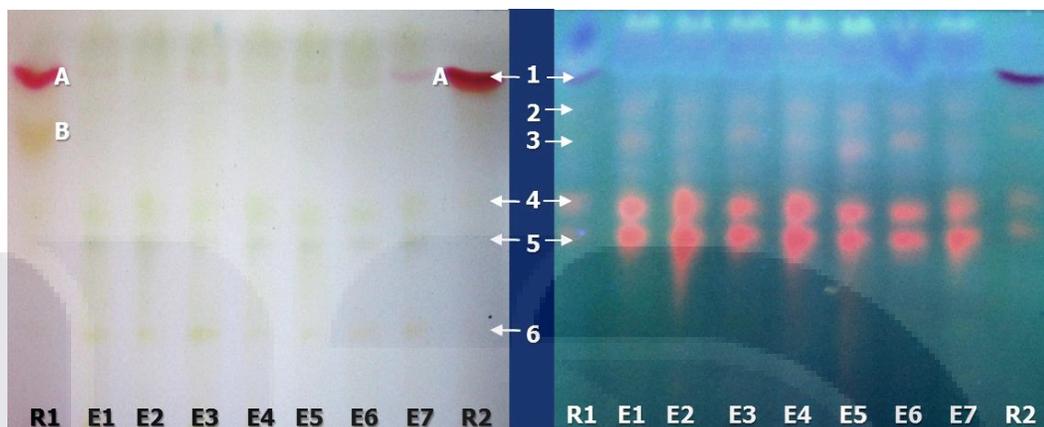


Figura 34. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes medios de cultivo. Placa izquierda: Luz Visible, Placa derecha: Luz UV. R1: Tuna, E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3, R2: Betabel. Bandas 1-6: muestras. Bandas A y B: Bandas de betalaínas de referencia de Tuna y Betabel.

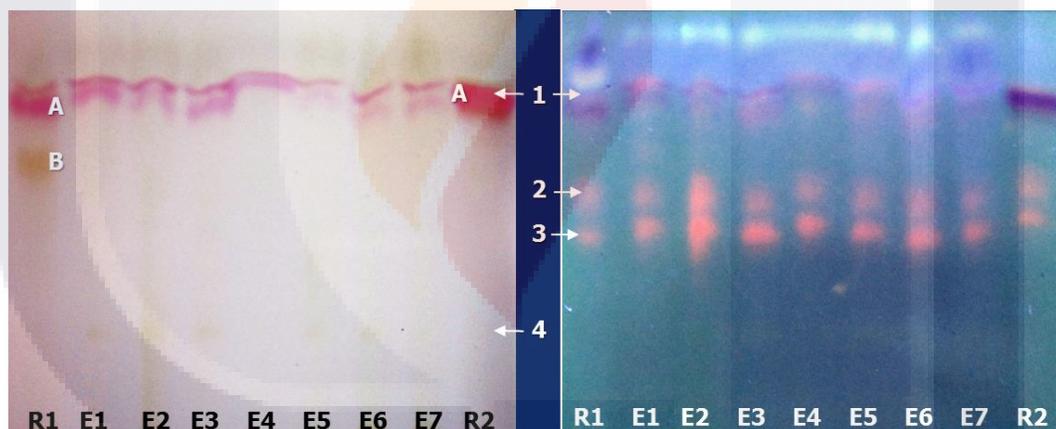


Figura 35. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes medios de cultivo. Placa izquierda: Luz Visible, Placa derecha: Luz UV. R1: Tuna, E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3, R2: Betabel. Bandas 1-6: muestras. Bandas A y B: Bandas de betalaínas de referencia de Tuna y Betabel.

En la Figura 35 podemos notar que es muy visible una banda extra en la tuna (amarillo-naranja) y en las muestras de raíces (rojo-violeta), sobre la banda rojo-violeta característica. Esto puede ser debido a varias causas, una es que fuera posible la presencia de otro pigmento del grupo de las betacianinas; otra puede ser que se degradaron los pigmentos rojo-violetas y se detectaron sus productos de degradación, que concordaría con el hecho de que se observaron partículas de precipitado en algunas soluciones antes de su aplicación

en la placa (Herbach *et al.* 2006); una última opción es que pueda deberse a algún tipo de contaminación de las soluciones, de la placa o de la fase móvil. Se requeriría un análisis más preciso con otras técnicas para determinar el origen de dichos compuestos.

Por lo tanto, es de suma importancia verificar la limpieza de los materiales, de la placa cromatográfica y de las soluciones preparadas para el desarrollo de la cromatografía, para asegurar una observación adecuada de las placas. Se sabe y se ha visto en la práctica que la cromatografía es afectada por la temperatura y humedad ambientales y que los resultados dependen en buena medida de las concentraciones de las soluciones a aplicar y de su forma de aplicación. Específicamente la concentración de los pigmentos en las muestras ha dificultado el uso de esta técnica para identificar pigmentos betalaínicos, aunado a la inestabilidad de estos pigmentos estando expuestos a la luz, al oxígeno del aire, a las temperaturas elevadas, a cambios fuertes de pH, entre otras condiciones (Herbach *et al.* 2006).

Los cálculos de Rf indican que los pigmentos rojo-violeta de las muestras pueden ser similares a los del betabel (Rf= 0.80) y a los de tuna (Rf = 0.78); estos fueron poco visibles o estuvieron ausentes en algunas de las muestras de *T. lophophoroides* (en espectrofotometría se habían encontrado en bajas concentraciones), aunque en UV pudieran observarse unas bandas casi imperceptibles blanquecinas que podrían indicar la presencia de estos pigmentos, quizás ya transformados o degradados. De acuerdo con Stintzing *et al.* (2005) la neobetanina es una betacianina amarilla que se obtiene por deshidrogenación rápida de betanina; por lo que en el caso de *T. lophophoroides*, con esas características y las observadas en las placas cromatográficas, podríamos decir que ésta especie quizás produce este tipo de pigmento, aunque para confirmarlo se hace necesario otro tipo de análisis.

Las bandas amarillas detectadas a simple vista en *E. chaffeyi* (4 y 7), en *T. laui* (3 y 5), en *T. lophophoroides* (4 y 6) y en *T. pseudopectinatus* (4) muestran pigmentos que no son similares a los de tuna (Rf= 0.62); estas bandas se observan muy tenues en algunas muestras de *T. laui*, y solo claramente en las muestras obtenidas de los medios B5 y Heller. La baja concentración de estos pigmentos en las muestras o su baja estabilidad en las

condiciones de la TLC puede imposibilitar su observación con esta técnica, ya que en tuna que tiene mayor concentración de estos pigmentos, son fácilmente identificables.

E. chaffeyi (bandas 4 y 5), *T. lophophoroides* (bandas 4 y 5) y *T. pseudopectinatus* (banda 2 y 3) aparentemente tienen compuestos similares (R_f de 0.56 y de R_f de 0.49 respectivamente); lo mismo sucede con *T. lophophoroides* (banda 6) y *T. pseudopectinatus* (banda 4, $R_f = 0.24$), con *E. chaffeyi* y *T. lophophoroides* (banda 2 de ambas especies, $R_f = 0.72$) y aunque pareciera que también son idénticas éstas dos últimas especies en la banda 3 ($R_f = 0.65$) no tienen la misma tonalidad (una es blanca y otra roja), lo cual indicaría algún compuesto con propiedades fisicoquímicas similares pero de estructura química diferente. *E. chaffeyi* presenta también dos bandas únicas (6 y 8); por lo que es la especie con mayor cantidad de compuestos, respecto a las otras especies de cactáceas analizadas.

Se observan otras bandas de color verde-grisáceo en las muestras de *E. chaffeyi*, *T. laui* y *T. lophophoroides*, aunque no en *T. pseudopectinatus*, que pudieran ser otro tipo de pigmentos o incluso betalaínas, aunque con esta prueba no es posible saberlo. En UV se detectan algunas otras bandas en color rojo (en las cuatro especies) y blanco (solo en *E. chaffeyi*), que en algunos casos concuerdan con sus bandas en visible (amarillas o verde-grisáceas) y en otros casos no presentan bandas a simple vista. Sin dudar, podemos observar la gran variedad de compuestos presentes en las raíces transformadas, que las hacen una fuente ideal de metabolitos de diversos tipos (incluyendo betalaínas), sería necesario hacer otro tipo de estudios para identificar las sustancias en particular y su potencial utilidad en la obtención de productos de interés.

6.5. Efecto que tienen diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la producción de betalaínas en RTC

6.5.1. Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalainicos

Para la especie *Escobaria chaffeyi*, se obtuvieron los datos de ganancia en peso fresco en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal (RCVs), así como las

concentraciones de pigmentos betaláinicos presentes en las raíces transformados de esta cactácea (Figura 36).

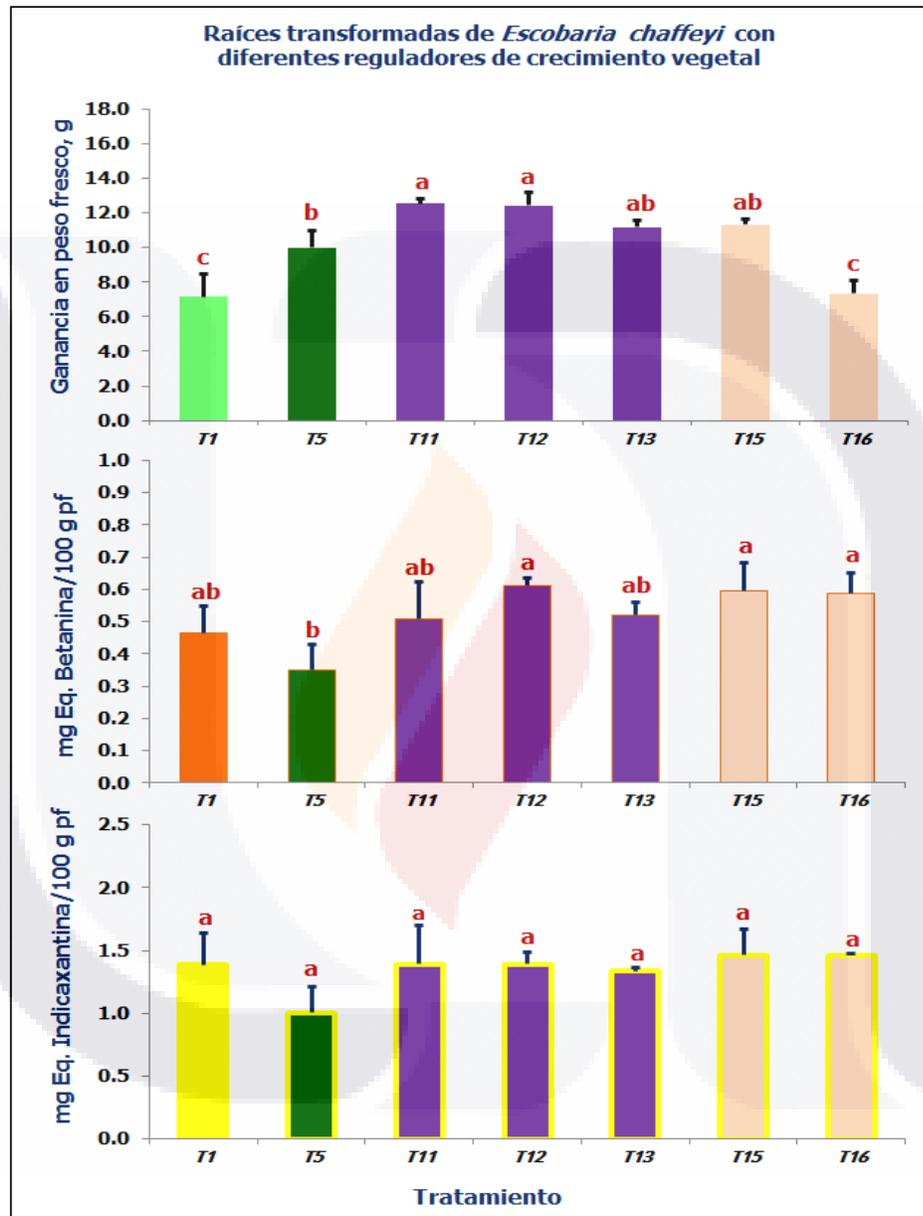


Figura 36. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. T1: testigo (medio MS); T5: MT a 5 μ M; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M respectivamente; T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 5-5 y 7-3 μ M. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Hubo tratamientos en los que no hubo respuesta: en T2, T3, T4, T6 y T7 (tratamientos con AIA, AIB, ANA, 2IP y BA, respectivamente); en T8, T9 y T10 (combinaciones de AIA y MT); y en T14 (combinación de ANA y BA a 3-7 μM); en estos cultivos el material dejó de crecer y murió a los pocos días, sin contaminarse, por lo que estas sustancias pudieron haber generado un efecto tóxico debido a que la especie puede ser muy susceptible a ellas. Los RCVs tienen un papel fundamental en el crecimiento y la biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos vegetales, pero se pueden dar alteraciones importantes en estos factores, y en la morfología del material, dependiendo del tipo y concentración de RCV, así como por ejemplo de la relación auxina-citocinina empleada. Concentraciones pequeñas han mostrado mejores resultados en el caso de cultivos de raíces pilosas (Jeong *et al.* 2007).

En cuanto a los tratamientos que arrojaron resultados para esta especie, la ganancia en peso fresco (GPF) fue mayor en la mayoría de los tratamientos, con respecto al T1 (testigo) que obtuvo un GPF de 7.155 g; solo el T16 obtuvo resultados similares. Los tratamientos T11 y T12 fueron los mejores para GPF, con una ganancia de 75 y 73 % más que T1 respectivamente; además, éstos no modificaron la morfología del cultivo. En producción de betacianinas y de betaxantinas no hubo diferencias entre tratamientos con respecto a T1 (0.46 mg EB/100 g pf). Por grupos de reguladores, los mejores tratamientos fueron del T11 al T13, combinaciones de IBA y 2IP, que forman parte de los reguladores naturales.

Cruzando la información, T15 puede ser una buena opción ya que mejoró la morfología de las raíces, aumentó en un 58 % la ganancia en peso fresco, y prácticamente no modifica la concentración de betalaínas. El T11 y el T12 también pueden ser buena opción, ya que, aunque no mejoraron la morfología ni los niveles de betalaínas, sí lograron un aumento en la GPF (alrededor de un 73 % más que T1). Los demás tratamientos no difirieron de T1 en cuanto a pigmentos, solo obtuvieron incremento de GPF en todos los casos; algunos mantuvieron la morfología y otros produjeron más tejido no definido.

Para el caso de *Turbinicarpus laui*, todos los tratamientos arrojaron resultados y se muestran en la Figura 37. El tratamiento T1 (testigo) junto con T4 arrojaron los valores más bajos de GPF (4.536 y 4.163 g, respectivamente), todos los demás tratamientos obtuvieron valores superiores en esta variable. Los mejores tratamientos fueron T11 (155 % más que T1) y

T12 (118 % más que T1), que eran combinaciones de AIB y 2IP, y T14 (117 % más que T1) combinación de ANA y BA; sin embargo, solo T12 mantuvo la morfología similar a T1, los otros dos tratamientos generaron más tejido no definido.

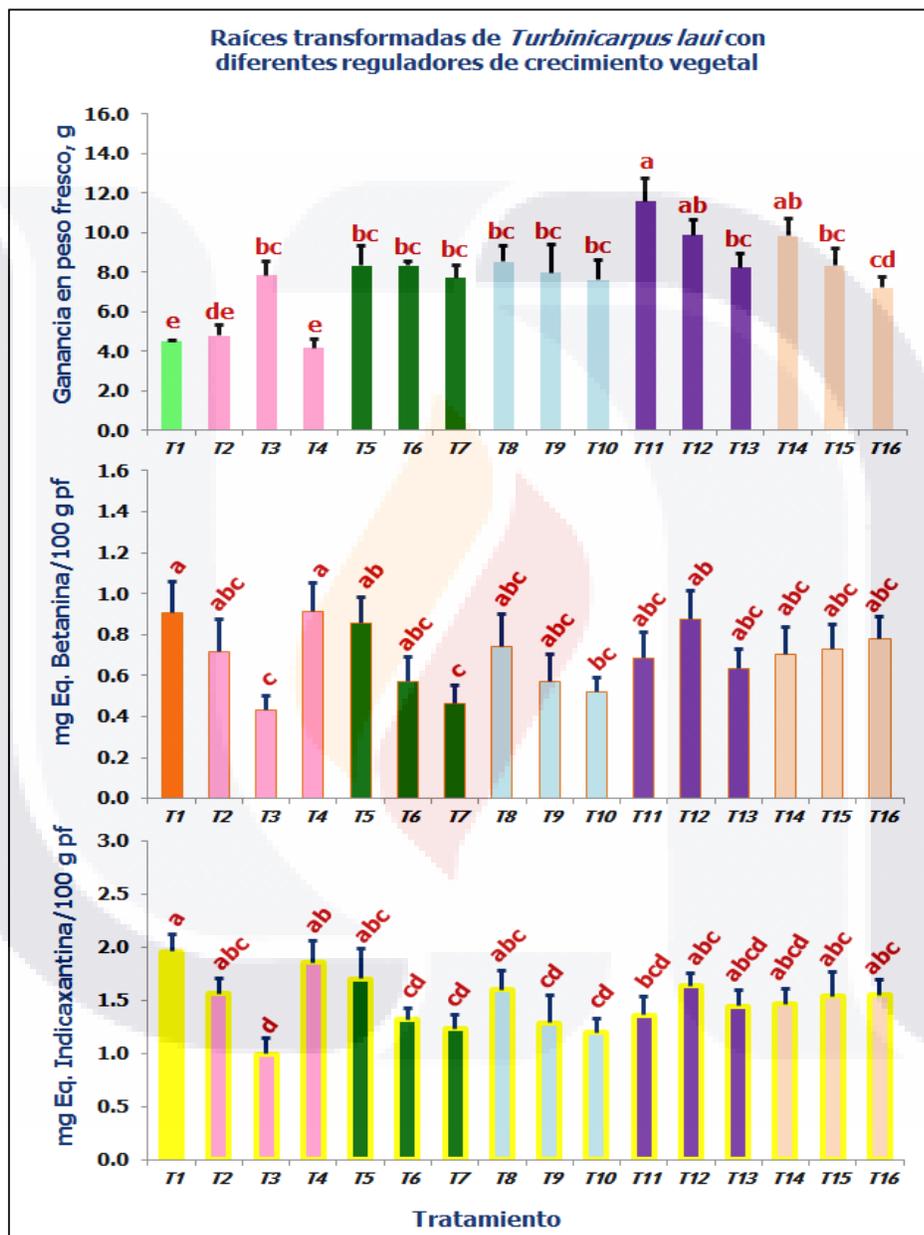


Figura 37. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. T1: testigo (medio MS); T2, T3, T4, T5, T6 y T7: AIA, AIB, ANA, MT, 2IP y BA respectivamente a 5 μ M; T8, T9 y T10: combinaciones de AIA y MT a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M respectivamente; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; T14, T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Por grupos de RCVs, se observaron valores altos de GPF en las combinaciones de AIB y 2IP (reguladores naturales): T11 al T13. Las combinaciones con predominancia de citocininas (T11 y T14) fueron las de mejores resultados comparadas con las otras combinaciones. Los tratamientos solo con auxinas (T2 y T4) reportaron los niveles más bajos de GPF. Dentro de las auxinas fue mejor usar AIB (T3) y entre citocininas no hubo diferencia. Se recomienda evitar los tratamientos T3, T7, T9 y T15 ya que generaron mayor cantidad de tejido no definido.

Para producción de BC, en la mayoría de los tratamientos no hubo diferencias significativas con respecto a T1 (0.91 mg EB/100 g pf); sin embargo, T10, T7 y T3 difirieron y obtuvieron los valores más bajos (0.52, 0.46 y 0.43 mg EB/100 g pf respectivamente). Por grupos no hubo diferencias. Dentro de las auxinas no se recomienda utilizar T3 (AIB); y por citocininas no se recomienda usar T7 (BA). Para betaxantinas, algunos tratamientos mostraron diferencias significativas con respecto a T1, pero dieron valores menores que este (1.96 mg EI/100 g pf). T3 (AIB) reportó los valores más bajos (0.99 mg EI/100 g pf). Por grupos, no hubo diferencias. Dentro de las auxinas evitar T3 (AIB) y entre citocininas no hubo diferencias.

Con la anterior información se puede observar que el mejor tratamiento fue el T12, ya que logró un aumento de 118 % en GPF con respecto a T1, mantuvo la morfología similar a T1 y no afectó la producción de betalaínas.

Para *Turbincarpus lophophoroides*, se muestran los resultados de GPF y la concentración de los pigmentos betalaínicos en las raíces transformadas de esta especie de cactácea, al ser sometidas a los diferentes tratamientos con RCVs (Figura 38). Los tratamientos T2 al T4 (solo auxinas), T5 al T7 (solo citocininas), T8 y T10 (combinaciones de AIA y MT) dieron resultados de GPF similares al tratamiento testigo T1 (4.711 g). Por otra parte, los T9 (combinación de AIA y MT), y T11 al T16 (combinaciones de AIB-2IP y ANA-BA, mejoraron la GPF desde un 73 % (T15) hasta un 91 % (T13), con respecto a T1. La morfología se mantuvo similar a T1 en T9, T12, T15 y T16, los demás tendieron a generar más tejido no definido.

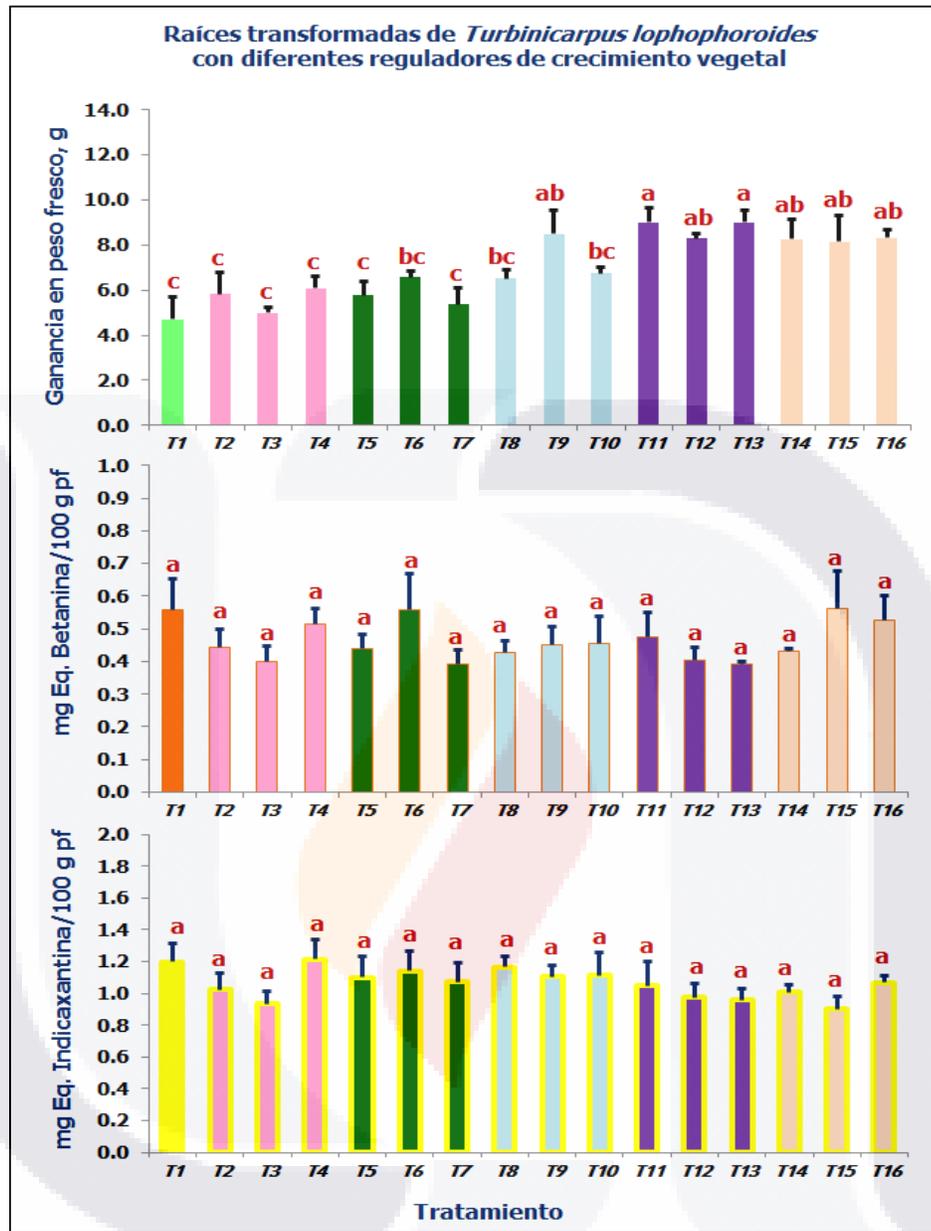


Figura 38. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalánicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. T1: testigo (medio MS); T2, T3, T4, T5, T6 y T7: AIA, AIB, ANA, MT, 2IP y BA respectivamente a 5 μ M; T8, T9 y T10: combinaciones de AIA y MT a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M respectivamente; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; T14, T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Por grupos las combinaciones auxinas-citocininas (T8 al T16), en general, tuvieron valores mayores que los demás tratamientos. Usar auxinas o citocininas solas tuvo el mismo efecto. En cuanto a la morfología los tratamientos con solo auxinas o solo citocininas y las

combinaciones con más auxinas o citocininas, favorecen la formación de tejido no definido; las combinaciones equimolares de auxinas-citocininas (T9, T12 y T15) mantienen la morfología del material como en T1. Los niveles de betalaínas se mantuvieron similares a T1 (0.56 mg EB/100 g pf y 1.20 mg EI/100 g pf).

Con esta información se puede sugerir usar los tratamientos T9, T12, T15 o T16 que aumentan la GPF en poco más del 70 % con respecto a T1, sin variar el contenido de betalaínas y manteniendo la morfología del tratamiento testigo.

Para *Turbinicarpus pseudopectinatus*, los resultados (GPF y concentración de betalaínas) obtenidos de los diferentes tratamientos con RCVs, se muestran en la Figura 39. Los diferentes tratamientos no provocaron cambios en la morfología del material. En general, todos dieron mejores resultados de GPF que el tratamiento testigo T1 (7.601 g). Los mejores tratamientos (al lograr diferencias significativas con T1) fueron T9, T12, T14 y T16, que aumentaron la GPF poco más del 50% con respecto a T1. Los demás tratamientos no difieren significativamente de éstos. Por grupos, no hubo diferencias significativas. Entre auxinas y citocininas no hubo diferencias. En contenido de betalaínas, no hubo diferencias significativas con respecto a T1 (1.18 mg EB/100 g pf y 0.71 mg EI/100 g pf)).

En base a lo anterior se puede recomendar cualquiera de las combinaciones equimolares de auxina-citocinina (T9, T12 o T15) o T16 (combinación ANA-BA a 7-3 μ M), ya que lograron valores altos de GPF (más del 50 % que T1), sin variar el contenido de betalaínas ni la morfología).

En resumen, el utilizar o no reguladores de crecimiento para la acumulación de biomasa y la producción de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de cactáceas depende del balance económico y de los requerimientos de cada especie en particular. En general, las combinaciones auxina-citocinina resultaron una buena opción para incrementar la biomasa de los cultivos de raíces estudiados, pero hay que tomar en cuenta el impacto que pueden tener en la morfología del material y en la producción de pigmentos, ya que algunos tratamientos no favorecieron estas variables. Esta situación difiere de lo que se ha realizado

en su mayoría a la fecha, puesto que se observó que no solo las auxinas son útiles para el cultivo de raíces pilosas, sino que también las citocininas juegan un papel importante.

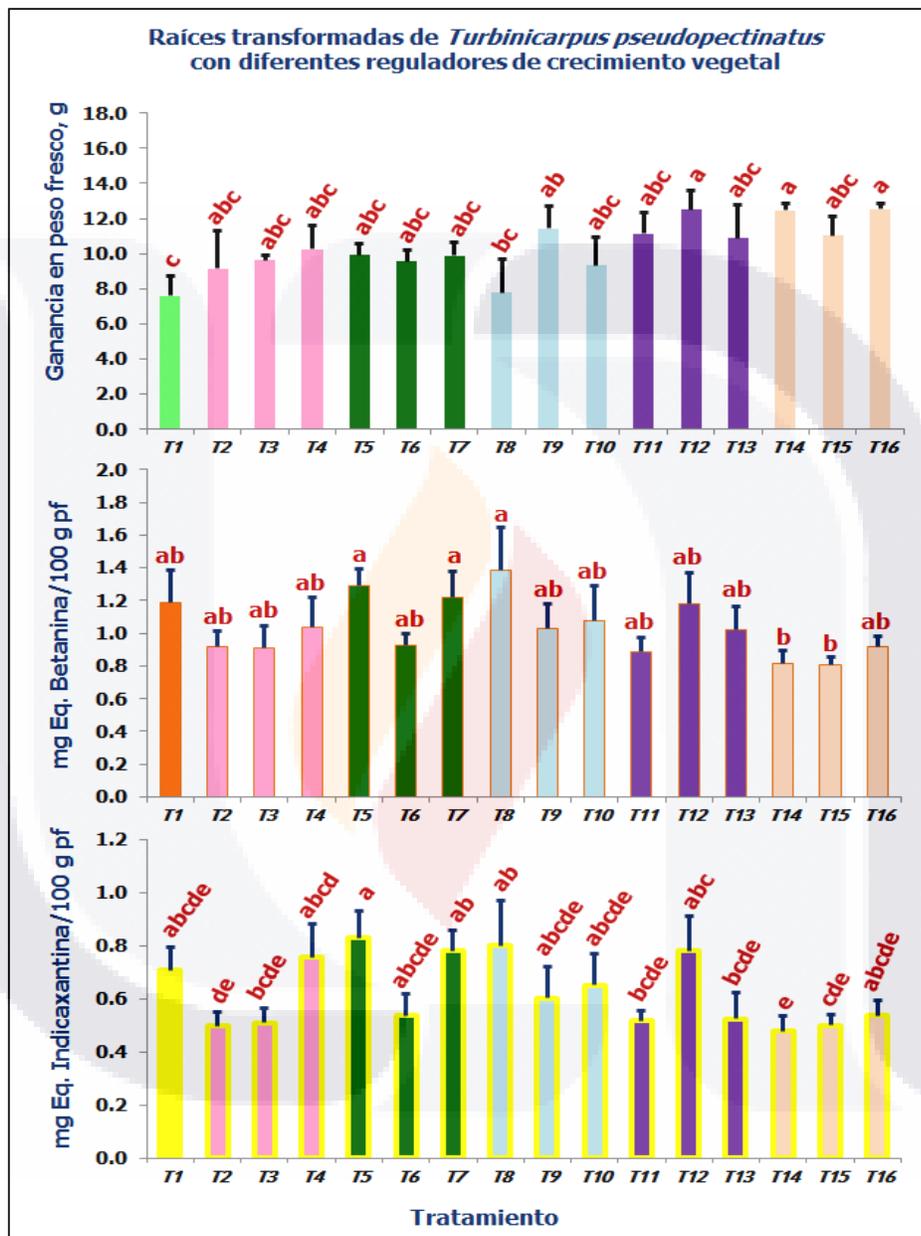


Figura 39. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalánicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. T1: testigo (medio MS); T2, T3, T4, T5, T6 y T7: AIA, AIB, ANA, MT, 2IP y BA respectivamente a 5 μ M; T8, T9 y T10: combinaciones de AIA y MT a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M respectivamente; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; T14, T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

6.5.2. Perfil de extractos betalaínicos por TLC

En lo que respecta a las cromatografías en capa fina, se muestran en la Figura 40, los resultados para *Escobaria chaffeyi* en los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento, y para los extractos de referencia (tuna y betabel). En esta primera cromatografía se encontró que los patrones de bandeo no se modificaron con los diferentes tratamientos. Se observan claramente las bandas para los extractos de referencia, en el caso de tuna su banda amarilla y la rojo-violeta, en el caso de betabel su banda rojo-violeta y muy cerca por debajo su banda amarilla. Para las muestras de *E. chaffeyi* se observaron sus bandas rojo-violetas (fila 1), que en algunos casos fueron poco perceptibles a simple vista, pero que concuerdan en sus valores de Rf con los de los extractos de referencia.

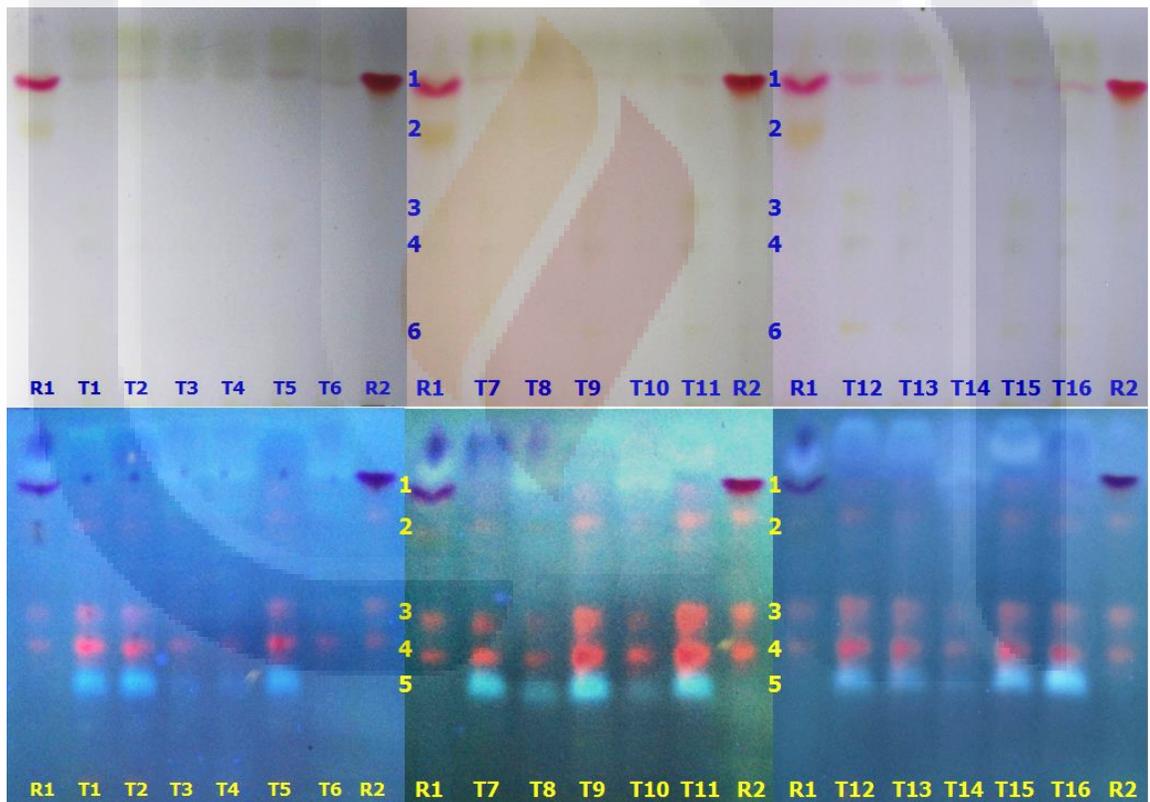


Figura 40. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. R1: tuna; T1: testigo; T2, T3, T4, T5, T6 y T7: AIA, AIB, ANA, MT, 2IP, BA a 5 μ M; T8, T9 y T10: combinaciones de AIA y MT a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M respectivamente; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; T14, T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; R2: betabel. 1-6 (azul): bandas detectadas en luz visible; 1-5 (amarillo): bandas detectadas en luz UV.

Las bandas amarillas de las muestras de *E. chaffeyi*, fueron poco visibles en algunas placas, sin embargo, se detectaron dos filas, una casi en la base (fila 6) y otra casi a la mitad de la placa (fila 3). Una banda verde-grisácea se detectó también cerca de la mitad de la placa (fila 4). Bajo luz UV fueron más visibles los rastros de las bandas verde-grisáceas y amarillas de la mitad de la placa (fila 3 y 4), las amarillas de la fila 6 no se observaron aquí; además se detectó otra banda característica de esta especie, en color blanco (fila 5). Se observaron también en UV, a la altura de la banda amarilla de la tuna (fila 2), rastros de otras bandas (en rojo) en las diferentes muestras, que pudieran indicar la presencia de algún compuesto con Rf similar.

En la Figura 41, se muestran los resultados de la cromatografía en capa fina para los extractos betaláinicos de *T. laui*, en los diferentes tratamientos con RCVs.

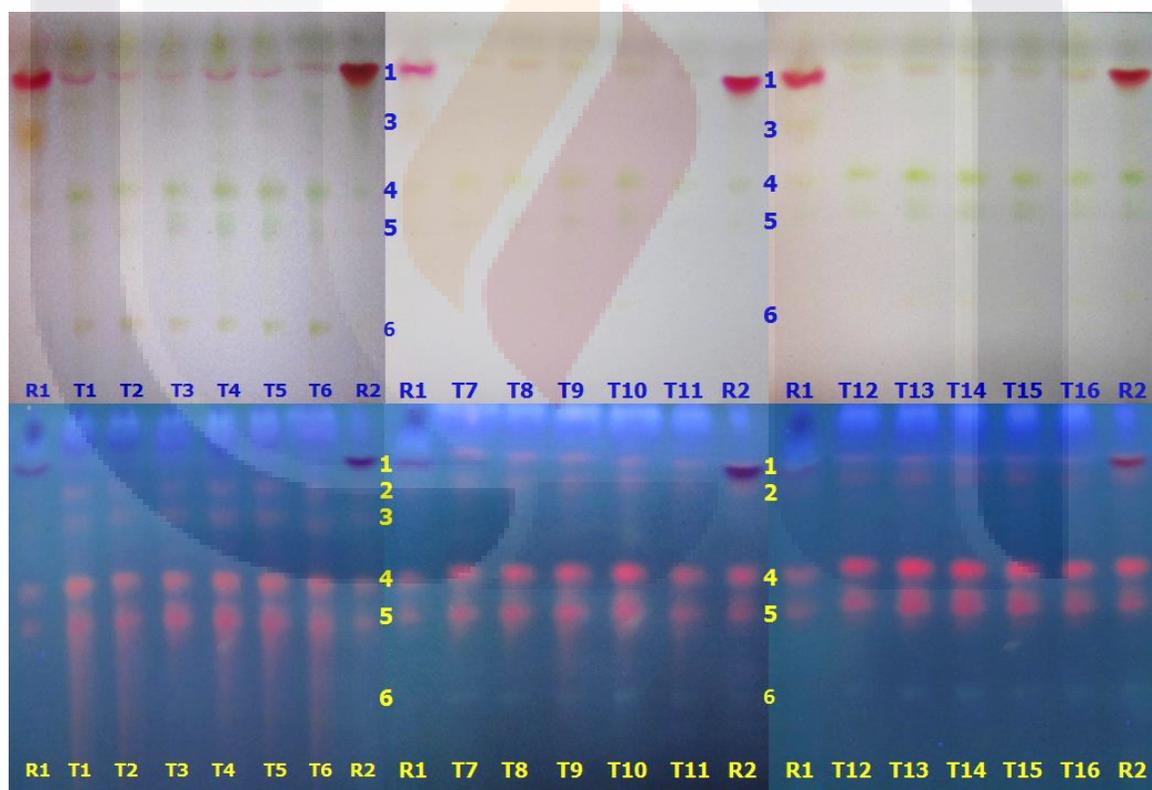


Figura 41. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. R1: tuna; T1: testigo; T2, T3, T4, T5, T6 y T7: AIA, AIB, ANA, MT, 2IP, BA a 5 μM ; T8, T9 y T10: combinaciones de AIA y MT a 3-7, 5-5 y 7-3 μM respectivamente; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μM ; T14, T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 3-7, 5-5 y 7-3 μM ; R2: betabel. 1-6 (azul): bandas detectadas en luz visible; 1-6 (amarillo): bandas detectadas en luz UV.

Se presentaron las bandas características a los extractos de referencia (tuna y betabel) y las bandas rojo-violetas de los extractos de *T. laui* (fila 1), con valores de Rf similares a los de tuna y betabel. Se observaron también, bandas amarillas cerca de la base de la placa (fila 6) y otras bandas amarillo-verdosas (fila 4) y verde-grisáceas (fila 5) en la parte media, que difirieron totalmente de las encontradas en tuna (fila 2) o betabel. En luz UV se observaron más claramente las bandas de las filas 4 y 5 en color rojo a la mitad de la placa; incluso fue posible observar en algunas placas, las bandas amarillas de la fila 6 (blanquecinas). Dos bandas adicionales no observadas en visible (de color rojo) se detectaron debajo de las bandas rojo-violetas de las betacianinas, una justo por debajo (fila 2) y la otra enseguida hacia abajo, a la altura de la banda amarilla de la tuna (fila 3), aunque esto no fue posible en todas las placas.

Para *T. lophophoroides* se encontraron resultados similares a los de *T. laui*, y estos se muestran en la Figura 42. Se obtuvieron nuevamente las bandas rojo-violeta de tuna y betabel, y las de los extractos de *T. lophophoroides* (fila 1 y 1'). Hubo un desfase en estas bandas debido a que en la placa central se pasó un poco del frente de corrida establecido, pero al comparar los Rf de todas las placas, estos resultaron ser similares ($1=1'$). En la placa central se observaron mejor las bandas rojo-violeta al visible, en las otras dos placas no fue posible observarlas más que en UV (rastros). En las placas izquierda y derecha casi se logró separar en dos bandas la correspondiente a las betacianinas de tuna, una de ellas llegó al nivel de las detectadas en UV para las muestras de *T. lophophoroides*, lo que indica que las betacianinas de tuna pueden ser más de una y de estructuras muy semejantes (Rfs muy cercanos).

Se detectaron bajo luz visible, bandas amarillas cerca de la base (fila 5); otras amarillo-verdosas (fila 3) y verde-grisáceas (fila 4) a la mitad de la placa, que dejaron su marca con luz UV, en rojo. Se observó además bajo luz UV, una banda tenue, de color rojizo (fila 2') a la altura de la de betaxantinas de tuna ($2=2'$). Los patrones de bandeo para esta especie aparentemente no variaron con el tipo de regulador de crecimiento utilizado.

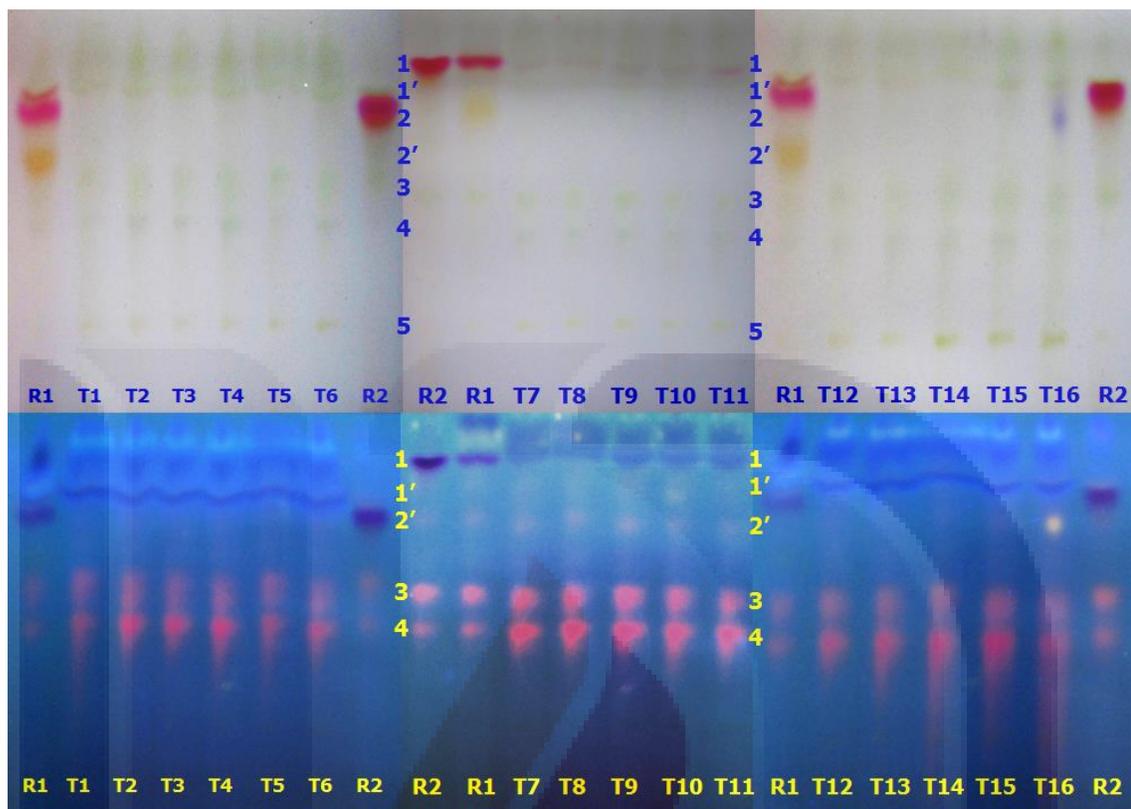


Figura 42. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. R1: tuna; T1: testigo; T2, T3, T4, T5, T6 y T7: AIA, AIB, ANA, MT, 2IP, BA a 5 μ M; T8, T9 y T10: combinaciones de AIA y MT a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M respectivamente; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; T14, T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; R2: betabel. 1-5 (azul): bandas detectadas en luz visible (1=1', 2=2'); 1-4 (amarillo): bandas detectadas en luz UV (1=1', 2=2').

Para los extractos de *T. pseudopectinatus* se tienen los resultados de la cromatografía en capa fina en la Figura 43. Aquí se observaron muy claramente los pigmentos de los extractos de tuna y betabel, así como los de las diferentes muestras (fila 1). Las bandas rojo-violetas fueron similares a las de tuna y betabel. No se observaron bandas amarillas al visible, a excepción de las de los extractos de referencia (fila 2). Bajo luz UV hubo rastros de dos filas de bandas (de color rojo) a la mitad de las placas (filas 4 y 5) que parecen ser similares a las de los pigmentos amarillo-verdosos y verde-grisáceos encontradas en las otras especies de cactáceas analizadas (valores de Rf similares).

Los tratamientos en general no modifican el patrón de bandeo ya observado en esta especie, la excepción es el tratamiento T16 (ANA y BA a 7-3 μ M), que generó una nueva banda

observada en luz UV (fila 3), amarillo-blanquecina ($R_f = 0.66$), por debajo de la de betaxantinas en tuna ($R_f = 0.69$). Lo cual podría indicar la capacidad de este tratamiento de inducir un nuevo tipo de compuesto en esta especie. Sin embargo, se requiere de otro tipo de técnicas para verificarlo. En general, para las diferentes especies de cactáceas bajo estudio, se puede afirmar que los tratamientos con RCVs no provocaron cambios en la producción de metabolitos de sus respectivas raíces transformadas.

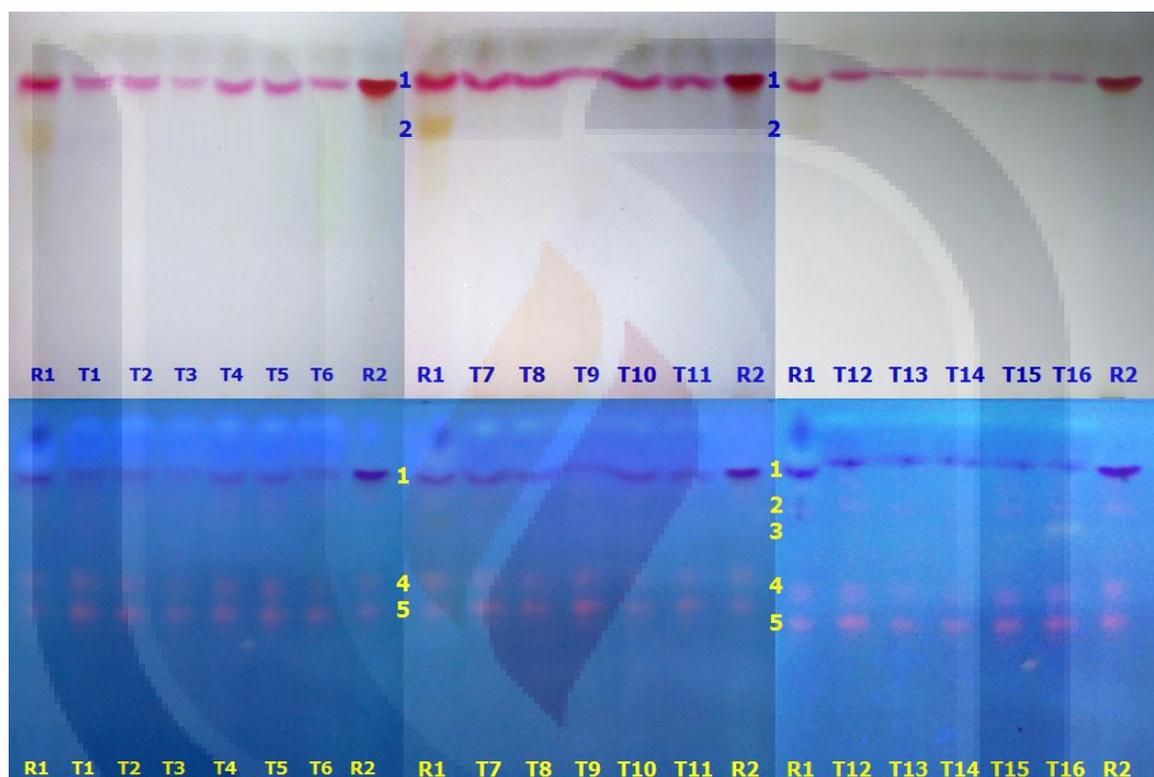


Figura 43. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento vegetal. R1: tuna; T1: testigo; T2, T3, T4, T5, T6 y T7: AIA, AIB, ANA, MT, 2IP, BA a 5 μ M; T8, T9 y T10: combinaciones de AIA y MT a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M respectivamente; T11, T12 y T13: combinaciones de AIB y 2IP a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; T14, T15 y T16: combinaciones de ANA y BA a 3-7, 5-5 y 7-3 μ M; R2: betabel. 1-2 (azul): bandas detectadas en luz visible; 1-5 (amarillo): bandas detectadas en luz UV.

6.6. Efecto de la adición de diferentes complejos nutritivos al medio, sobre la producción de betalainas en RTC

6.6.1. Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalainicos

Para el caso de *Escobaria Chaffeyi*, los resultados de GPF y concentración de betalainas, obtenidos al probar diferentes tratamientos con complejos nutritivos agregados al medio de cultivo, se muestran en la Figura 44. De los diferentes tratamientos aplicados a esta especie, solo dos generaron resultados reproducibles, el tratamiento B (Testigo) y el EM A (Extracto de Malta a 1 g/L). La GPF del tratamiento EM A no presentó diferencias significativas (t de Student, $p \leq 0.05$) con respecto a B (9.359 g). La morfología se vio modificada usando el extracto de malta ya que se generó más tejido no definido que en B. En cuanto al contenido de pigmento betalainicos, se observó también que no había diferencias significativas entre estos tratamientos respecto a la concentración de betacianinas o de betaxantinas.

Los tratamientos EL B (Extracto de levadura a 0.5 g/L), EM B (Extracto de Malta a 0.2 g/L) y PP B (polvo de plátano a 10 g/L), dieron resultados inconsistentes (no se encontró reproducibilidad aceptable: tejido muerto, poco crecimiento o incluso aparición de tejido calloso), los demás tratamientos provocaron la muerte del tejido vegetal. En general, los complejos añadidos en su mayoría resultaron tóxicos para el tejido. Esta especie resultó muy sensible a la adición de sustancias al medio de cultivo, como ya se había observado también en el caso de la adición de RCVs.

Para el caso de *Turbinicarpus laui*, se muestran en la Figura 45, los resultados de GPF y concentración de betalainas, obtenidos al probar diversos tratamientos con complejos nutritivos sobre las raíces transformadas de esta especie de cactácea. En su mayoría no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al tratamiento testigo B (8.768 g), para el caso de GPF. Solo los tratamientos HC A y CP A, difirieron y obtuvieron los valores más bajos (4.746 y 2.548 g). Por complejo, no hubo diferencias claras. Por niveles, los niveles bajos tendieron a ser mejores que los niveles altos, aunque no fue muy clara la diferencia. En cuanto a morfología, la mayoría mantuvo la misma que B, sin

embargo, se deben evitar los tratamientos con CP, EL B y EM A, ya que promovieron la aparición de mayor cantidad de tejido no definido.

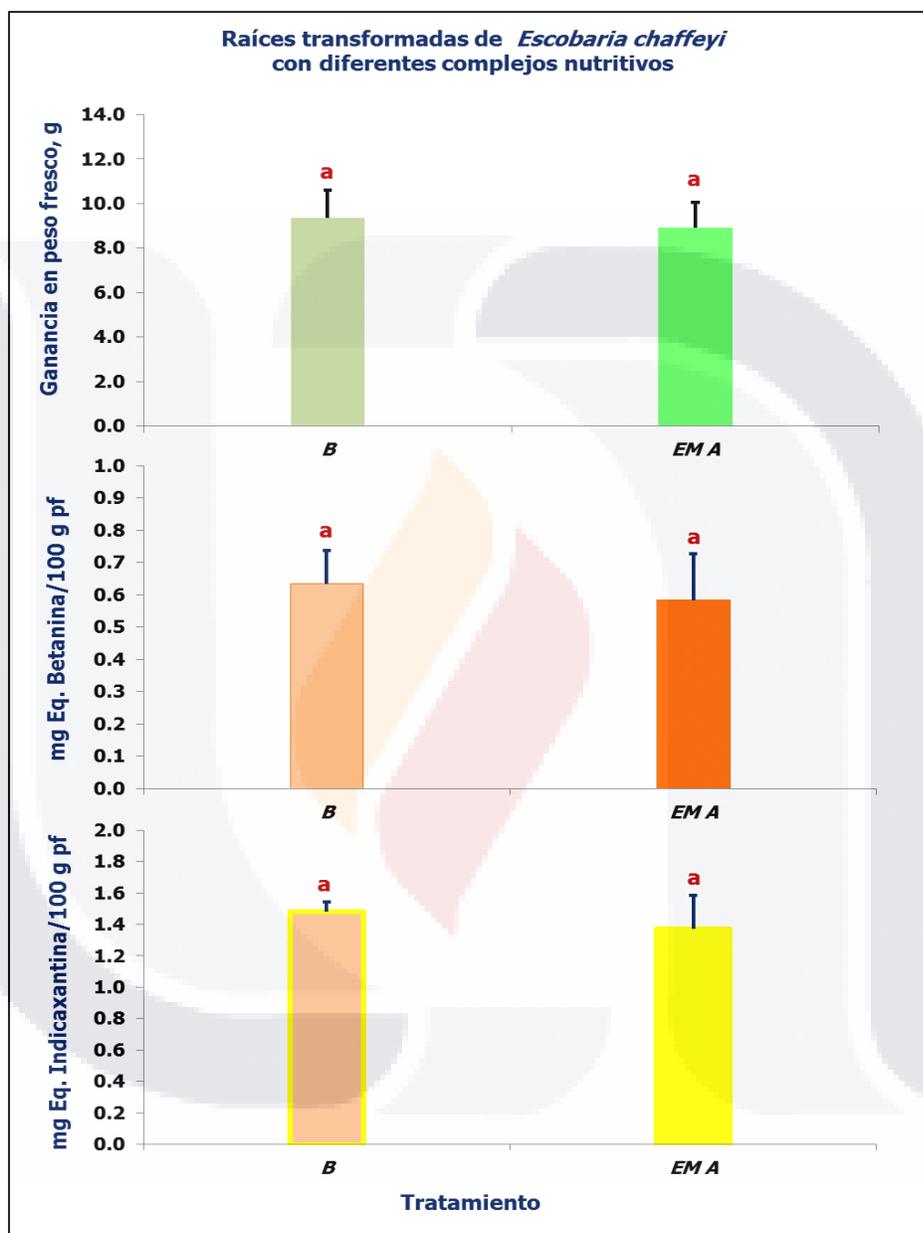


Figura 44. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalánicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (medio MS sin complejos nutritivos); EM A: extracto de malta (0.2 g/L). Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (t de Student, $p \leq 0.05$).

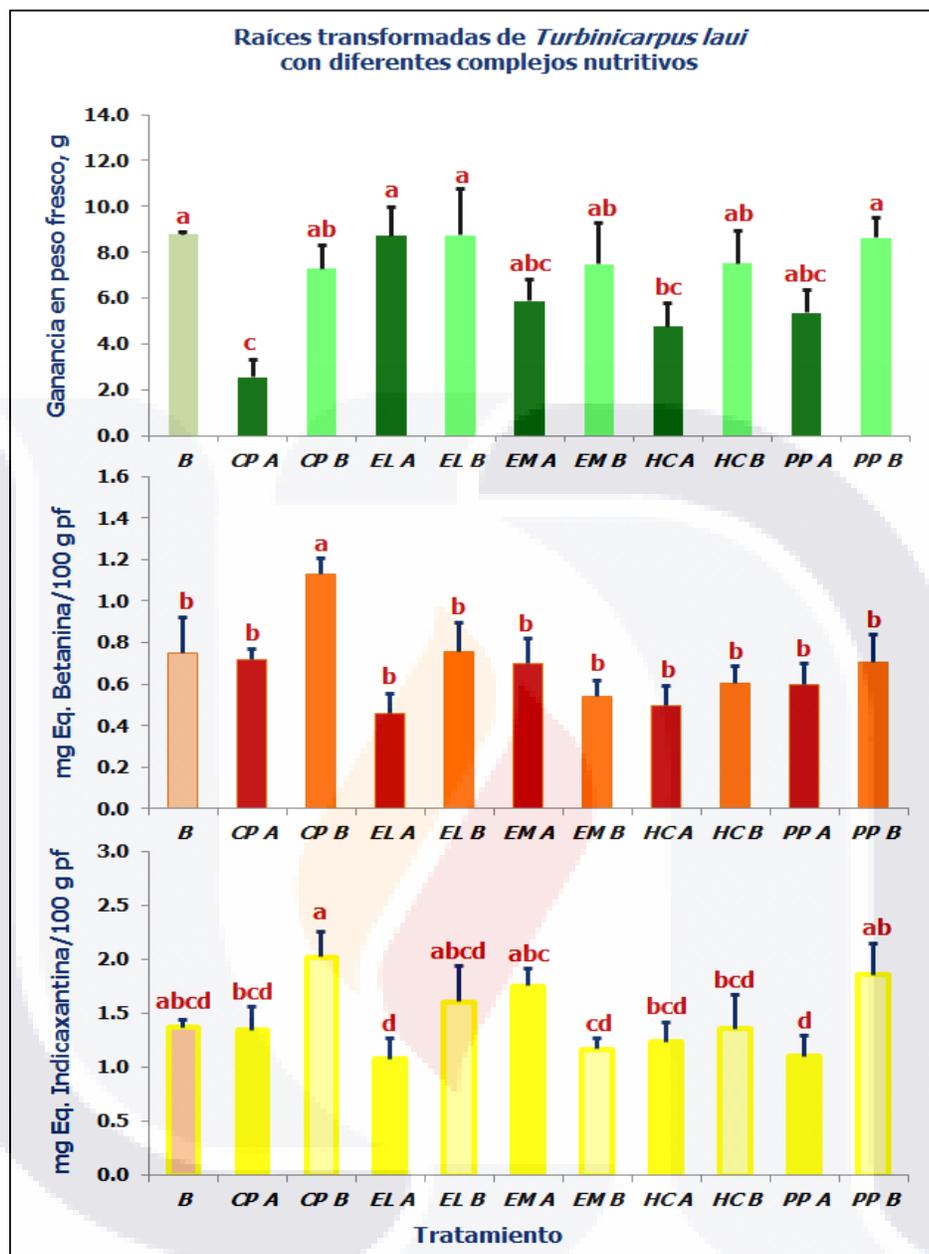


Figura 45. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (medio MS sin complejos nutritivos); CP: coco en polvo (A: 30 g/L, B: 10 g/L); EL: extracto de levadura (A: 3 g/L, B: 0.5 g/L); EM: extracto de malta (A: 1 g/L, B: 0.2 g/L); HC: hidrolizado de caseína (A: 1 g/L, B: 0.1 g/L); PP: plátano en polvo (A: 30 g/L, B: 10 g/L). Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Para betacianinas, los tratamientos no mostraron diferencias con respecto a B (0.75 mg EB/100 g pf) a excepción del tratamiento CP B que obtuvo los resultados más altos (51 % más que B), aunque generó mayor contenido de tejido no definido. Por complejo, no hubo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferencias; por nivel en su mayoría los niveles bajos tendieron a mejores valores que los altos, aunque no fue clara la diferencia. Para betaxantinas, no se encontraron diferencias entre los tratamientos con respecto a B (1.37 mg EI/100 g pf). Por complejo, no hubo diferencias. Por nivel, en varios casos los niveles bajos fueron mejores que los altos.

Con base en lo anterior, no se encontró un tratamiento que fuera adecuado para incrementar la producción de biomasa o de pigmentos betalaínicos para esta especie.

Los resultados para GPF y concentración de betalaínas de *Turbinicarpus lophophoroides* con diferentes complejos nutritivos, se muestran en la Figura 46. El tratamiento CP A provocó la muerte del material a los pocos días del cultivo, por lo que no se mostraron sus resultados en esta gráfica; esto pudo deberse a toxicidad del compuesto a esta concentración.

Para la GPF se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, aunque dieron valores más bajos que el tratamiento testigo B (6.821 g). No se encontró un tratamiento mejor que B; sin embargo, los tratamientos CP B y PP A dieron los valores más bajos de GPF (1.591 y 2.722 g respectivamente) y deben evitarse. La morfología cambió y PP A, PP B, CP B, EL A y HC B produjeron más tejido no definido. EM B mejoró la morfología de B, generando solo raíz; los demás tratamientos conservaron la morfología de B. Por complejo, no es recomendable utilizar los tratamientos con CP porque inhibieron el crecimiento del material. Por nivel, en la mayoría de los casos los niveles bajos resultaron mejores que los altos.

Para betalaínas, no se observó una diferencia de los tratamientos con respecto a B. Con base en lo anterior no se encontró un tratamiento que fuera adecuado para incrementar la producción de biomasa o de pigmentos betalaínicos en esta especie. Aunque se podría sugerir el uso de extracto de malta para mejorar la morfología radical de esta especie. No se recomienda usar los tratamientos con CP o PP A ya que inhiben el crecimiento del material.

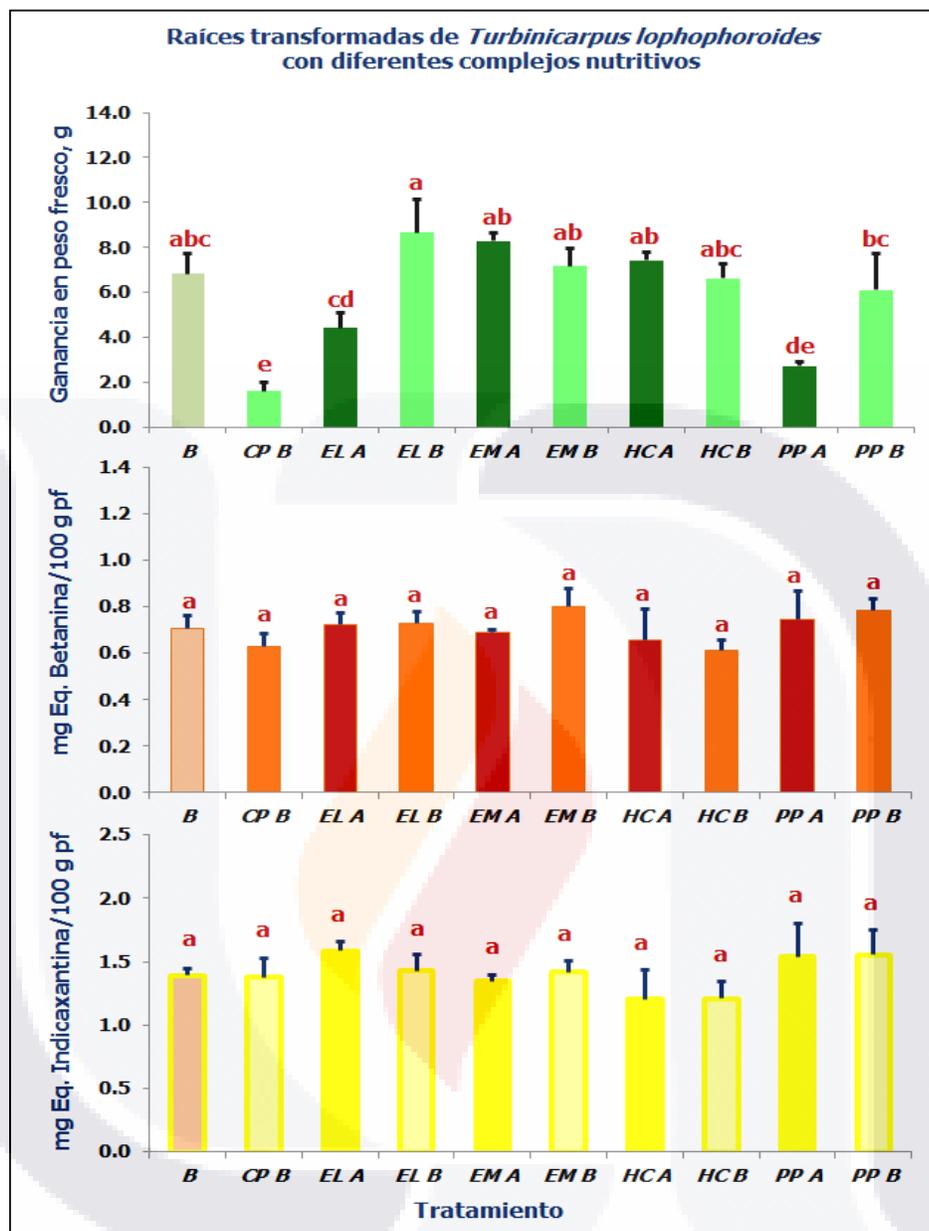


Figura 46. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (medio MS sin complejos nutritivos); CP B: coco en polvo (10 g/L); EL: extracto de levadura (A: 3 g/L, B: 0.5 g/L); EM: extracto de malta (A: 1 g/L, B: 0.2 g/L); HC: hidrolizado de caseína (A: 1 g/L, B: 0.1 g/L); PP: plátano en polvo (A: 30 g/L, B: 10 g/L). Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los resultados de GPF y contenido de betalaínas para *Turbinicarpus pseudopectinatus*, con diferentes complejos nutritivos, se muestran en la Figura 47. Con respecto a la GPF no se encontraron diferencias significativas de los diferentes tratamientos con respecto al tratamiento testigo B (9.818 g). Por complejo, no hubo diferencias significativas claras y por

nivel se observó la misma situación. En cuanto a morfología, solo los tratamientos EL B, EM A y EM B mantuvieron la morfología (RO) similar a la de B, los demás tratamientos generaron mayor cantidad de tejido no definido.

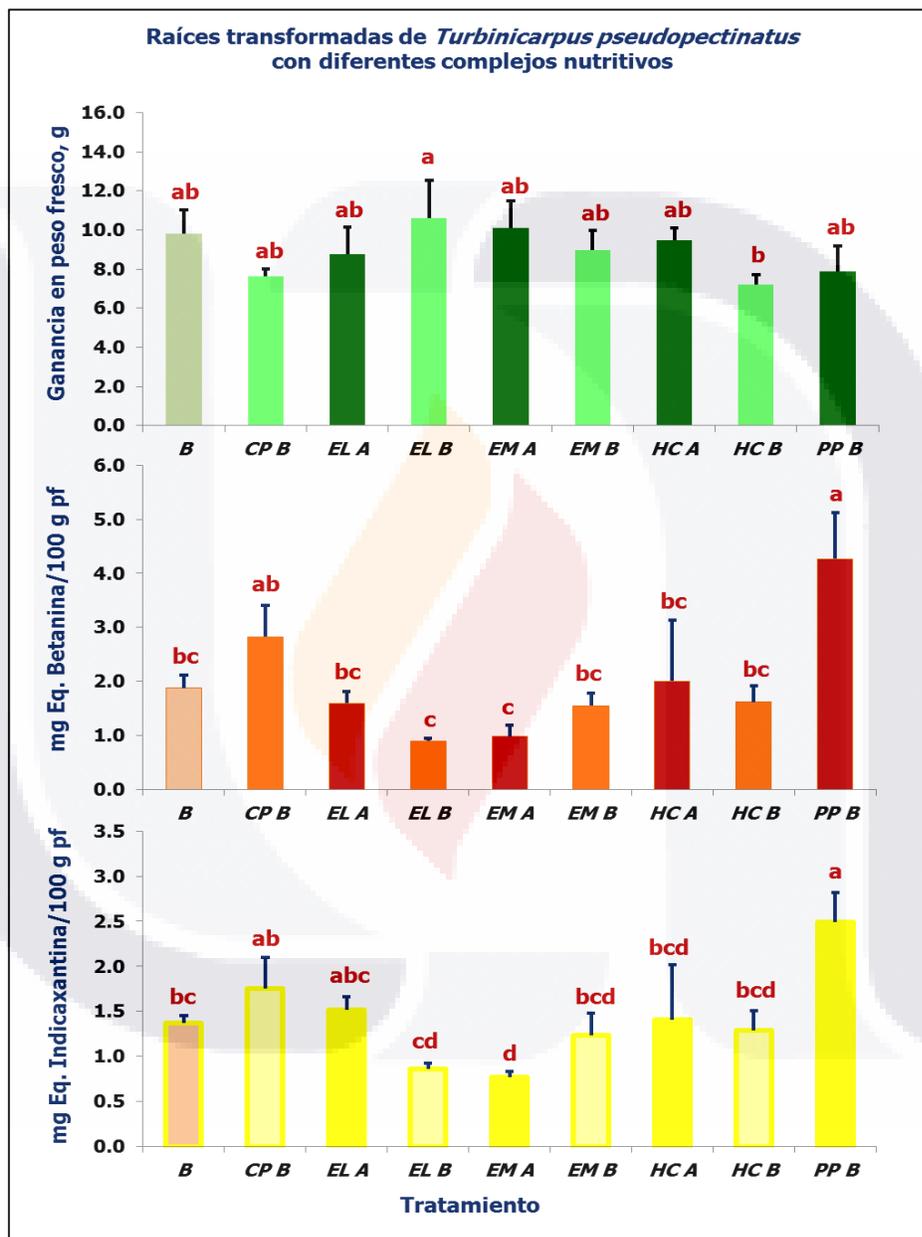


Figura 47. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (medio MS sin complejos nutritivos); CP B: coco en polvo (10 g/L); EL: extracto de levadura (A: 3 g/L, B: 0.5 g/L); EM: extracto de malta (A: 1 g/L, B: 0.2 g/L); HC: hidrolizado de caseína (A: 1 g/L, B: 0.1 g/L); PP B: plátano en polvo (10 g/L). Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

En el contenido de betacianinas, la mayoría de los tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto a B (1.87 mg EB/100 g pf), a excepción del tratamiento PP B que obtuvo el más alto nivel de pigmentos (128 % más que B), aunque generó mayor cantidad de tejido no definido. Por complejo y por nivel no se observó una diferencia clara. Para el contenido de betaxantinas, de igual forma se repitió el mismo patrón que para betacianinas, diferenciándose solamente el tratamiento PP B con los niveles más altos (42 % más que B). Por complejo y por nivel, no hubo una diferencia clara.

Los tratamientos CP A y PP A provocaron la muerte del material a los pocos días del cultivo, por lo que no se muestran en la gráfica. Esto pudo deberse a un efecto tóxico de estos compuestos a esos niveles de concentración, ya que en los casos en que se usaron niveles más bajos si se lograron obtener resultados. En uno de los tratamientos con hidrolizado de caseína (HC A), se obtuvieron valores aceptables de peso fresco en las muestras, pero los resultados del contenido de betalaínas fueron muy variables (valores altos de desviación), lo que les resta confiabilidad; esto pudo ser debido nuevamente a un efecto de toxicidad del complejo.

El hidrolizado de caseína es una mezcla compleja de compuestos nitrogenados que puede servir como fuente de macro y micronutrientes, además de ser más económicos que ciertos aminoácidos; sin embargo, no deja de ser un compuesto de naturaleza indefinida. Se ha observado su eficacia en mejorar el crecimiento de ciertos tejidos vegetales, sin embargo, también se han encontrado límites en la cantidad a utilizar dependiendo de la especie vegetal y de las condiciones de cultivo (George *et al.* 2008). El polvo de plátano promueve el crecimiento en orquídeas y tiene efectos estimulatorios no conocidos, se cree estabiliza el pH y es rico en minerales (Fe y K), vitaminas y aminoácidos. El polvo de coco también contiene gran cantidad de nutrientes, aminoácidos, vitaminas RCVs; sin embargo tanto el polvo de coco como el de plátano, suprimen la formación de raíces, afectan el crecimiento y la morfología del tejido vegetal si se usan en altas concentraciones (Nambiar *et al.* 2012).

Esto concuerda con lo observado en crecimiento para las especies analizadas; sin embargo, son interesantes los resultados obtenidos de incremento en la producción de betalaínas para el caso de *T. pseudopectinatus*. Con base en lo anterior, se puede sugerir utilizar plátano

en polvo en el medio de cultivo para estimular la producción de pigmentos, pero en concentraciones bajas; aunque habría que evaluar el impacto en la morfología del material. Se debe evitar para esta especie, el usar coco en polvo e hidrolizado de caseína en concentraciones altas.

De los resultados de las cuatro especies analizadas, no se encontró un tratamiento con complejos nutritivos que promoviera una mayor producción de biomasa en ninguna de ellas; sin embargo, en cuanto a betalaínas se encontró que el tratamiento (PP B) producía una mayor acumulación de estos pigmentos, aunque solo en la especie *T. pseudopectinatus*. En algunos materiales, se promovió la producción de tejido no definido con ciertos complejos, en especial con CP. Por complejo es preferible no usar los de coco en polvo; y por nivel, las concentraciones bajas obtuvieron los mejores resultados en muchos de los casos, aunque varía por especie y por tipo de complejo.

6.6.2. Perfil de extractos betalaínicos por TLC

En lo que respecta a las cromatografías en capa fina, los resultados para *Turbinicarpus laui*, se muestran en la Figura 48. Se observan aquí las bandas rojo-violetas y amarillas, características de los extractos de referencia tuna y betabel. También se pueden ver las bandas rojo-violetas de los extractos de *T. laui* (excepto en el tratamiento de CP A y en el tratamiento PP A donde se ven más difusas), que son similares a las de tuna y betabel (fila 1). En el caso de otras bandas, se observaron al visible tres más: unas amarillas cerca de la base (fila 5), otras amarillo-verdosas (fila 3) y unas verde-grisáceas en la mitad de la placa (fila 4). En UV se detectaron las mismas bandas (en amarillo las de la fila 5 y en rojo las de las filas 3 y 4); además se detectó otra fila de bandas rojas a la altura de la amarilla de tuna (fila 2 UV), excepto para CP A (en PP A se observó muy difusa). El patrón de bandeo se mantiene sin cambio con respecto al del testigo, sin importar el tipo de complejo nutritivo utilizado.

Para *Turbinicarpus lophophoroides*, la cromatografía en capa fina arroja los resultados que se muestran en la Figura 49. Se observaron las bandas rojo-violetas y amarillas, correspondientes a los extractos de referencia (tuna y betabel). En el visible se observaron muy tenues las bandas rojo-violeta (fila 1) de los extractos de *T. lophophoroides* (solo en la

segunda placa) en la primera no fue posible detectarlos, sin embargo, en luz UV si se observa el rastro que dejan estos pigmentos en la posición en que deberían de verse en visible (este tipo de pigmentos como se había comentado anteriormente son muy fácilmente degradables, por lo que se había sospechado de la presencia de neobetanina; este resultado sigue apoyando esa suposición).

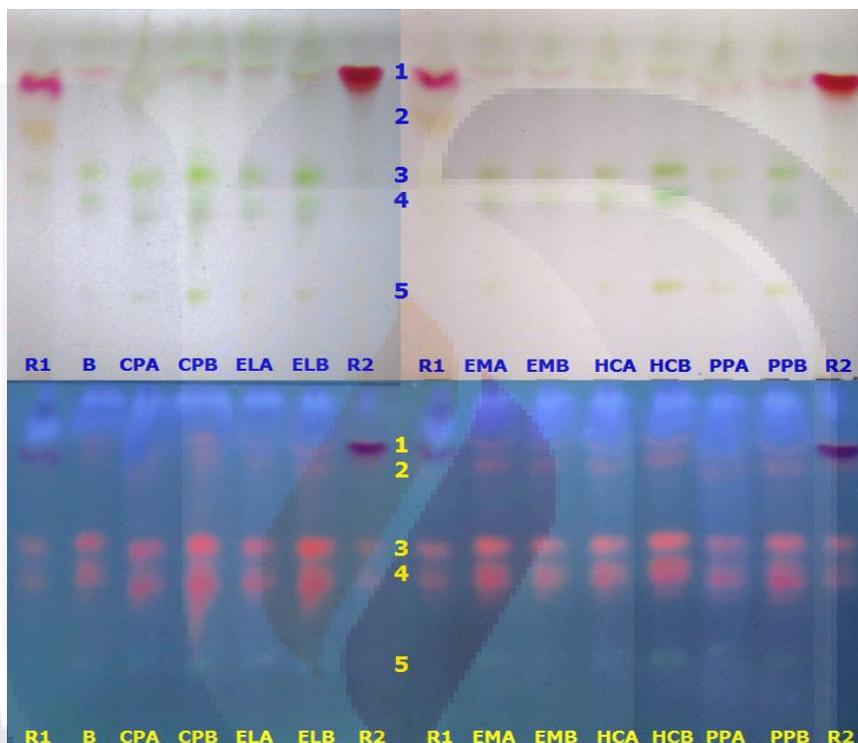


Figura 48. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. R1: tuna; B: testigo; CP: coco en polvo (A: 30 g/L, B: 10 g/L); EL: extracto de levadura (A: 3 g/L, B: 0.5 g/L); R2: betabel; EM: extracto de malta (A: 1 g/L, B: 0.2 g/L); HC: hidrolizado de caseína (A: 1 g/L, B: 0.1 g/L); PP: plátano en polvo (A: 30 g/L, B: 10 g/L). 1-5 (azul): bandas detectadas en luz visible; 1-5 (amarillo): bandas detectadas en luz UV.

En cuanto a los pigmentos amarillos, se detectaron de tres a cuatro bandas: unas amarillas en la base (fila 6), otras amarillo-verdosas (fila 4) y verde-grisáceas (fila 5) en la mitad de la placa y otras verde-grisáceas a la altura de la banda amarilla de la tuna (fila 2), aunque solo se observan muy tenues en la segunda placa. Todas estas bandas son visibles en luz UV y en ambas placas (de color rojo y amarillo). Bajo luz UV, pareciera observarse otra línea de bandas rojas (fila 3) justo encima de las correspondientes a las amarillo-verdosas, aunque son muy tenues.

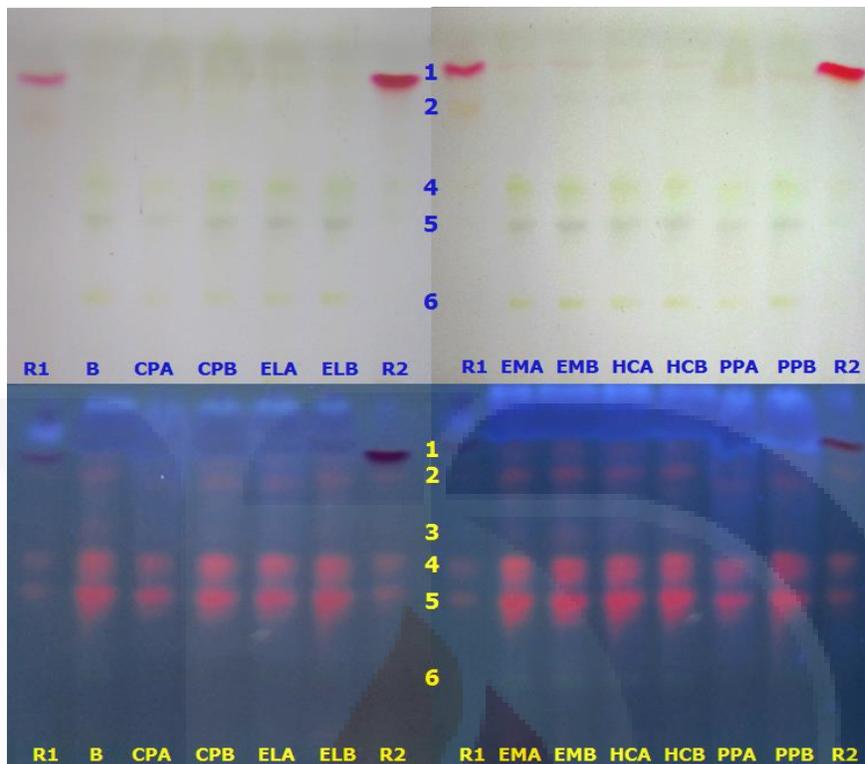


Figura 49. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. R1: tuna; B: testigo; CP: coco en polvo (A: 30 g/L, B: 10 g/L); EL: extracto de levadura (A: 3 g/L, B: 0.5 g/L); R2: betabel; EM: extracto de malta (A: 1 g/L, B: 0.2 g/L); HC: hidrolizado de caseína (A: 1 g/L, B: 0.1 g/L); PP: plátano en polvo (A: 30 g/L, B: 10 g/L). 1-6 (azul): bandas detectadas en luz visible; 1-6 (amarillo): bandas detectadas en luz UV.

Para *Turbinicarpus pseudopectinatus* y *Escobaria chaffeyi* se obtuvieron los resultados de la Figura 50. Aquí se pueden observar las bandas rojo-violetas y amarillas características de los extractos de referencia tuna y betabel (fila 1 y 2), y las bandas rojo-violeta y amarillo-verdosas de las muestras de *T. pseudopectinatus* y *E. chaffeyi* (filas 1 y 3-6).

En las placas observadas bajo luz visible, *T. pseudopectinatus* mostró claramente sus bandas rojo-violetas y se puede notar que hay dos bandas de este color casi superpuestas, lo que puede indicar la presencia de diferentes tipos de betacianinas; los valores de Rf para las bandas rojo-violeta inferiores fueron similares a los de tuna ($R_f = 0.79$) y para las bandas rojo-violetas superiores fueron similares a los de betabel ($R_f = 0.82$); las muestras de *E. chaffeyi* dieron valores de Rf similares a los de betabel. Las bandas de color amarillo-verdoso en la placa izquierda no fueron tan evidentes, pero en la derecha si se lograron definir más, aunque no en todos los casos. *E. chaffeyi* dio bandas más tenues y definidas (rojo-violeta y amarillo-verdoso) similares a las de *T. pseudopectinatus* (R_f similares). Bajo luz UV se

observaron más evidentemente (para ambas especies) las bandas en rojo de las filas 3 y 4; ya no se detectaron aquí las bandas de la fila 6 ni 2, pero aparecieron las bandas blanquecinas características de la especie *E. chaffeyi* (fila 5).

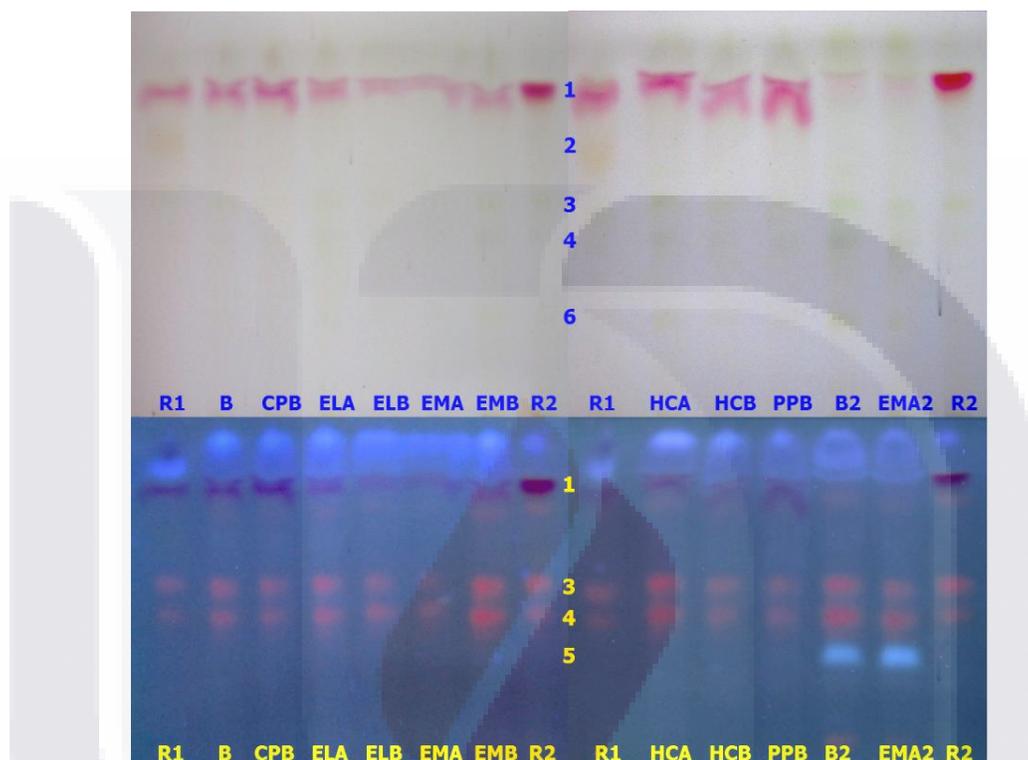


Figura 50. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* y *E. chaffeyi* en diferentes tratamientos con complejos nutritivos. R1: tuna; muestras *T. pseudopectinatus* (B: testigo, CP B: coco en polvo [10 g/L], EL: extracto de levadura [A: 3 g/L, B: 0.5 g/L], EM: extracto de malta [A: 1 g/L, B: 0.2 g/L], R2: betabel, HC: hidrolizado de caseína [A: 1 g/L, B: 0.1 g/L], PP B: plátano en polvo [10 g/L]; muestras *E. chaffeyi* (B2: blanco, EMA2: Extracto de malta [1 g/L]). 1-6 (azul): bandas detectadas en luz visible; 1-5 (amarillo): bandas detectadas en luz UV.

En general, para ambas especies, el patrón de bandeo de los diferentes extractos fue similar al de su extracto testigo correspondiente, por lo que el complejo nutritivo no mostró un efecto diferenciador en la síntesis de betalainas en estas especies vegetales.

Resumiendo, el patrón de bandeo de las raíces transformadas de las diferentes especies de cactáceas analizadas, no es modificado por la adición de complejos nutritivos en el medio. Se sigue conservando la diversidad de metabolitos que se sintetizan en las diferentes muestras de raíces transformadas.

6.7. Efecto de la adición de precursores de la ruta biosintética sobre la producción de betalainas en RTC

6.7.1. Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalainicos

Para esta prueba se utilizaron solo las especies *Turbinicarpus laui*, *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus* ya que en un primer intento todos los cultivos se contaminaron, y posteriormente en un segundo intento ya no se contó con material suficiente de la especie *Escobaria chaffeyi* y no fue posible incluirla. En general, está última especie ha mostrado una cierta resistencia a cualquier cambio de condiciones de cultivo y ha presentado problemas para generar suficiente material de trabajo.

Para el caso de *Turbinicarpus laui*, los resultados de GPF y contenido de betalainas obtenidos por la adición de precursores de la ruta biosintética de las betalainas (tirosina y prolina) se muestran en la Figura 51. Para esta especie no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos en ninguna de las variables analizadas (GPF, contenido de betacianinas y contenido de betalainas) con respecto al tratamiento testigo B (3.594 g; 0.33 mg EB/100 g pf y 0.07 mg EI/100 g pf). Con base en estos resultados no se encontró un tratamiento que pudiera incrementar la producción de biomasa o de pigmentos betalainicos. Los tratamientos de prolina (PA y PB) y el de tirosina (TB) mejoraron la morfología de las raíces por lo que resultaron favorables para el cultivo, los demás tratamientos no mostraron diferencias morfológicas con respecto a B.

La Figura 52 muestra los resultados obtenidos para *T. lophophoroides* con la adición de precursores de las betalainas (prolina y tirosina). Se observó que el adicionar solo prolina en cualquiera de las concentraciones probadas o tirosina en una concentración baja, se incrementaba el valor de la GPF hasta en un 99 % con respecto al valor del tratamiento testigo B (2.807 g); al agregar la mezcla P-T o tirosina en mayor concentración no se obtuvo una diferencia significativa con respecto a B. La morfología se mejoró notablemente con los tratamientos PA, PB y TB, los tratamientos P-T y TA generaron solo tejido no definido.

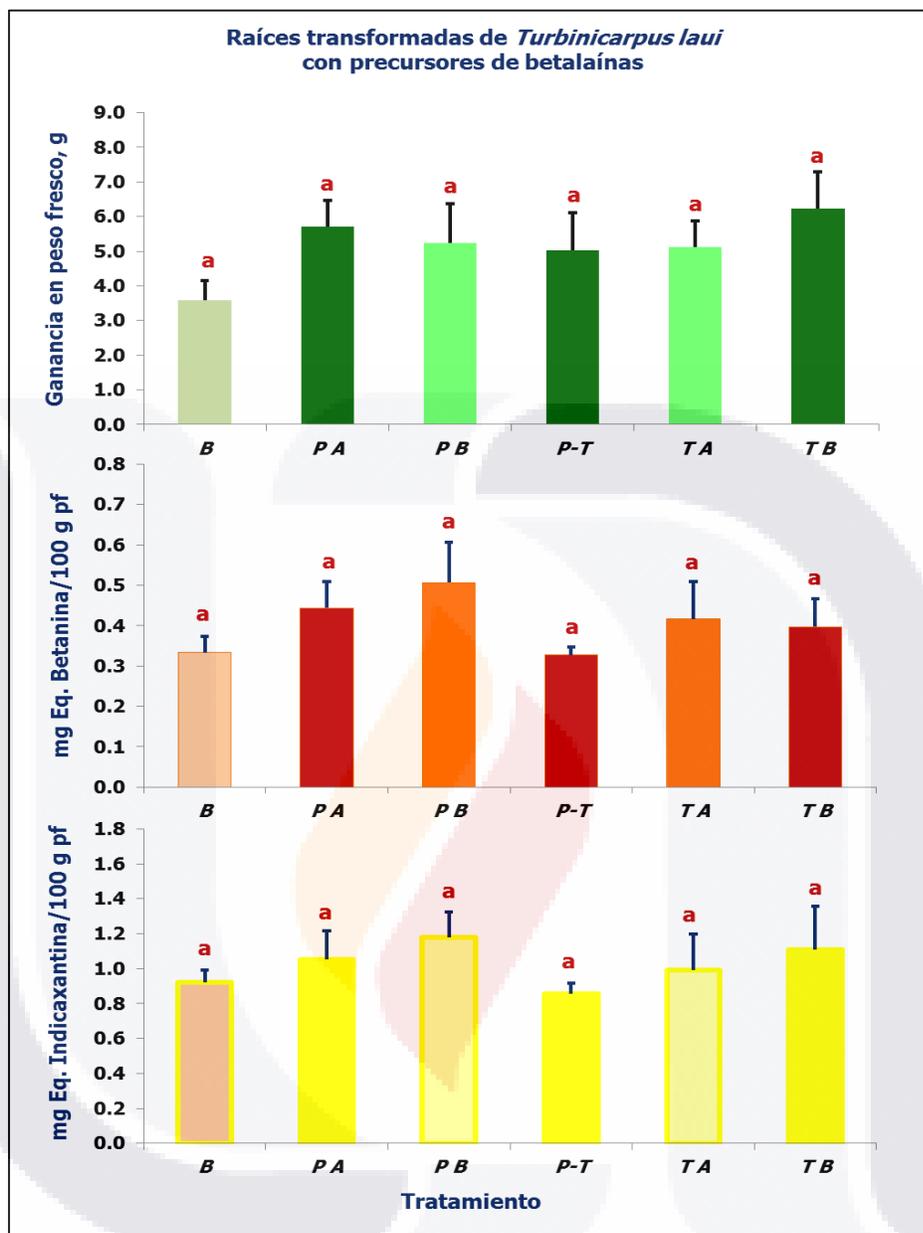


Figura 51. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalainicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con precursores de betalainas. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (medio MS sin precursores); P: prolina (A: 1 mM y B: 0.1 mM); P-T: prolina-tirosina a 0.5-0.5 mM; T: tirosina (A: 1 mM y B: 0.1 mM). Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Para betacianinas, los tratamientos no mostraron diferencias significativas con respecto a B (0.42 mg EB/100 g pf), aunque se observó que era mejor utilizar PA o PB que P-T, que fue el tratamiento con los valores más bajos. Para betaxantinas, se encontraron diferencias significativas con respecto a B (1.15 mg EI/100 g pf) del tratamiento PB (1.30 mg EI/100 g

pf) mostrando los valores más altos de betaxantinas, y del tratamiento P-T (1.02 mg EI/100 g pf) con los valores más bajos, los demás tratamientos no difieren de B. Con base en esto, añadir prolina o tirosina en una concentración baja fue favorable para generar biomasa, para la producción de betaxantinas (solo con prolina) y para la morfología de esta especie.

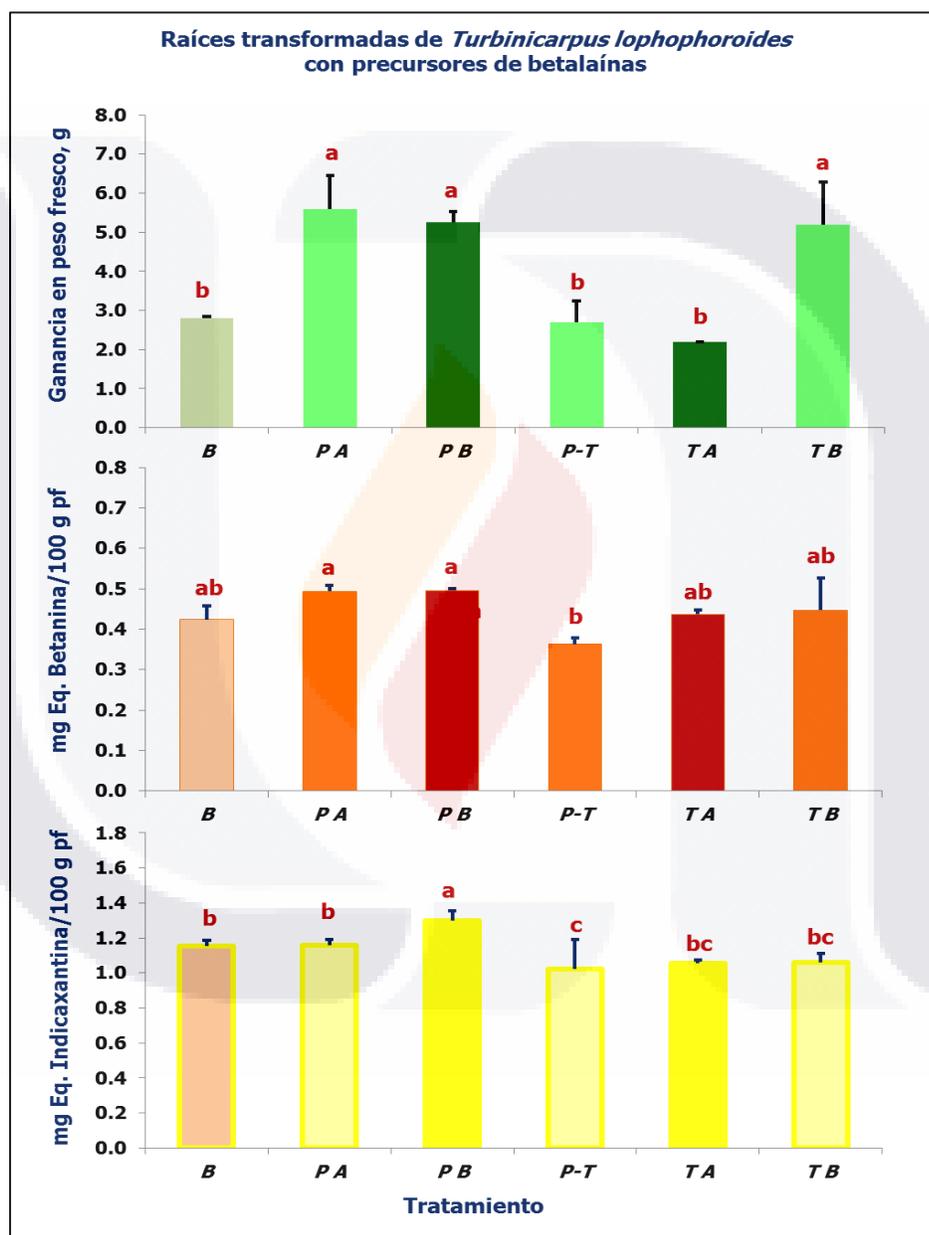


Figura 52. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con precursores de betalaínas. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (medio MS sin precursores); P: prolina (A: 1 mM y B: 0.1 mM); P-T: prolina-tirosina a 0.5-0.5 mM; T: tirosina (A: 1 mM y B: 0.1 mM). Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

La Figura 53 muestra los resultados de GPF y contenido de betalaínas para *T. pseudopectinatus* ante la adición de precursores de la ruta de las betalaínas (prolina y tirosina). El usar los tratamientos P-T, PA y TA no logró incrementar significativamente la GPF con respecto al tratamiento testigo B (3.978 g), sin embargo, el utilizar prolina o tirosina en bajas concentraciones logró un incremento de la GPF de más del 94 %. Con los tratamientos PA, PB y TB se mejoró la morfología de los cultivos, los demás tratamientos no modificaron la morfología con respecto a B.

Para betacianinas, no se encontró una diferencia significativa de los tratamientos con respecto a B (1.97 mg EB/100 g pf), sin embargo, resultó mejor utilizar P-T que PA para generar mayor contenido de betacianinas. Para betaxantinas, solo el tratamiento PA difirió significativamente de B (1.20 mg EI/100 g pf) dando los valores más bajos (0.79 mg EI/100 g pf). Con base en esto, utilizar prolina o tirosina en bajas concentraciones puede mejorar la ganancia de biomasa sin afectar el contenido de pigmentos betalaínicos, además de generar una mejora en la morfología de estas raíces.

En general, se puede concluir que el utilizar prolina especialmente en bajas concentraciones, o tirosina solo en baja concentración, resulta favorable para la generación de biomasa y para la morfología radical, y en algunos casos la prolina en baja concentración logró generar mejores resultados en producción de betaxantinas; sin embargo, los resultados varían entre especies.

En diversos estudios se ha encontrado que la adición de precursores aminoácidos, puede lograr incrementos en la producción de ciertos metabolitos; la prolina y la tirosina son importantes en este caso, ya que son intermediarios de la ruta biosintética de las betalaínas. Analizando los resultados, los efectos negativos de la tirosina (morfología radical menos definida y menor crecimiento) se obtuvieron en la concentración más alta, lo cual concuerda con lo reportado por Kleinowski y colaboradores (Kleinowski *et al.* 2014); sin embargo, la producción de betalaínas no se incrementó como ellos lo observaron en el caso de *Alternanthera philoxeroides*.

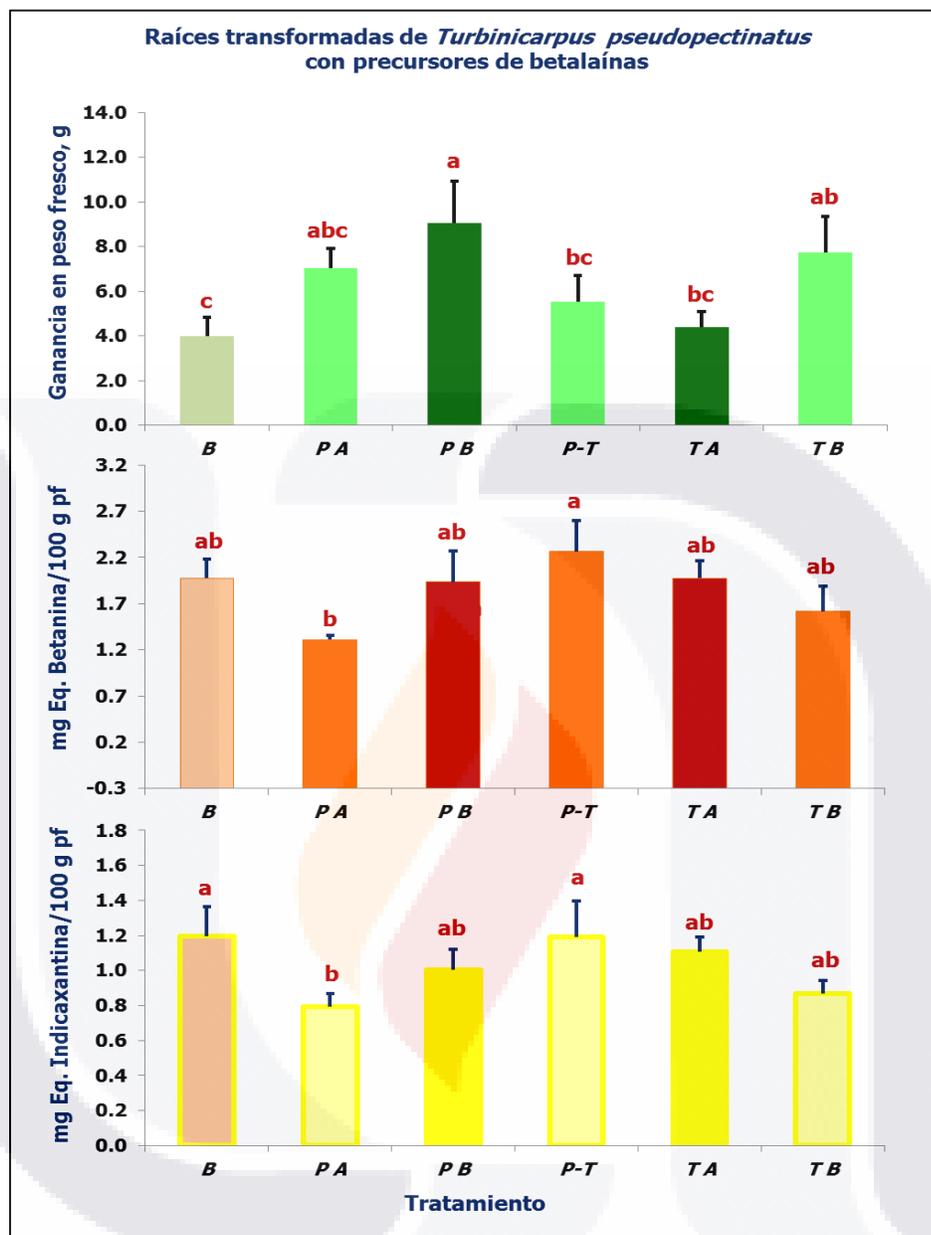


Figura 53. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con precursores de betalaínas. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (medio MS sin precursores); P: prolina (A: 1 mM y B: 0.1 mM); P-T: prolina-tirosina a 0.5-0.5 mM; T: tirosina (A: 1 mM y B: 0.1 mM). Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

En el caso de la prolina, se sabe que puede influir en el desarrollo vegetal y en la respuesta al estrés, es capaz de proteger la integridad proteínica, mejorar la actividad enzimática, actuar como antioxidante y también como molécula señalizadora; sin embargo, bajo ciertas condiciones, el uso de prolina exógena puede ser perjudicial para las plantas e inhibir su

crecimiento (Szabados & Savouré 2010). Tomando en cuenta esta información, los resultados obtenidos en este trabajo para los tratamientos con prolina, apoyan su efecto protector y en algunos su efecto regulador del crecimiento y de la biosíntesis de metabolitos. No obstante, la respuesta ante este compuesto varía según la especie.

6.7.2. Perfil de extractos betalaínicos por TLC

En lo referente a las cromatografías en capa fina, se pueden observar los resultados para *T. laui* en la Figura 54. Se identificaron claramente las bandas correspondientes a los extractos de referencia (tuna y betabel, filas 1, 2 y 3), así como las bandas rojo-violetas y amarillas de los extractos (filas 1, 4, 5 y 6). El patrón de bandeo de los extractos de *T. laui* no difirió con respecto del testigo, aunque en este último se observaron las bandas amarillas (filas 4, 5 y 6) más tenues. Las bandas rojo-violetas de las muestras no fueron fáciles de distinguir en algunos casos (fila 1) pero se encontraron similares a la de la tuna (R_f similares) y diferentes a la de betabel. Las bandas amarillas y amarillo-verdosas de las muestras no concordaron con las de la tuna (fila 3). En general, se pudieron ver para las muestras, las mismas bandas tanto en visible como bajo luz UV, por lo tanto, no se encontraron diferencias al usar alguno de los precursores probados.

Para *T. lophophoroides*, la Figura 55 muestra los resultados de la cromatografía en capa fina. En este caso se observaron las bandas rojo-violetas de los extractos de referencia (fila 1 y 2) y concordaron muy claramente con las de los extractos de esta especie (aunque en la tuna aparecieron dos bandas superpuestas, pero una de ellas concordó con la de las muestras, la otra se observó un poco abajo). Los pigmentos amarillos de la tuna (fila 3) no concordaron con los pigmentos de las muestras (bandas amarillas y verdosas, filas 4, 5 y 6), esto sugiere que son compuestos diferentes. Bajo luz UV se pudieron observar las bandas de las filas 4 y 5 pero no las de la fila 6, así como los indicios de las bandas rojo-violetas de las muestras (fila 1). En general, el patrón de bandeo no difirió del testigo.

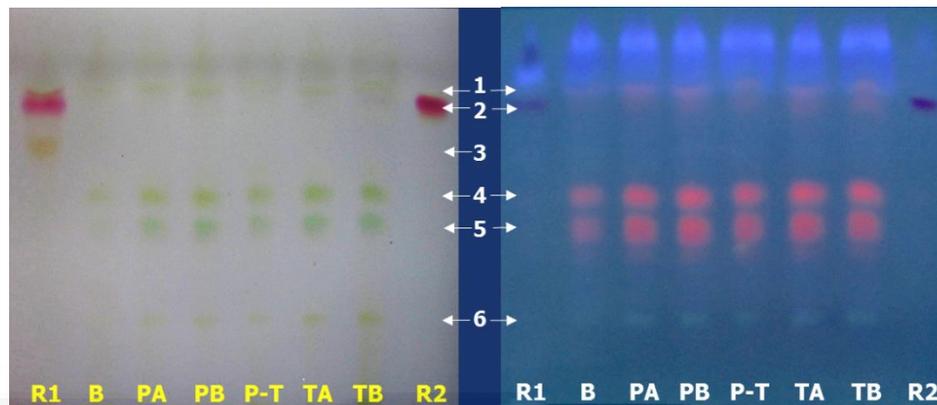


Figura 54. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con precursores de las betalaínas. Placa izquierda: Luz Visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; B: testigo; P: Prolina (A: 1 mM y B: 0.1 mM), P-T: Prolina-Tirosina a 0.5-0.5 mM; T: Tirosina (A: 1 mM y B: 0.1 mM); R2: betabel. 1-6: bandas de pigmentos identificadas en las muestras y extractos de referencia.

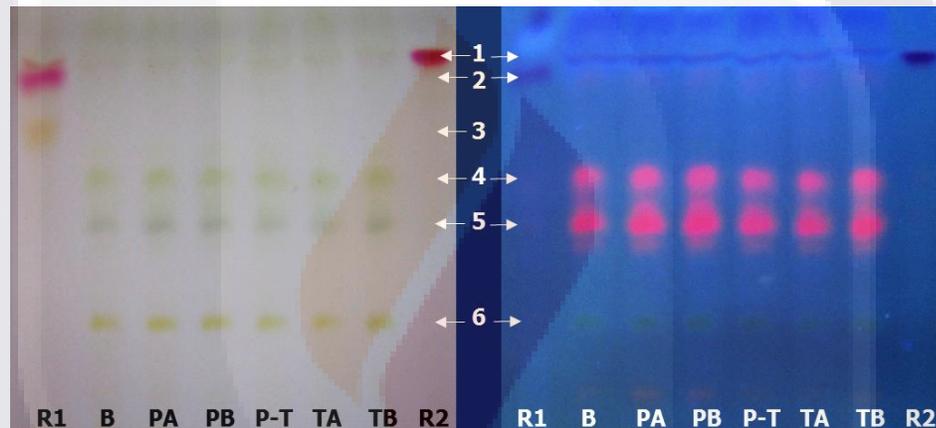


Figura 55. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con precursores de las betalaínas. Placa izquierda: Luz Visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; B: testigo; P: Prolina (A: 1 mM y B: 0.1 mM), P-T: Prolina-Tirosina a 0.5-0.5 mM; T: Tirosina (A: 1 mM y B: 0.1 mM); R2: betabel. 1-6: bandas de pigmentos identificadas en las muestras y extractos de referencia.

Los resultados de la cromatografía en capa fina para *T. pseudopectinatus* se muestran en la Figura 56. Las bandas rojo-violetas de las muestras son muy claras (fila 1) y concuerdan con las de tuna y betabel. Las bandas amarillas y amarillo-verdosas (filas 4, 5 y 6) no concuerdan con la de tuna (fila 3) y son poco identificables en visible, pero bajo luz UV son fáciles de observar. Sin importar el precursor utilizado, el patrón de bandeo se mantiene similar al del testigo.

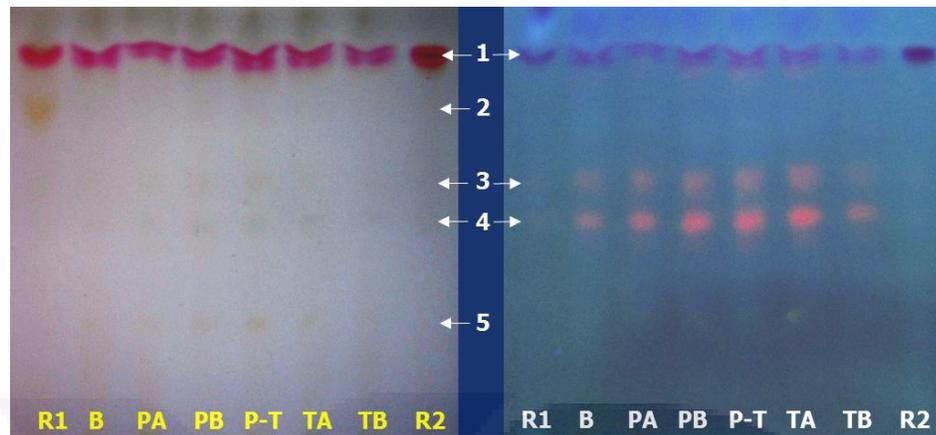


Figura 56. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudoplectinatus* en diferentes tratamientos con precursores de las betalaínas. Placa izquierda: Luz Visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; B: testigo; P: Prolina (A: 1 mM y B: 0.1 mM), P-T: Prolina-Tirosina a 0.5-0.5 mM; T: Tirosina (A: 1 mM y B: 0.1 mM); R2: betabel. 1-6: bandas de pigmentos identificadas en las muestras y extractos de referencia.

En general, sin importar la especie o el precursor utilizado, no se detectaron cambios en el patrón de pigmentación con respecto al del testigo, esto indica que solo se estimula la producción de los mismos tipos de pigmentos con los precursores probados.

6.8. Efecto de la luz sobre la producción de betalaínas en RTC

6.8.1. Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos

Los resultados de GPF y contenido de betalaínas para *E. chaffeyi* bajo diferentes condiciones de luminosidad se muestran en la Figura 57. En cuanto a la GPF no se observaron diferencias significativas con respecto al testigo (LF, 6.386 g) y la morfología solamente se vio afectada bajo luz fotosintéticamente activa (LRA) favoreciendo la aparición de más cantidad de tejido no definido. No se encontraron tampoco diferencias significativas con respecto al testigo (LF), en betacianinas (0.53 mg EB/100 g pf); en betaxantinas se encontró el mayor contenido en LF (1.79 mg EI/100 g pf) y dio lo mismo utilizar LRA y oscuridad dando los valores más bajos (hasta un 50 % menos que en LF). Por lo que para esta especie se observaron mejores resultados con LF y es preferible evitar LRA.

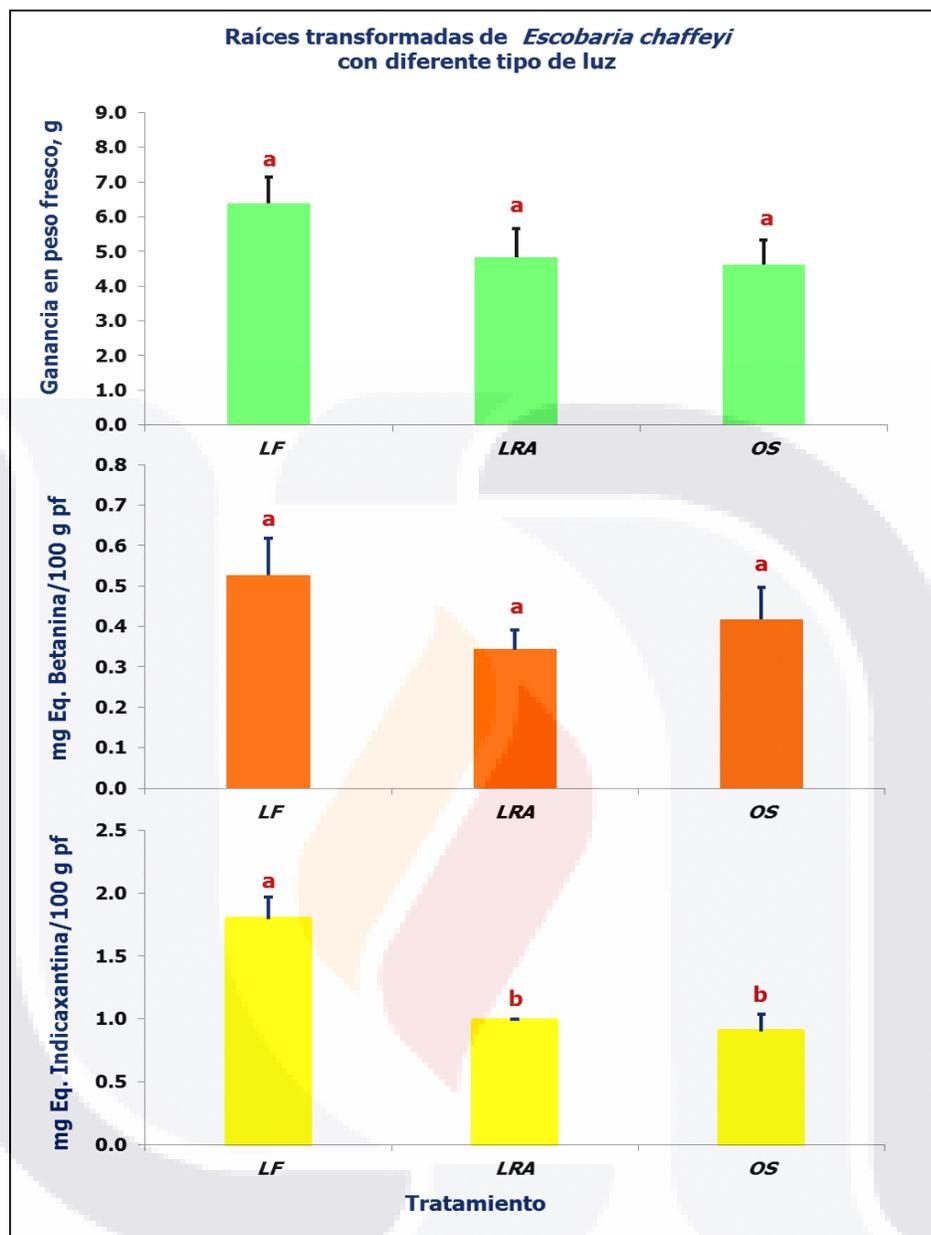


Figura 57. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalánicos en raíces transformadas de *E. chaffeyi* bajo diferentes condiciones de luminosidad. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. LF: luz fluorescente; LRA: luz fotosintéticamente activa (luz led roja-azul=1:8, $\lambda=620-630$ y $460-470$ nm); OS: oscuridad. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Para *T. laui*, los resultados de GPF y contenido de betalainas bajo diferentes condiciones de luminosidad se presentan en la Figura 58. En este caso la GPF disminuyó bajo condiciones de luz fotosintéticamente activa y en oscuridad (hasta en un 37 % con respecto al testigo), por lo que la luz fluorescente fue la mejor opción para la generación de biomasa (4.295 g).

La morfología del material no se modificó por las condiciones de luz a las que se sometió el cultivo.

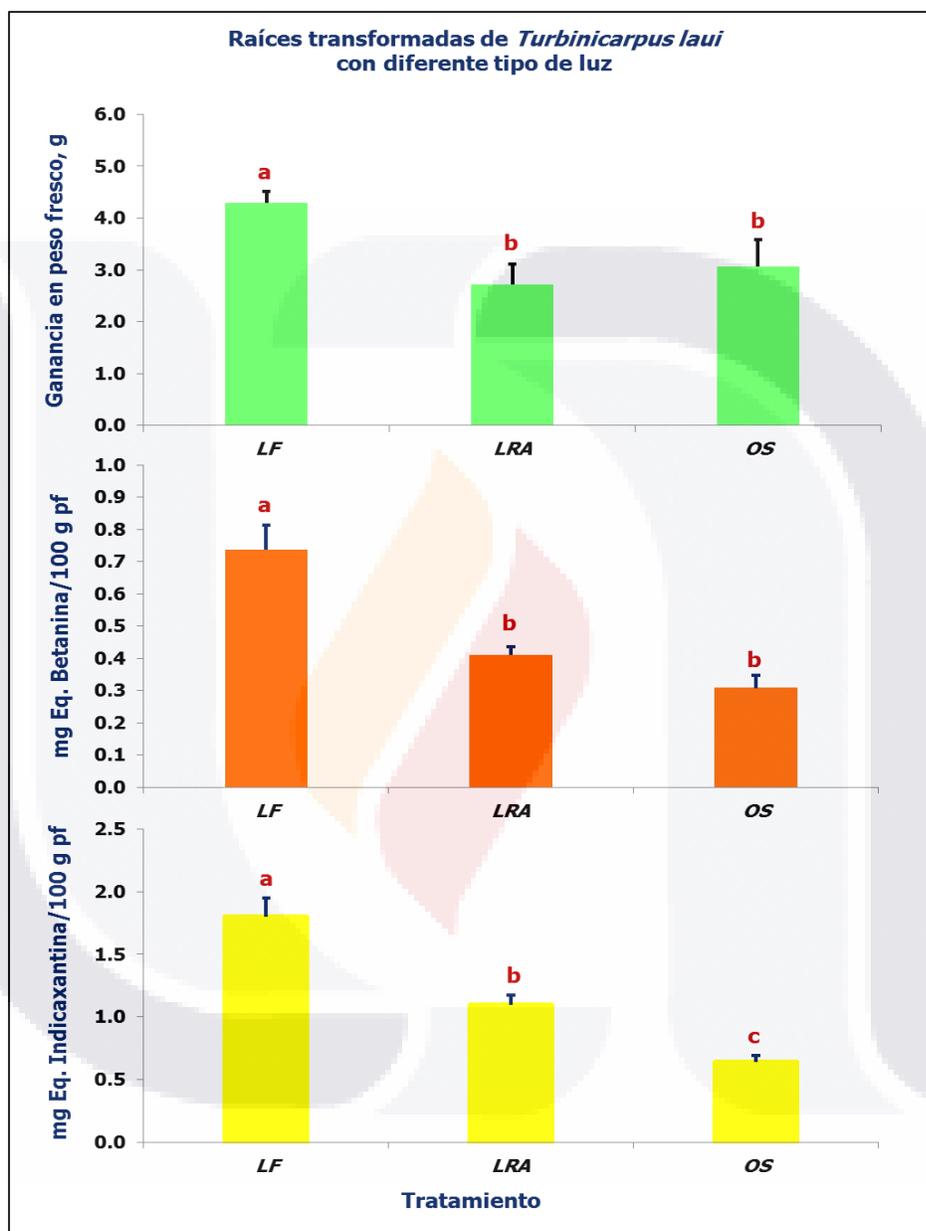


Figura 58. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. laui* bajo diferentes condiciones de luminosidad. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. LF: luz fluorescente; LRA: luz fotosintéticamente activa (luz led roja-azul=1:8, $\lambda=620-630$ y $460-470$ nm); OS: oscuridad. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

En cuanto a betacianinas, también la luz fluorescente produjo la mayor cantidad de pigmentos (0.74 mg EB/100 g pf), no encontrándose diferencia entre la luz fotosintéticamente activa y la oscuridad (que disminuyeron hasta en un 58 % el contenido de betacianinas, con respecto al testigo). Las betaxantinas también se favorecieron bajo luz fluorescente (1.80 mg EI/100 g pf) y los valores menores se presentaron en la oscuridad (disminuyendo 64 % con respecto al testigo). Por lo tanto, el utilizar luz fluorescente representó la mejor opción para la generación de biomasa y la producción de betalaínas en esta especie.

Para *T. lophophoroides*, los resultados de GPF y contenido de betalaínas bajo diferentes condiciones de luminosidad se presentan en la Figura 59. La GPF disminuyó solo en condiciones de oscuridad (31 % menos que el testigo) pero no hubo diferencias significativas entre usar luz fotosintéticamente activa y luz fluorescente (7.208 g); sin embargo, se generó mayor cantidad de tejido no definido en oscuridad y en luz fotosintéticamente activa que bajo luz fluorescente. En el contenido de betacianinas no hubo diferencias significativas al usar luz fotosintéticamente activa con respecto a usar luz fluorescente (1.16 mg EB/100 g pf) pero disminuyó en oscuridad hasta en un 76 % con respecto al testigo. Las betaxantinas al igual que las betacianinas se favorecieron bajo luz fluorescente (0.81 mg EI/100 g pf) y presentaron los valores más bajos en oscuridad (59 % menos que bajo luz fluorescente). En esta especie la luz fluorescente fue la mejor opción para generación de biomasa y producción de pigmentos betalaínicos.

Para *T. pseudopectinatus*, los resultados de GPF y contenido de betalaínas, bajo diferentes condiciones de luminosidad, se muestran en la Figura 60. En este caso la GPF no varió por los diferentes tratamientos, aunque se generó mayor contenido de tejido no definido en oscuridad. El contenido de betacianinas fue mayor bajo luz fluorescente (0.71 mg EB/100 g pf) y menor en los otros tratamientos (hasta 54 % menos que en el testigo). El contenido de betaxantinas fue mayor en luz fluorescente (1.60 mg EI/100 g pf) y el valor más bajo se dio en oscuridad (76 % menos que en el testigo). Por lo que esta especie generó mayor cantidad de biomasa y de pigmentos betalaínicos bajo luz fluorescente.

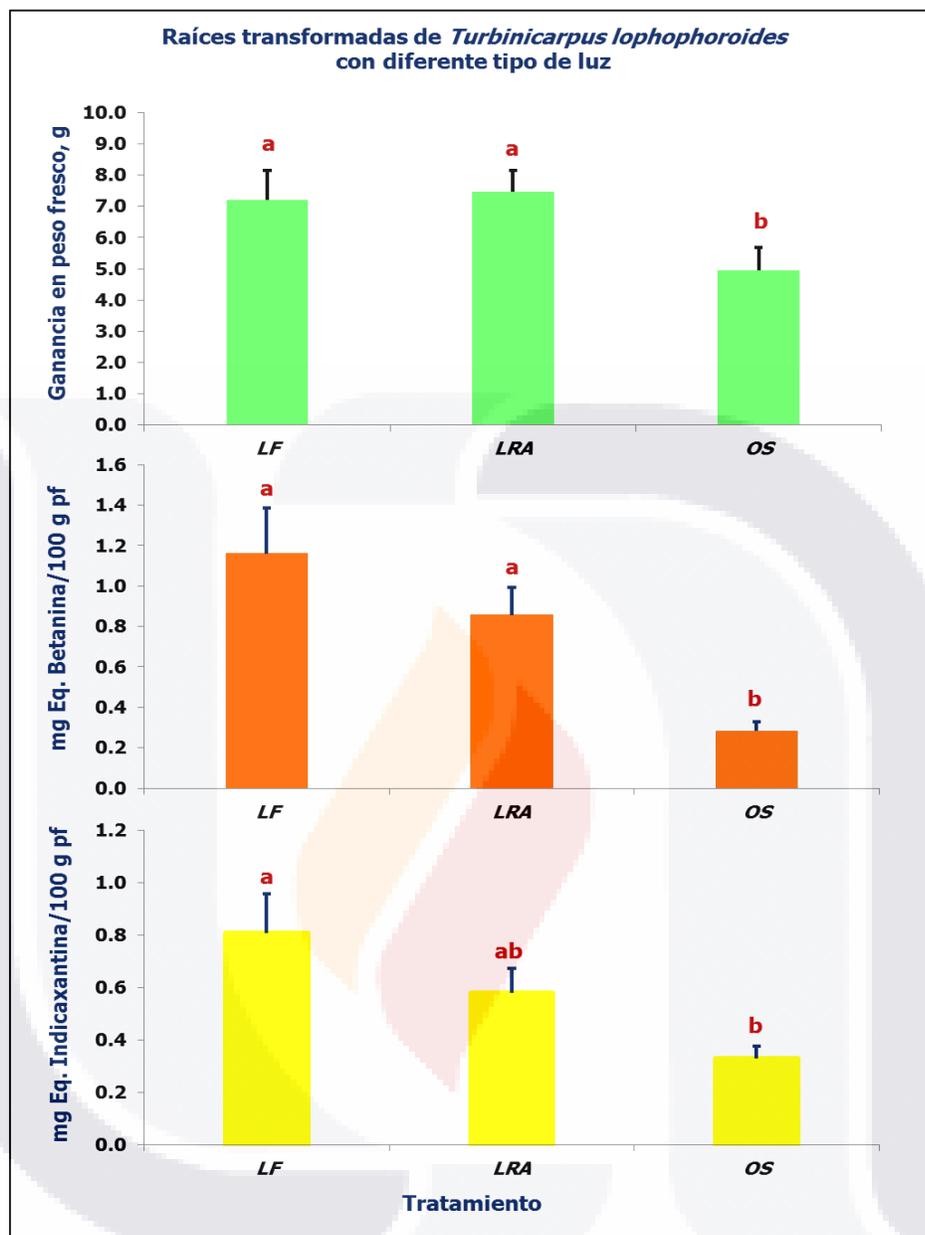


Figura 59. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalánicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* bajo diferentes condiciones de luminosidad. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. LF: luz fluorescente; LRA: luz fotosintéticamente activa (luz led roja-azul=1:8, $\lambda=620-630$ y $460-470$ nm); OS: oscuridad. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Se sabe que la luz puede afectar la producción de compuestos bioactivos de plantas, siendo la luz blanca, la roja y la azul capaces de incrementar las señales de transducción y la biosíntesis de betalainas (Reis *et al.* 2015). Los resultados obtenidos para las diferentes especies concuerdan con lo obtenido por Reis y colaboradores con plantas del género

Alternanthera, en la inducción no solo de betacianinas, sino también de betaxantinas, usando luz blanca. Estos resultados apoyan la importancia de la calidad y la intensidad de la luz (sobre todo de la blanca), en el crecimiento y la producción de metabolitos.

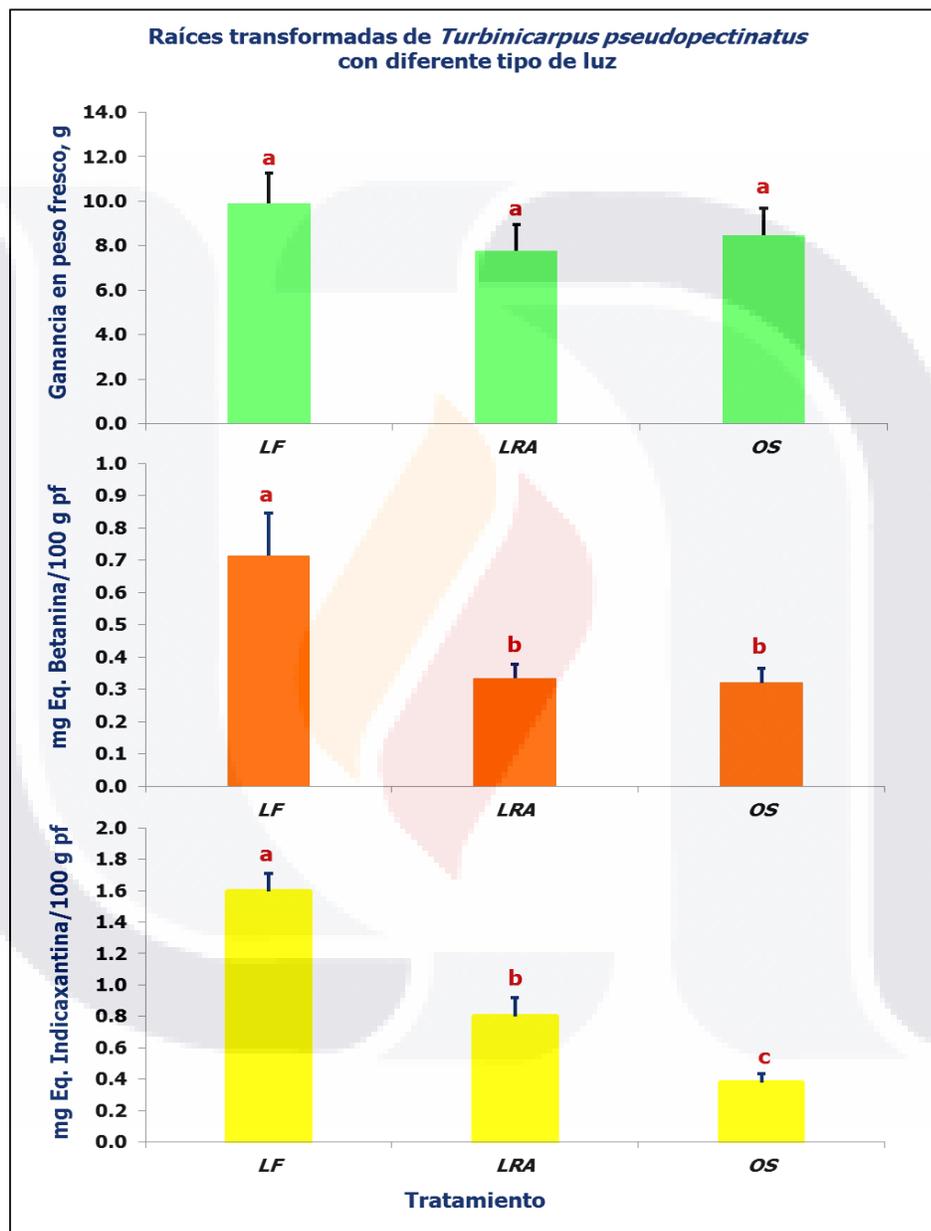


Figura 60. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* bajo diferentes condiciones de luminosidad. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. LF: luz fluorescente; LRA: luz fotosintéticamente activa (luz led roja-azul=1:8, $\lambda=620-630$ y $460-470$ nm); OS: oscuridad. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

En conclusión, la generación de biomasa de las diferentes especies no se vio tan afectada por las condiciones de luminosidad en el cultivo, sin embargo, en muchos de los casos la luz fluorescente fue la mejor y es preferible evitar la oscuridad para no afectar la morfología de los materiales bajo cultivo. La producción de betalaínas si fue seriamente afectada por las diferentes condiciones de luminosidad; tanto para betacianinas como para betaxantinas fue mejor la luz fluorescente y la oscuridad fue la condición menos favorable.

6.8.2. Perfil de extractos betalaínicos por TLC

En lo que corresponde a las cromatografías en capa fina se tienen los resultados para *E. chaffeyi* y *T. laui* en la Figura 61. Se identificaron las bandas rojo-violeta y amarilla de los extractos de referencia (filas 1 y 3), las rojo-violetas de las muestras, aunque un poco más tenues (fila 1) y diferentes bandas amarillas y verdosas de los diferentes extractos (filas 4, 5, 7 y 8). Bajo luz UV se observaron las bandas características de *E. chaffeyi* (blanco-azuladas, fila 6) y las bandas correspondientes a las filas 4, 5 y 8 (en rojo). Apareció una fila de bandas más en color rojo (fila 2) para las muestras que se observaron bajo luz UV.

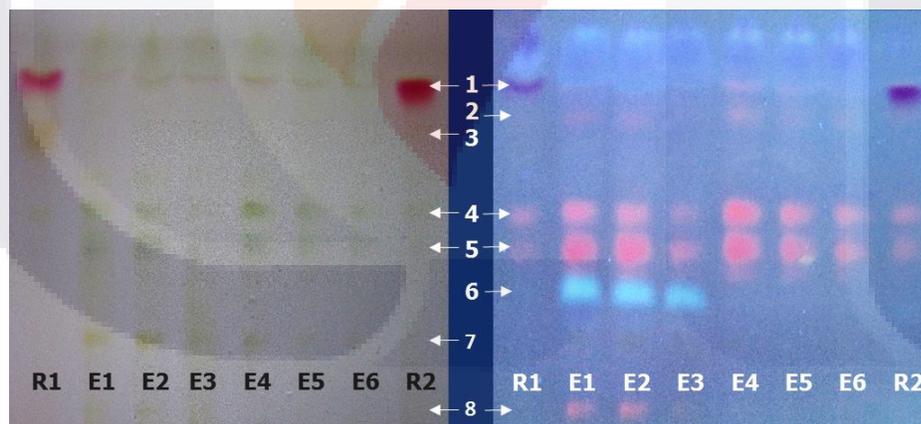


Figura 61. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *E. chaffeyi* y *T. laui* bajo diferentes condiciones de luminosidad. Placa izquierda: Luz visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; Extractos *E. chaffeyi*: E1 (bajo luz fluorescente), E2 (bajo luz fotosintéticamente activa [luz led roja-azul=1:8, $\lambda=620-630$ y $460-470$ nm]), E3 (en oscuridad); Extractos *T. laui*: E4 (bajo luz fluorescente), E5 (bajo luz fotosintéticamente activa), E6 (en oscuridad); R2: betabel. 1-8: bandas de pigmentos identificadas en las muestras y extractos de referencia

Las bandas rojo-violetas de las muestras (*E. chaffeyi*: E1-E3 y *T. laui*: E4-E6) fueron similares a las de tuna y betabel, las demás bandas no corresponden a ninguna de los

extractos de referencia. Por tratamiento se observó que los tratamientos con luz (fluorescente o fotosintéticamente activa, E1, E2, E4 y E5) dieron bandas más acentuadas que los tratamientos en oscuridad (E3 y E6), incluso hay una banda para *E. chaffeyi* que no apareció en oscuridad (fila 8). Por especie, *E. chaffeyi* presentó el mayor número de bandas. En general, el uso luz (de cualquier tipo) fue favorable para la producción de pigmentos betaláinicos y su patrón de bandeo solo se vio afectado por la ausencia de luz.

Para *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus*, las cromatografías en capa fina se muestran en la Figura 62. Claramente se detectaron las bandas de los extractos de referencia tuna y betabel (rojo-violetas y amarilla, fila 2 y 3) y algunas de las muestras, aunque se vieron mejor en luz UV. Para *T. lophophoroides* (E1-E3) no se detectaron bandas rojo-violetas y se vieron muy tenues algunas amarillas y verdosas (filas 4, 5 y 6) que no fueron similares a la de tuna; la muestra en oscuridad (E3) mostró las bandas más atenuadas. El patrón de bandeo en esta especie cambió solo en las muestras en oscuridad. Para *T. pseudopectinatus* (E4-E6) las bandas rojo- violeta se vieron claramente en visible y fueron similares a las de tuna y betabel; la banda de la muestra en oscuridad (E6) fue muy tenue. Fue difícil también detectar sus bandas amarillas en visible, aunque en UV resaltaron un poco más (en rojo, filas 4 y 5) y se observó que no eran similares a las de tuna. En general, al igual que *T. lophophoroides* la luz afectó en diferente medida la producción de algunos compuestos.

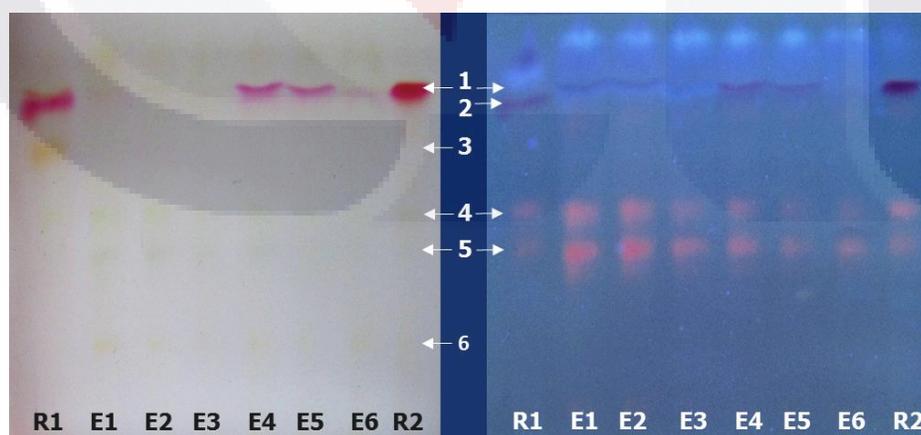


Figura 62. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus* bajo diferentes condiciones de luminosidad. Placa izquierda: Luz visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; Extractos *T. lophophoroides*: E1 (bajo luz fluorescente), E2 (bajo luz fotosintéticamente activa [luz led roja-azul=1:8, $\lambda=620-630$ y $460-470$ nm]), E3 (en oscuridad); Extractos *T. pseudopectinatus*: E4 (bajo luz fluorescente), E5 (bajo luz fotosintéticamente activa), E6 (en oscuridad); R2: betabel. 1-6: bandas de pigmentos identificadas en las muestras y extractos de referencia

6.9. Efecto del estrés abiótico sobre la producción de betalaínas en RTC

6.9.1. Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos

En esta prueba se obtuvieron resultados para las especies de *Turbinicarpus* (*T. laui*, *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus*). Los resultados de GPF y contenido de betalaínas para *T. laui* se muestran en la Figura 63 y 64.

La GPF y el contenido de betalaínas para *T. laui* no mostraron diferencias significativas con respecto al tratamiento testigo B (4.18 g de GPF, 0.37 mg EB/100 g pf y 0.87 mg EI/100 g pf) en los distintos tratamientos de inducción de estrés por irradiación y temperatura; la morfología se mantuvo similar a B (OR). Por otra parte, en los tratamientos de inducción de estrés por déficit hídrico y salinidad, no se encontraron diferencias significativas en el contenido de betalaínas, con respecto a su testigo (0.34 mg EB/100 g pf y 0.72 mg EI/100 g pf). La ganancia en biomasa ante estrés por déficit hídrico y por salinidad, si fue menor con respecto a su testigo (5.64 g); un 32 % menos en el tratamiento con polietilenglicol a su concentración más elevada (1000 μM), y hasta un 72 y 53 % menos que su testigo en los tratamientos con NaCl a 50 y 25 μM , respectivamente. Estos datos concuerdan con la disminución del crecimiento de raíces de *Arabidopsis thaliana* en presencia de polietilenglicol (Pavlik *et al.* 2007), y de raíces pilosas de *Panax ginseng* en presencia de NaCl (Stiles & Liu 2013). En cuanto a su morfología se mantuvo similar a la de su testigo (OR).

Para esta especie no fue posible encontrar un tratamiento óptimo para incrementar la ganancia de biomasa o el contenido de pigmentos betalaínicos. Se debe evitar someterla a estrés por déficit hídrico o por salinidad ya que es muy susceptible a estos factores y afectan en gran medida su desarrollo.

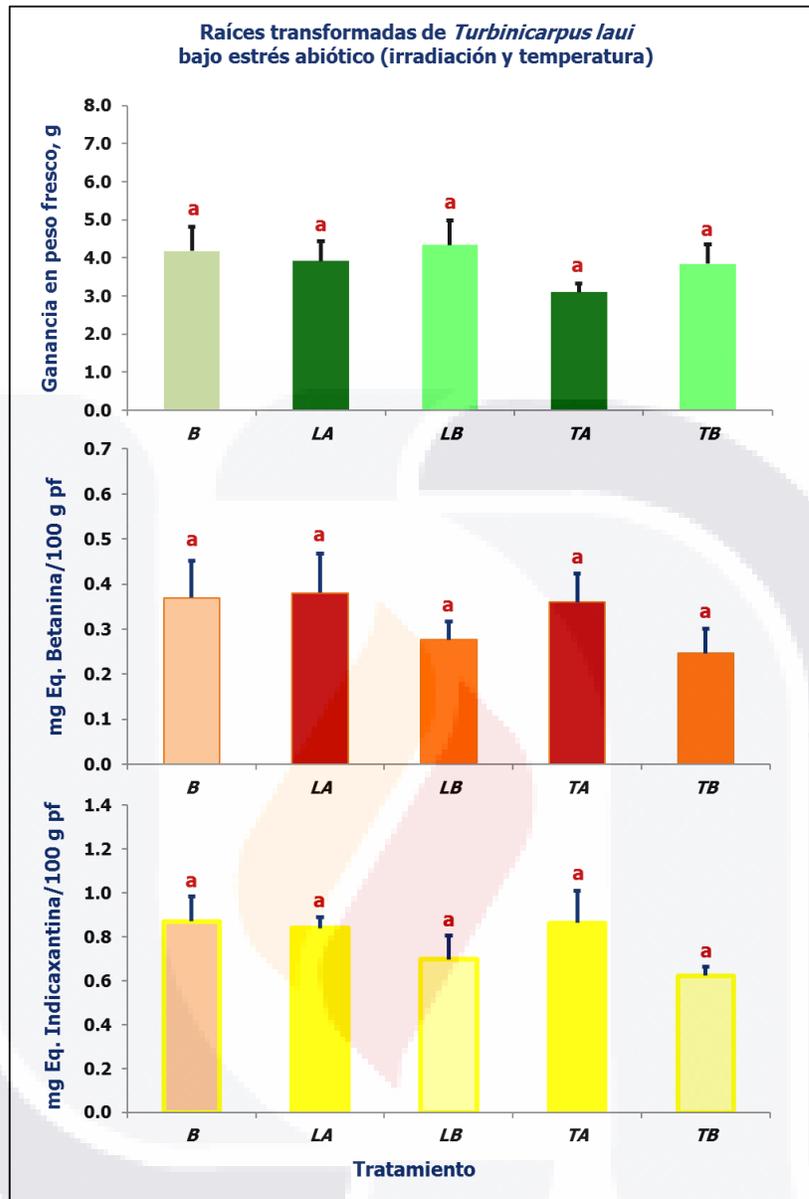


Figura 63. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (luz fluorescente a 11000 W/m² y 25 °C); LA: Luz fluorescente a 44000 W/m²; LB: Luz UV (lámpara germicida) a 2.2 W/m²; TA: 40 °C; TB: 10 °C. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, p ≤ 0.05).

En la Figura 65 se muestran los resultados de GPF y contenido de betaláinas para *T. lophophoroides*, ante estrés por irradiación y temperatura. En lo que respecta a GPF y contenido de betacianinas no se encontró una diferencia significativa de los diferentes tratamientos con respecto al tratamiento testigo B (3.92 g y 0.37 mg EB/100 g pf); sin embargo, el contenido de betaxantinas si disminuyó en el tratamiento donde se probó la

temperatura de 10 °C, ya que se observó una disminución del 24 % con respecto a B (1.13 mg EI/100 g pf). La morfología no varió con respecto a B (RO).

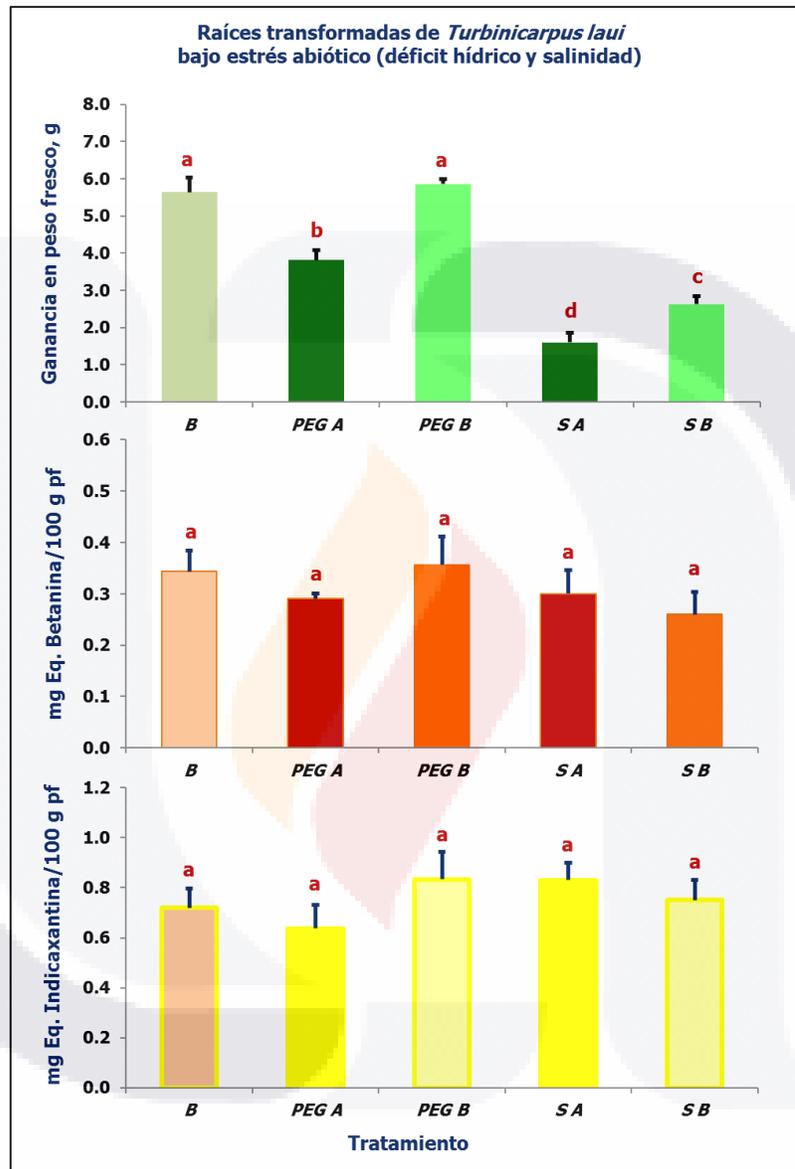


Figura 64. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. laui* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (Medio MS sin inductores); PEG A: polietilenglicol 8000 a 1000µM; PEG B: polietilenglicol 8000 a 500 µM; SA: NaCl a 50 µM; SB: NaCl a 25 µM. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

Para esta especie, no se encontró un tratamiento que permitiera un mayor incremento de biomasa ni de pigmentos betaláinicos; solo puede señalarse, que las temperaturas bajas

pueden llegar a ser un factor limitante en la producción de betaxantinas, por lo que hay que evitarlas.

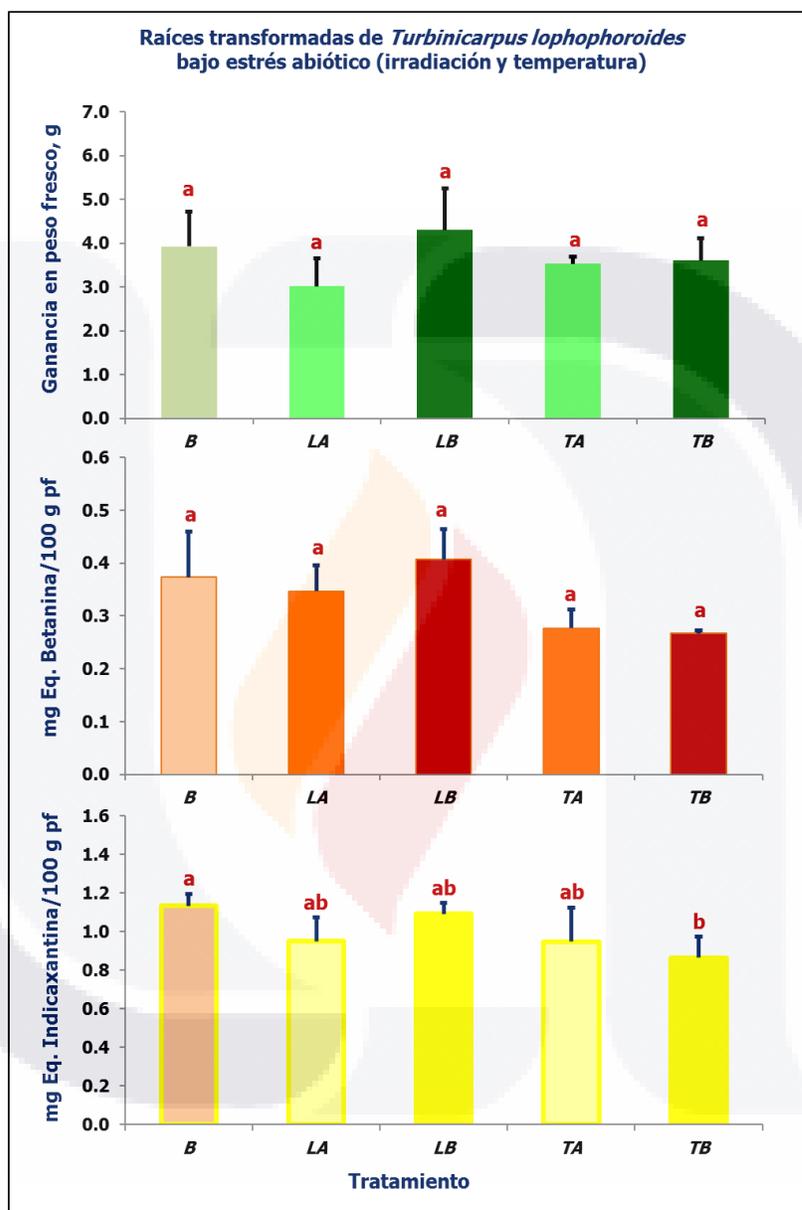


Figura 65. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (Luz fluorescente a 11000 W/m² y 25° C); LA: Luz fluorescente a 44000 W/m²; LB: Luz UV (lámpara germicida) a 2.2 W/m²; TA: 40 °C; TB: 10 °C. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, p ≤ 0.05).

Para *T. pseudoplectinatus*, se muestran los resultados de GPF y contenido de betalaínas en la Figura 66 y 67.

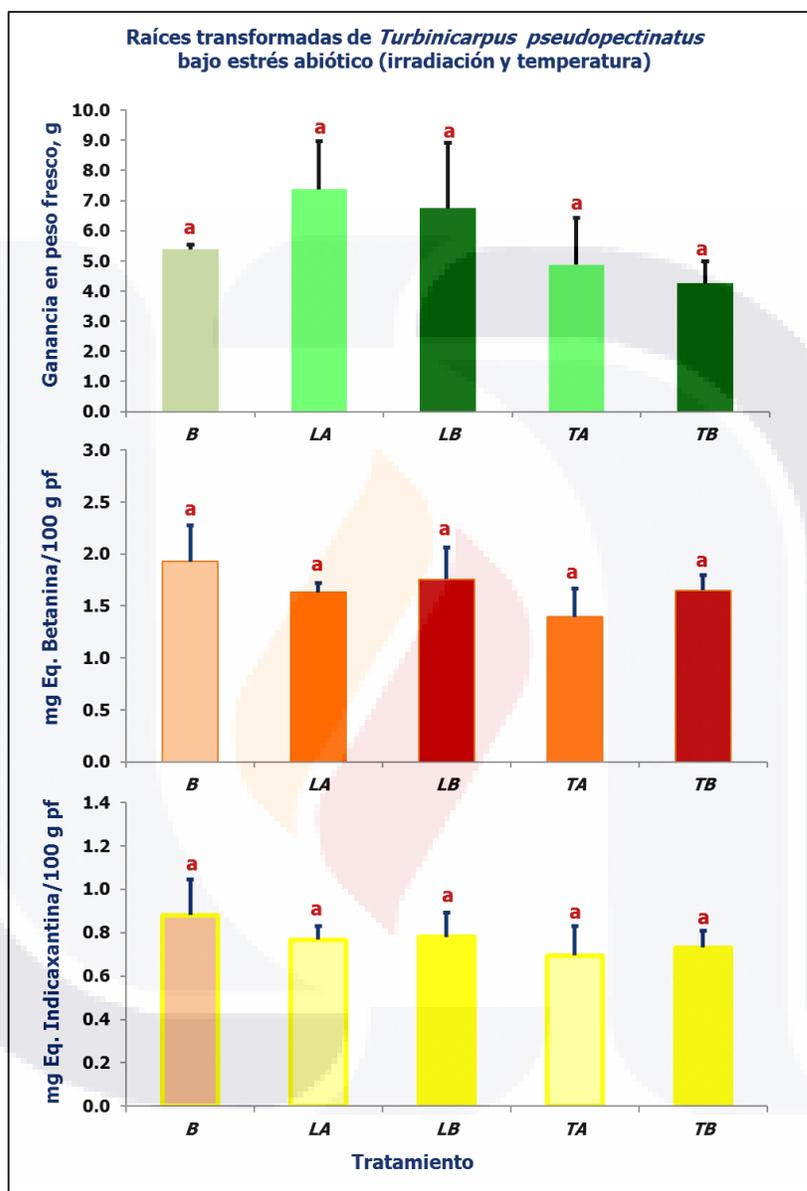


Figura 66. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betaláinicos en raíces transformadas de *T. pseudoplectinatus* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (luz fluorescente a 11000 W/m² y 25 °C); LA: Luz fluorescente a 44000 W/m²; LB: Luz UV (lámpara germicida) a 2.2 W/m²; TA: 40 °C; TB: 10 °C. Se muestran los promedios de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, p ≤ 0.05).

Los diferentes tratamientos de estrés inducido por irradiación o temperatura no lograron cambios significativos con respecto al tratamiento testigo B (5.38 g de GPF, 1.93 mg EB/100

g pf y 0.88 mg EI/100 g pf); se observó mayor variación en algunos resultados. El tratamiento a 10 °C mantuvo la morfología similar a la de B (OR) los demás tratamientos obtuvieron mejores raíces (más definidas) y menos tejido no definido que B. La inducción de estrés por déficit hídrico y salinidad, sin embargo, si mostró diferencias significativas con respecto a su testigo B (6.60 g GPF, 1.05 mg EB/100 g pf y 0.55 mg EI/100 g pf) en todas las variables analizadas; la morfología mejoró en todos los tratamientos, pues se generaron raíces más definidas que en su testigo (OR).

En los tratamientos de estrés inducido por déficit hídrico y salinidad, se encontró que la GPF fue mayor en el testigo y disminuyó en los demás tratamientos (hasta un 33 % con NaCl a 50 μ M), aunque entre estos tratamientos no se encontraron diferencias. El contenido de betacianinas fue similar a su testigo en los tratamientos con polietilenglicol, pero fue mayor en los tratamientos con NaCl en sus diferentes concentraciones (hasta un 156 % más que B); entre estos tratamientos no se encontraron diferencias significativas, aunque hubo mayor variación en los resultados con NaCl a 50 μ M. En contenido de betaxantinas se encontraron resultados similares que para betacianinas, ya que los tratamientos con polietilenglicol no difirieron del testigo y los máximos niveles se encontraron en los tratamientos con NaCl (hasta un 145 % más que el blanco).

En este caso, no se encontró ningún tratamiento que logrará incrementar la ganancia en peso, sin embargo, los tratamientos con NaCl arrojaron resultados interesantes ya que lograron aumentar la cantidad de betalaínas en más del 100 % lo cual podría resultar muy ventajoso, pensando en un proceso de obtención de pigmentos en dos etapas, para evitar el impacto negativo que tiene en la acumulación de biomasa. Estos resultados concuerdan con los encontrados para saponinas de raíces pilosas de *Panax gingseng*, ya que la sal inhibió el crecimiento del cultivo, pero incrementó la concentración de saponinas (Jeong & Park 2006).

La efectividad de la inducción en cultivos vegetales *in vitro*, depende de variables tales como la especificidad del inductor, la concentración, el tiempo de tratamiento, la fase de crecimiento en que se aplica, la composición del medio y de la luz; y a pesar de que los inductores pueden incrementar la producción de metabolitos, a la vez reducen la capacidad

de crecimiento (Stiles & Liu 2013). En este caso se pudo observar el efecto que tuvieron el déficit hídrico y la salinidad, durante todo el periodo de cultivo, en la disminución del crecimiento y en el incremento de pigmentos, aunque el impacto varió con la especie.

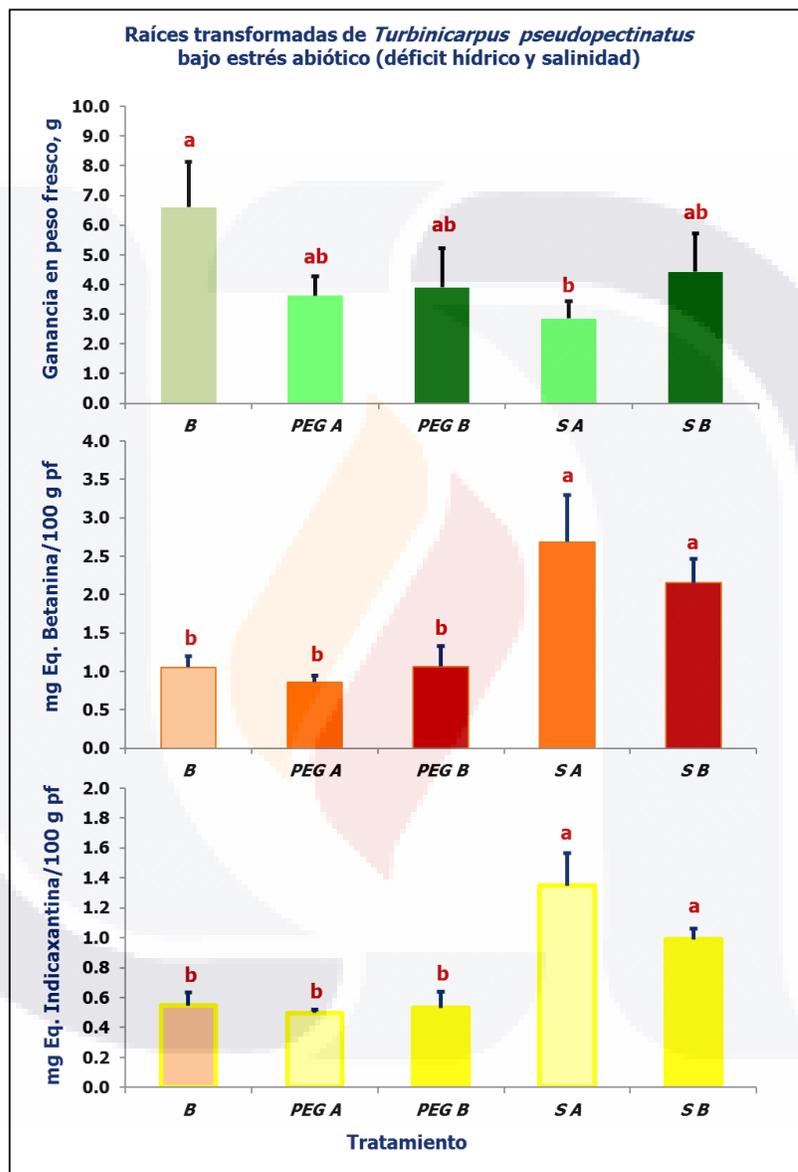


Figura 67. Ganancia en peso fresco y contenido de pigmentos betalaínicos en raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* en diferentes tratamientos con inductores de estrés abiótico. pf: peso fresco. Eq.: equivalentes. B: testigo (Medio MS sin inductores); PEG A: polietilenglicol 8000 a 1000 μ M; PEG B: polietilenglicol 8000 a 500 μ M; SA: NaCl a 50 μ M; SB: NaCl a 25 μ M. Se muestran los promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (Tukey, $p \leq 0.05$).

El efecto estimulador de la irradiación luminosa ha sido reportado para flavonoides en *Petroselinum hortense*, antocianinas en *Centaurea cyanus*, betalainas en *Beta vulgaris* y artemisina en *Artemisia annua*, aunque para *Melastoma malabathricum* la luz en intensidad moderada dio los mejores resultados (Murthy *et al.* 2014). Para raíces pilosas de *Catharanthus roseus* la luz UV logró un incremento en alcaloides y la temperatura por debajo de los 19 °C incrementó la proporción de ácido linolénico y el contenido de alcaloides (Wang & Wu 2013), en ese mismo trabajo se menciona el efecto benéfico de las temperaturas alrededor de los 40 °C en la liberación de pigmentos betalainicos en raíces de betabel. Sin embargo, para las raíces pilosas de cactáceas, la irradiación y la temperatura no tuvieron efectos favorables en las variables medidas, quizás porque no se dieron durante todo el cultivo o en la intensidad adecuada, entre otras causas; o puede ser debido a que estas especies tienen una resistencia natural a este tipo de situaciones de estrés.

6.9.2. Perfil de extractos betalainicos por TLC

En lo referente a las cromatografías en capa fina, los resultados para *T. laui* se muestran en la Figura 68 y 69. La primera figura, muestra los resultados de la cromatografía en los extractos de raíces sometidas a estrés por irradiación y temperatura. Se identificaron las bandas rojo-violetas y amarilla (fila 1, 2 y 3) de los extractos de referencia; muy tenues las bandas rojo-violetas de las muestras (fila 1) y bandas amarillas y verdosas de los diferentes extractos (filas 4, 5 y 6). Bajo luz UV se observaron bandas rojas correspondientes a las de las filas 4 y 5 y bandas amarillo-blancuzcas correspondientes a las de la fila 6. Los pigmentos de las muestras (bandas rojo-violetas) fueron similares a las de los de tuna y betabel y las demás bandas no tienen su correspondencia en los extractos de referencia. Por tratamiento no se observa ninguna diferencia con respecto al testigo.

En la Figura 69, se muestran los tratamientos que provocaron estrés por déficit hídrico y salinidad. De igual forma que en la figura anterior se encontró que los pigmentos rojo-violeta de las muestras son similares a los de tuna y betabel (fila 1), y las demás bandas de las muestras no tienen correspondencia con los extractos de referencia. Apareció una banda color rojizo en las muestras (fila 2) que se observa solo bajo luz UV, lo cual indica una mayor variedad de metabolitos presentes en estas raíces, sin embargo, no es ocasionada por estos

tratamientos, ya que se observa de igual forma en el testigo. Se puede notar que no hay diferencia con respecto al testigo en el perfil de metabolitos.

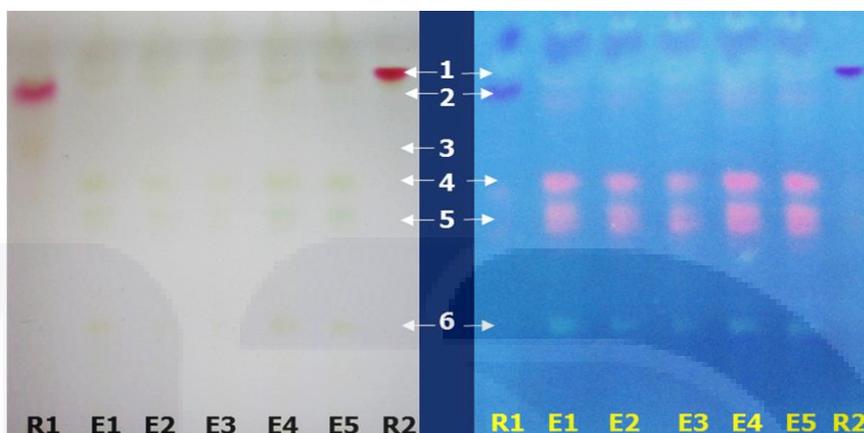


Figura 68. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Placa izquierda: Luz visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; Extractos de *T. laui*: E1 (a condiciones de referencia), E2 (en luz fluorescente a 44000 W/m²), E3 (en luz UV a 2.2 W/m²), E4 (a 40 °C), E5 (a 10 °C); R2: betabel. 1-6 bandas identificadas en las muestras y extractos de referencia.

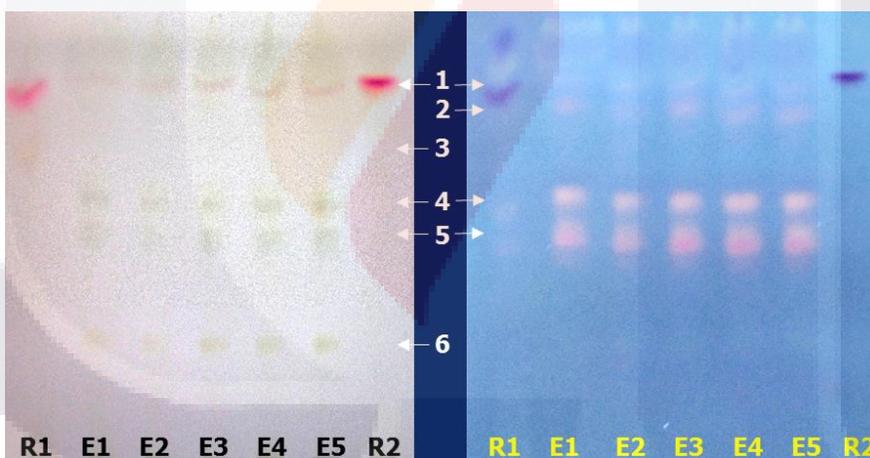


Figura 69. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. laui* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Placa izquierda: Luz visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; Extractos de *T. laui*: E1 (medio MS sin inductores), E2 (con polietilenglicol 8000 a 1000 µM), E3 (con polietilenglicol 8000 a 500 µM), E4 (con NaCl a 50 µM), E5 (con NaCl a 25 µM); R2: betabel. 1-6 bandas identificadas en las muestras y extractos de referencia

En la Figura 70 se muestran los resultados de la cromatografía en capa fina para *T. lophophoroides*, obtenidos con los tratamientos de estrés por irradiación y temperatura. Se detectaron las bandas rojo-violeta y amarilla de los extractos de referencia (fila 1 y 2) y los pigmentos rojo-violeta de las muestras resultaron similares a los de tuna y betabel (fila 1). Las bandas amarillas (filas 3 y 5) y verdosas (fila 4) de las muestras, se observan en luz

visible y algunas en rojo en luz UV (filas 3 y 4). En tuna y betabel se observan algunas bandas muy tenues amarillas (en luz visible) y rojas (en luz UV) equivalentes a las bandas de las filas 3 y 4 de las muestras. Esto indica que los extractos de referencia también producen este tipo de metabolitos, pero en cantidades menores a las de las muestras; esto confirma que los cultivos de raíces transformadas poseen mayores cantidades de ciertos metabolitos. El tipo de tratamiento no modificó el perfil de metabolitos que se obtuvo en las muestras.

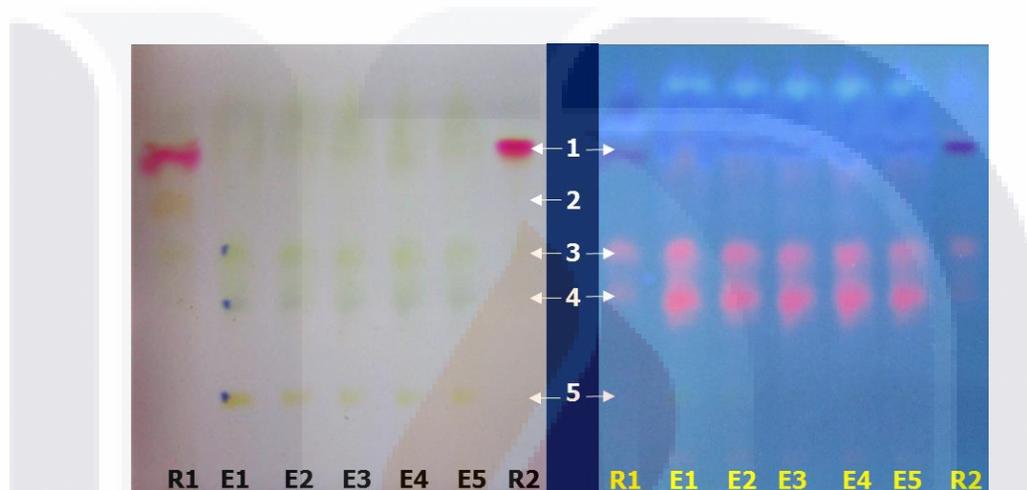


Figura 70. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. lophophoroides* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Placa izquierda: Luz visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; Extractos de *T. lophophoroides*: E1 (a condiciones de referencia), E2 (en luz fluorescente a 44000 W/m²), E3 (en luz UV a 2.2 W/m²), E4 (a 40 °C), E5 (a 10 °C); R2: betabel. 1-5 bandas identificadas en las muestras y extractos de referencia

Para *T. pseudopectinatus* las cromatografías en capa fina se muestran en la Figura 71 y 72. La primera figura, muestra los resultados de la cromatografía en los extractos de raíces sometidas a estrés por irradiación y temperatura. Se observan muy bien definidas las bandas rojo-violetas de los extractos de referencia (fila 1) y de las muestras (fila 1); y estas resultaron muy similares entre sí. La banda amarilla de tuna no volvió a encontrar equivalente en las muestras (fila 2), sin embargo, se observaron muy tenues en luz UV otras bandas de color rojizo tanto en las muestras como en los extractos de referencias (filas 3 y 4), lo cual indica su similitud. El tipo de tratamiento no influyo en la variedad de metabolitos encontrada.

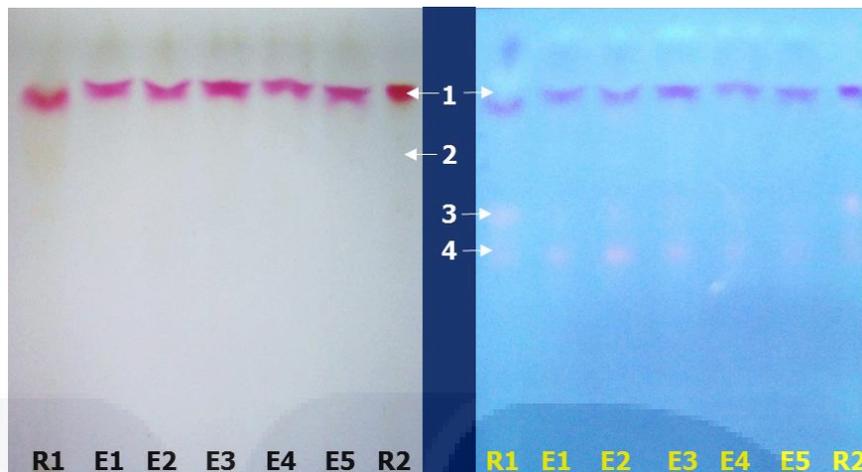


Figura 71. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudoplectinatus* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Placa izquierda: Luz visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; Extractos de *T. pseudoplectinatus*: E1 (a condiciones de referencia), E2 (en luz fluorescente a 44000 W/m²), E3 (en luz UV a 2.2 W/m²), E4 (a 40 °C), E5 (a 10 °C); R2: betabel. 1-4 bandas identificadas en las muestras y extractos de referencia

En la figura 72, se muestran los tratamientos que provocaron estrés por déficit hídrico y salinidad, y se observó nuevamente la similitud entre las bandas de muestras y extractos de referencia, de los pigmentos rojo-violeta (fila 1), y de las bandas rojizas observadas bajo luz UV (filas 3 y 4). Nuevamente el tratamiento no tuvo influencia en la variedad de metabolitos.

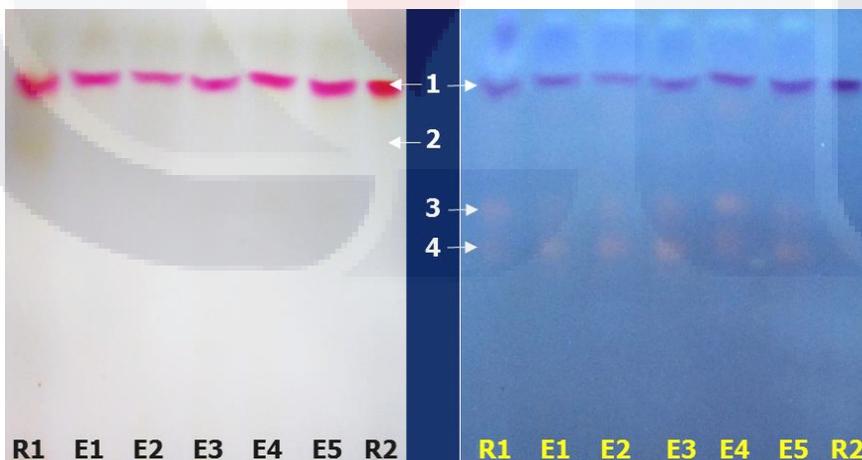


Figura 72. Cromatografía en capa fina para raíces transformadas de *T. pseudoplectinatus* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico. Placa izquierda: Luz visible, Placa derecha: Luz UV. R1: tuna; Extractos de *T. pseudoplectinatus*: E1 (medio MS sin inductores), E2 (con polietilenglicol 8000 a 1000 µM), E3 (con polietilenglicol 8000 a 500 µM), E4 (con NaCl a 50 µM), E5 (con NaCl a 25 µM); R2: betabel. 1-4 bandas identificadas en las muestras y extractos de referencia

T. laui y *T. lophophoroides* presentan una mayor cantidad de metabolitos respecto de *T. pseudopectinatus*, aunque sus concentraciones no parecen muy elevadas; por otra parte, *T. pseudopectinatus*, genera una mayor cantidad de betacianinas (pigmentos rojo-violeta).

6.10. Cultivo de RTC en biorreactores

6.10.1. Producción de biomasa y acumulación de pigmentos betalaínicos

Se utilizaron solo raíces transformadas de *T. lophophoroides*, ya que las de *T. laui* y *T. pseudopectinatus* no pudieron desarrollarse previamente en medio líquido a las condiciones establecidas para obtener el inóculo. Las raíces de *E. chaffeyi* lograron crecer en medio líquido pero muy lentamente y con poca ganancia de biomasa. A pesar de esto, se probó una muestra de raíces de *T. pseudopectinatus* (de material creciendo en medio semisólido) y de *E. chaffeyi* (creciendo en medio líquido) en el biorreactor RITA[®], aunque los resultados no fueron muy concluyentes.

Los resultados para GPF y contenido de betalaínas para *T. lophophoroides* se muestran en la Figura 73. Respecto al crecimiento, los sistemas de producción en medio líquido lograron valores de ICF de 5.1 ± 0.2 y 2.6 ± 2.7 para los biorreactores RITA[®] y TA (Figura 74a y Figura 74b) respectivamente, aunque los resultados del biorreactor RITA[®] mostraron una menor variación; el sistema de producción en medio semisólido había obtenido valores de ICF alrededor de 3.4, por lo que el biorreactor RITA[®] logró incrementar la producción de biomasa en poco más del 30 % con respecto a ese sistema.

La morfología del material mejoró también en medio líquido, en el biorreactor RITA (Figura 74c), se mostraron raíces bien definidas amarillo-rojizas con puntas blancas, de 1-5 cm de longitud y grosor muy fino hasta cerca de 1 mm, formando cúmulos de raíces entrecruzadas; en el biorreactor TA (Figura 74d) se obtuvieron pequeños fragmentos de raíces de color rojizo.

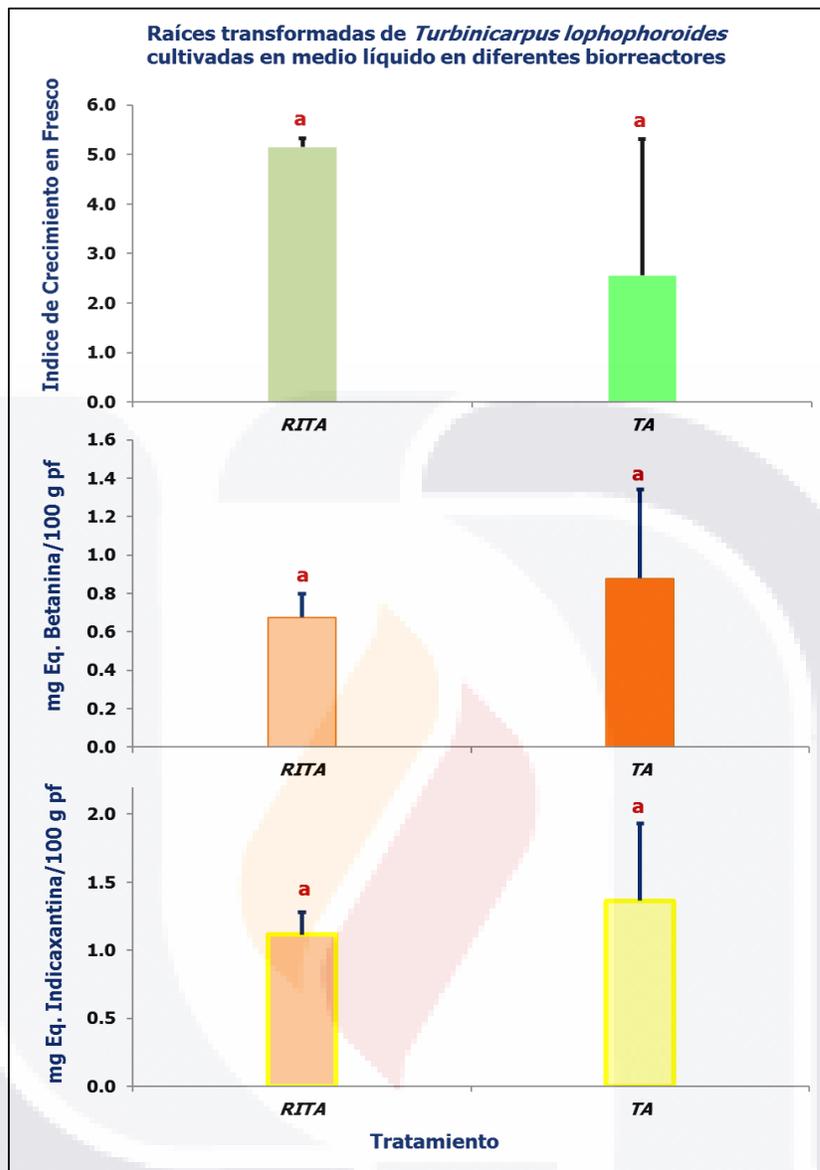


Figura 73. Índice de Crecimiento en Fresco y contenido de betalaínas en raíces transformadas de *T. lophophoroides* cultivadas en diferentes tipos de biorreactores. pf: peso fresco. Eq.: Equivalentes. RITA: biorreactor de inmersión temporal RITA®; TA: biorreactor tipo tanque agitado. Se muestran los promedios de dos repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (t de Student, $p \leq 0.05$)

En el contenido de betalaínas, ambos sistemas lograron valores similares de betacianinas y betaxantinas (alrededor de 0.68 mg EB/100 g pf y 1.11 mg EI/100 g pf), aunque el biorreactor TA pareció obtener valores ligeramente mayores de betacianinas, sus resultados no fueron reproducibles. Estos resultados son idénticos a los encontrados en medio semisólido, y muy bajos comparados con los logrados en otros sistemas de producción como

raíces transformadas de *Beta vulgaris* (0.7 mg betacianinas/g pf), o células en suspensión de *Chenopodium rubrum* (3-4 mg betacianinas/g ps) o de *Portulaca spp.* (5.3 mg/g pf) (Pavokovi & Krsnik-Rasol 2011). Los resultados para el biorreactor TA concuerdan con lo reportado para el cultivo de raíces adventicias de *Hyoscyamus niger* L. en un biorreactor de tipo tanque agitado (Steingroewer *et al.* 2013). Es necesario, de cualquier forma, encontrar las condiciones óptimas de trabajo para cada tipo de biorreactor, y las necesidades particulares de cultivo para cada especie.

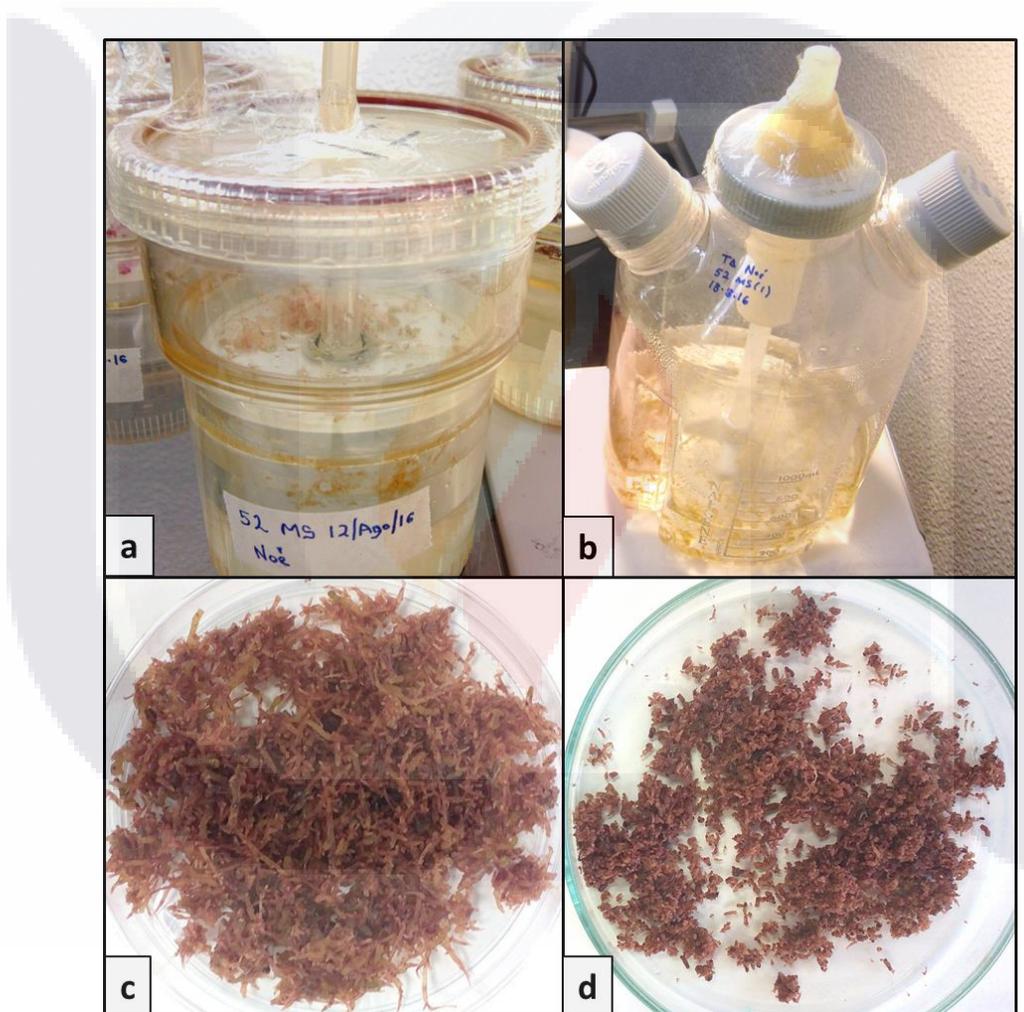


Figura 74. Biorreactores usados en el cultivo de raíces transformadas de *T. lophophoroides* y material obtenido. a) Biorreactor de inmersión temporal RITA®, b) biorreactor tipo tanque agitado, c) material obtenido en biorreactor RITA®, c) material obtenido en biorreactor tipo tanque agitado

Las raíces de *E. chaffeyi* en biorreactor RITA® (Figura 75) crecieron muy poco (ICF de 2.4), mostrando valores menores a los observados anteriormente en medio semisólido (ICF de

5.2); su contenido de betacianinas fue similar en ambos medios (0.82 mg EB/100 g pf) y el de betaxantinas fue menor al del medio semisólido (1.35 mg EI/100 g pf en medio líquido y alrededor de 1.64 en medio semisólido).

Estos bajos rendimientos en biomasa y metabolitos se han observado en el escalado de cultivos de órganos vegetales diferenciados, en medio líquido; debido a la formación de paquetes compactos de tejido, que poco a poco impiden el suministro de oxígeno y nutrientes a los tejidos internos (Steingroewer *et al.* 2013); este problema es más común en biorreactores que mantienen al tejido completamente sumergido en el medio y no explica del todo lo ocurrido en este caso, lo que hace necesario probar y optimizar las condiciones de cultivo para esta especie. En otro trabajo con raíces pilosas de betabel, se encontró que el cambio de volumen de medio, entre otros parámetros cinéticos, afectaba directamente la producción de biomasa, aunque no la proporción de betalaínas ni la actividad enzimática (Neelwarne 2012).



Figura 75. Raíces transformadas de *E. chaffeyi* cultivadas en biorreactor RITA y medio de cultivo obtenido.

La morfología del tejido mejoró bastante y la hiperhidratación disminuyó (en medio líquido y en ese biorreactor), ya que se generó buena cantidad de tejido radical bien definido con menor cantidad de tejido no definido (el cual era muy abundante en el medio semisólido). La ventaja de usar este tipo de sistemas de inmersión temporal es que disminuyen el estrés físico y favorecen el intercambio gaseoso, evitando los problemas mencionados (Georgiev *et al.* 2012). El medio se tiñó ligeramente de rojo, lo que indicó la liberación de metabolitos; esto también es muy adecuado ya que puede permitir la recolección de estos metabolitos de una manera más sencilla.

T. pseudopectinatus en biorreactor RITA® (Figura 76) presentó mucha variación en cuanto a crecimiento ($ICF = 10.6 \pm 5.4$) y su morfología era similar a la de tejido no diferenciado con muy pocas raíces pilosas definidas; en medio semisólido su ICF había mostrado valores alrededor de 5.5 con una morfología parecida. Su contenido de betalaínas fue similar al encontrado en medio semisólido (1.16 mg EB/100 g pf y 0.77 mg EI/100 g pf). Estos resultados indican que es necesario obtener material adecuado para el cultivo en medio líquido y determinar las condiciones óptimas de desarrollo para su utilización.



Figura 76. Raíces transformadas de *T. pseudopectinatus* cultivadas en biorreactor RITA.

Probar otro tipo de biorreactores, tales como los de tipo niebla o por goteo, que son considerados los más adecuados para el cultivo de raíces pilosas (Bhojwani & Dantu 2013), o intentar otras configuraciones de biorreactores de inmersión temporal, pueden ser otra opción; en todos estos sistemas se han logrado buenos rendimientos en acumulación de biomasa y producción de metabolitos en raíces pilosas de varias especies vegetales (Steingroewer *et al.* 2013).

Algunos trabajos han reportado mejores tasas de crecimiento en biorreactores RITA® comparado con el crecimiento en medio semisólido, pero no se tienen muchas comparaciones con este tipo de sistemas (Watt 2012). En el caso de raíces pilosas, se deben de considerar muchos factores para el escalado exitoso a biorreactores: fisiología, morfología, sensibilidad al estrés, disponibilidad de oxígeno, luz, temperatura y nutrientes, entre otros, que pueden afectar el crecimiento y la productividad (Stiles & Liu 2013). Los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sistemas líquidos utilizando biorreactores de inmersión temporal, parecen ser una buena alternativa para la producción en mayor escala, de raíces transformadas de cactáceas.

En resumen, para las pruebas de medios, RCVs y complejos, se observó que los complejos nutritivos no promovieron el incremento de la producción de biomasa ni de betalaínas en las raíces transformadas de cactáceas. Los RCVs incrementaron biomasa, los medios de cultivo dieron buenos resultados en el incremento de biomasa y en algunos casos en la producción de betalaínas, dependiendo de la especie. De los datos de las pruebas de RCVs y medios de cultivo, es posible hacer algunas observaciones generales; para el caso de *E. chaffeyi*, el medio MS generó mayor GPF y contenido de betalaínas, en tanto que el tratamiento T12 de la prueba de RCVs generó cerca de 70 % más GPF que el medio MS, pero aproximadamente 21 y 24 % menos de betacianinas y betaxantinas respectivamente. Sin embargo, al final se lograría con T12 un incremento en peso del 34 % en betacianinas y del 28 % en betaxantinas con respecto al medio MS. La morfología de las raíces fue similar en ambos tratamientos.

Desde el punto de vista de costos, quizás sea mejor usar medio MS, generar menos biomasa, pero con mayor concentración de pigmentos para facilitar su procesado y extracción. Obviamente se tienen que contemplar los inconvenientes técnicos y la factibilidad del proceso en sí. Para *T. laui*, comparando el medio DKW y el tratamiento T12, se lograría obtener con este tratamiento un 115 % más de GPF, la misma concentración de betacianinas y una reducción del 9 % en betaxantinas. La morfología fue similar en ambos casos. Haciendo prospección con los datos se lograría un incremento en peso del 114 % en betacianinas y de 96 % en betaxantinas, con respecto a lo obtenido en medio DKW.

Para *T. lophophoroides*, si se compara el medio B5 y T9 (tratamientos con los mejores resultados), se lograría obtener cerca de un 139 % más de GPF con T9 que con medio B5; la concentración de betacianinas disminuiría en un 42 % aproximadamente y la de betaxantinas en un 24 %. La morfología se modificó por usar T9, generándose más tejido no definido. Con estos datos, T9 lograría un incremento en peso del 39 % en betacianinas y del 82 % en betaxantinas, con respecto a lo obtenido en medio B5.

Finalmente, para *T. pseudopectinatus*, se lograría obtener cerca de 71 % más GPF con T12 que con medio B5; la concentración de betacianinas disminuiría en aproximadamente un 38 % y la de betaxantinas en un 24 %. Sin embargo, T12 lograría al final un incremento en peso del 6 % para betacianinas y del 30 % para betaxantinas, con respecto a lo obtenido en medio B5. Los rendimientos ponen en duda que el tratamiento con RCVs sea mejor, por lo que, desde el punto de vista económico y de procesado sería mejor usar medio B5. La morfología fue similar en ambos tratamientos. Si se comparan los resultados del medio B5 con los del medio MS con PP a 10 g/L, hubo un incremento importante en la producción de pigmentos betalaínicos usando PP, aunque se tuvo un ligero impacto en la morfología, de cualquier forma, este tratamiento puede ser una buena opción.

Por lo tanto, usar el medio de cultivo adecuado representó en muchos de los casos, una mayor ventaja que usar reguladores de crecimiento vegetal o complejos nutritivos, con respecto a la producción y obtención de pigmentos betalaínicos.

En relación al tipo de precursor de la ruta biosintética, se observó que en general bajas concentraciones de prolina o tirosina resultaron favorables para incrementar la ganancia en peso fresco y mejorar la morfología, aunque varía con la especie. La mezcla equimolar de estos compuestos disminuyó los valores de las distintas variables analizadas. Con estos resultados y los analizados anteriormente se sigue observando que con el medio de cultivo óptimo se obtienen los mejores resultados, o que la combinación de tratamientos (cultivo en etapas) también puede ser una opción adecuada.

La luz fluorescente fue la mejor opción para cultivar las raíces transformadas de cactáceas ya que estimuló la producción de betalaínas, y aunque no fue limitante para la acumulación de biomasa, promovió la aparición de una morfología radical mejor definida; la oscuridad inhibe el crecimiento de estos materiales.

Utilizar NaCl como inductor de estrés en raíces transformadas de cactáceas, dio buenos resultados en la producción de pigmentos; y aunque limitó el crecimiento y la acumulación de biomasa, puede ser utilizado en un sistema de producción de dos fases, justo después de una primera etapa de crecimiento. En general, se observó que estos materiales vegetales

son resistentes a diversos tipos de estrés, quizás debido a las condiciones de crecimiento en que se desarrollan naturalmente estas especies.

No se observaron incrementos importantes en pigmentos ni en crecimiento en los cultivos de las diferentes especies en medio líquido. Sin embargo, *T. lophophoroides* si logró incrementar su crecimiento en el biorreactor RITA[®], por lo que el uso de raíces transformadas de esta especie con este sistema de cultivo, parece ser una alternativa atractiva para la producción de pigmentos y metabolitos de interés.



7. CONCLUSIONES

Las diferentes especies analizadas, presentaron niveles de pigmentos betalaínicos en su estado inicial, similares a los de algunas variedades de xoconostle, tuna amarilla y tuna naranja; aunque muy bajos respecto a otras fuentes de colorantes naturales (betabel o tuna).

El perfil de los extractos betalaínicos por cromatografía en capa fina, mostró una amplia gama de compuestos en las raíces transformadas.

Las especies vegetales analizadas pueden llegar a presentar concentraciones muy variables de metabolitos, sobre todo en las etapas de crecimiento activo.

En general, las diferentes especies estudiadas mostraron una tendencia a mantener los niveles de pigmentos betalaínicos similares a los del tejido madre.

La morfología de las raíces transformadas bajo estudio dificultó el análisis de sus metabolitos, por la alta heterogeneidad de los materiales en las etapas activas de desarrollo.

El nivel de humedad en los materiales estudiados fue alto, y es posible obtener alrededor de 5 a 10 g de material en peso seco por cada 100 g de material en peso fresco, variando según la especie.

Para mantener cultivos más homogéneos, en cuanto a crecimiento y contenido de fitoquímicos, se debe considerar la edad del material y sus características morfológicas.

Las raíces transformadas de cactáceas son de crecimiento más lento que las de algunas otras especies vegetales.

El tiempo de cosecha es un punto de partida necesario para poder evaluar y comparar adecuadamente el crecimiento y el contenido de pigmentos betalaínicos.

El medio de cultivo fue un factor importante, ya que la producción de biomasa de las diferentes RTC, se favoreció con el uso de medios de cultivo con niveles relativamente altos de N total y relaciones altas de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$.

Medios pobres en nutrientes como el medio White, afectaron negativamente el crecimiento de las raíces transformadas de algunas especies; sin embargo, cada especie tiene sus requerimientos nutricionales particulares.

El uso de medios con valores bajos de relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ y bajos niveles de N total, aparentemente favoreció la acumulación de betaxantinas en algunas especies, aunque otras no mostraron un patrón claro.

El contenido de N total o la relación de $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ de los diferentes medios de cultivo no tuvo un efecto directo sobre el contenido de betacianinas, sin embargo, parece que la proporción alta de NO_3 influyó positivamente.

La morfología de las RTC cambió con el tipo de medio utilizado; los medios B5 y DKW favorecieron en su mayoría la generación de raíces pilosas definidas, y en algunos casos lograron buena acumulación de biomasa y de pigmentos betalaínicos, aunque no tuvieron entre sí un patrón común aparente en cuanto a su contenido de nutrientes.

Es posible optimizar la generación de biomasa, la producción de pigmentos en RTC y diseñar un sistema ideal de producción modificando el medio de cultivo.

Por TLC fue posible determinar un patrón de bandas característico para los diferentes extractos betalaínicos, que de cierta manera indicaron la presencia de betacianinas y betaxantinas en las muestras; sin embargo, no ha podido adecuarse para identificar fácilmente betaxantinas.

En general, el patrón de bandas identificado por TLC corresponde en su mayoría con las de las muestras al inicio del experimento.

Por los valores de Rf de las muestras, se pudo encontrar cierta similitud entre los pigmentos rojo-violetas de las muestras y los de tuna y betabel, aunque se requiere de otras técnicas para confirmar su identidad. Entre especies hubo también ciertas similitudes en algunos pigmentos amarillos, aunque si difirieron de los de la tuna.

La adición de reguladores de crecimiento vegetal en el medio de cultivo promovió la producción de biomasa, y en general conservó el contenido de betalaínas. En algunos casos se afectó la producción de betalaínas y la morfología del material.

Se puede encontrar para cada especie un tratamiento con RCVs que de buenos resultados. Las combinaciones equimolares utilizadas de auxina-citocinina resultaron ser las mejores para promover buenos rendimientos en GPF, sin afectar la producción de betalaínas ni la morfología del material. Se requiere evaluar la conveniencia de su uso.

La adición de complejos nutritivos al medio no logró incrementar la producción de biomasa y la producción de betalaínas solo incrementó en *T. pseudopectinatus* con el tratamiento de plátano en polvo a la concentración más baja utilizada. La morfología se vio modificada por el uso de este tipo de complejos. No fue aconsejable utilizar coco en polvo por afectar el crecimiento. Las concentraciones bajas dieron mejores resultados que las altas.

Algunos reguladores de crecimiento y algunos complejos nutritivos resultaron tóxicos para las raíces transformadas de cactáceas, en los niveles en los que se aplicaron.

La adición de prolina o tirosina en concentraciones bajas fue favorable para la ganancia de biomasa y para la morfología de las raíces transformadas de cactáceas.

La generación de biomasa no se afectó por las condiciones de luminosidad durante el cultivo, pero la luz fluorescente estimuló la producción de pigmentos betalaínicos. La oscuridad afectó la morfología de los diferentes materiales y disminuyó la producción de betalaínas.

Usar NaCl como agente inductor de estrés, en el cultivo de raíces transformadas de cactáceas, es una buena opción para un sistema de producción de betalainas en dos fases, debido a su capacidad de incrementar el contenido de estos pigmentos.

Entre las pruebas realizadas al momento, la mayor producción de pigmentos betalaínicos se logró utilizando los medios de cultivo óptimos; sin embargo, el realizar cultivos en etapas o combinar tratamientos, puede ser viable y prometedor para incrementar la producción de betalainas.

Los patrones de bandeo en cromatografía de capa fina para las raíces transformadas de las diferentes especies analizadas, no se modificaron por la adición de reguladores de crecimiento vegetal, de complejos nutritivos o de precursores de las betalainas. Se sigue conservando la diversidad de metabolitos en estos materiales vegetales, aunque el cultivo en oscuridad limita su producción.

El uso de biorreactores de inmersión temporal fue una buena opción para el cultivo de raíces transformadas de *T. lophophoroides*, ya que se logró incrementar la producción de biomasa, mejorar la morfología radical y llevar el proceso de producción de metabolitos a mayor escala, por lo que puede considerarse como una alternativa sustentable.

8. GLOSARIO

Antropogénico: Adjetivo que hace referencia a los efectos, procesos o materiales que son el resultado de actividades humanas.

Axénico: Dicho de un cultivo o de un microorganismo que se desarrolla en un ambiente donde no hay ningún otro organismo vivo.

Auxinas: Grupo de hormonas vegetales que actúan como reguladores del crecimiento vegetal. Se sintetizan en las regiones meristemáticas del ápice de los tallos y provocan la elongación de las células.

Autoclave: Aparato para esterilizar por vapor, generalmente cilíndrico, metálico y con cierre hermético.

Biomasa: Cantidad de materia acumulada en un individuo, un nivel trófico, una población o un ecosistema.

Biorreactor: Recipiente o sistema en donde se llevan a cabo procesos químicos que involucran organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos.

Biosintético: Relativo a la biosíntesis, que es la formación de moléculas orgánicas más complejas partiendo de otras moléculas más simples, requiriendo energía.

Citocininas: Hormonas vegetales que actúan como reguladores del crecimiento vegetal, controlando la división y diferenciación celulares, contrarrestando la dominancia apical, entre otras funciones. Se sintetizan en la raíz.

Coefficiente de determinación (R^2): En estadística, mide que parte de la variación de una variable viene explicada por la variación de la otra. Puede tener valores entre 0 (ninguna relación) y 1 (relación perfecta).

Coefficiente de extinción molar: En química, parámetro que define cuan fuertemente una sustancia absorbe la luz a una longitud de onda dada, por unidad de concentración molar.

Cofactor enzimático: Es un componente no proteico, termoestable y de baja masa molecular, necesario para la acción de una enzima.

Colorantes azoicos: Compuestos que llevan el grupo funcional $RN=NR'$ en donde R y R' pueden ser un arilo o un alquilo. Sirven para colorear artículos textiles y de cuero.

Compuestos bioactivos: Compuestos que pueden cumplir funciones específicas en el cuerpo para mejorar la salud.

Correlación: En matemáticas, existencia de mayor o menor dependencia mutua entre dos variables aleatorias.

Cromóforo: Parte o conjunto de átomos de una molécula que tiene muchos electrones capaces de absorber energía o luz visible, y excitarse para así emitir diversos colores, dependiendo de las longitudes de onda de la energía emitida.

Daño fotooxidativo: Daño producido por efecto de reacciones de oxidación inducidas por luz.

Déficit hídrico: Situación en la que el agua disponible no es suficiente para satisfacer la demanda, en pocas palabras, es la falta o escasez de agua.

Diferenciación: La diferenciación celular es el proceso por el cual las células de un linaje celular concreto sufren modificaciones en su expresión génica, para adquirir la morfología de un tipo celular específico y diferente al resto de tipos celulares del organismo.

Condiciones edáficas: Condiciones referentes a la composición y naturaleza del suelo.

Electroforesis: Técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico, sobre una superficie hidratada de un soporte sólido, a través de una matriz porosa o bien en disolución.

Equimolar: Adjetivo que indica en una mezcla de dos o más sustancias, que éstas se encuentran presentes en una relación de igual número de moles.

Estereoespecífica: En química, una reacción estereoespecífica, es aquella en donde los reactivos que difieren solo en su estereoisomería son transformados preferente o exclusivamente en productos que se diferencian de igual manera en su estereoisomería.

Exógeno: De origen externo, que se forma fuera del organismo

Explante: Es un tejido vivo separado de su órgano propio y que es transferido a un medio de crecimiento artificial.

Factores abióticos: Son los distintos componentes que determinan el espacio físico en el cual habitan los seres vivos, como el agua, la temperatura, la luz, el pH, el suelo, la humedad, el oxígeno y los nutrientes.

Factores bióticos: Son todos los organismos que tienen vida, y pueden referirse a la flora y fauna de un lugar y sus interacciones.

Factores de crecimiento: Conjunto de proteínas presentes en el plasma y en las plaquetas de nuestra sangre que desempeñan una función esencial en los procesos de reparación y regeneración de los tejidos.

Factor de retardo (Rf): Relación que existe entre la distancia recorrida por el centro de la mancha y la distancia que simultáneamente, ha recorrido la fase móvil.

Fase estacionaria: En biología, es una fase de crecimiento de diversos organismos vivos, en donde la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y la acumulación de productos tóxicos (tasa de crecimiento = tasa de muerte). En cromatografía, es una sustancia o una mezcla que está fija sobre un soporte (papel, vidrio, aluminio, etc.) que tiene retenidos los componentes de la mezcla a separar.

Fase lag: En biología, es una fase de crecimiento de diversos organismos vivos, donde se da la adaptación a las condiciones del medio de cultivo fresco; es un periodo de ajuste metabólico.

Fase móvil: En cromatografía, es un disolvente o una mezcla de disolventes que fluye a través de la fase estacionaria, arrastrando con ella a los diferentes compuestos de la mezcla, según su afinidad.

Fase reversa: Modalidad en que se puede realizar una cromatografía, donde la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar.

Fenotipo: En Biología, conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

Fitoquímicos: Sustancias biológicamente activas que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, que no son nutrientes esenciales para la vida, pero tienen efectos positivos en la salud.

Fitoalexinas: Compuestos antimicrobianos que se acumulan en algunas plantas en altas concentraciones, después de infecciones bacterianas o fúngicas y ayudan a limitar la dispersión del patógeno.

Fotoperiodo: Cambios de iluminación que reciben las plantas, refiriéndose a su duración y periodicidad, y que influyen en la regulación de sus funciones biológicas

Fuerza de corte: Concepto físico que describe la cantidad de fuerza utilizada en un área específica.

Genoma: Conjunto de genes que especifican todas las características expresadas o potenciales de una especie.

Germoplasma: Es el material que se conserva como semillas, cultivo de tejido o plantas establecidas en colecciones de campo.

Hiperhidratación: Síndrome que ocurre en un organismo cuando el consumo de agua es superior a su eliminación, y se almacena un exceso de agua que puede provocar diversas alteraciones fisiológicas.

Inóculo: Se llama así a la introducción de un organismo o una sustancia en un tejido vivo o en un medio de cultivo, con el fin de que crezca y se reproduzca.

Irradiancia: Magnitud utilizada para describir la potencia incidente por unidad de superficie, de todo tipo de radiación electromagnética.

Macronutrientes: Se consideran macronutrientes vegetales a los que están presentes en los tejidos de plantas en concentraciones por encima del 0.1 % en masa seca (C, H, O, N, P, K, Ca, Mg y S).

Medio basal: Contiene los macro y micronutrientes de un medio determinado, pero es incompleto puesto que típicamente carece de algún componente orgánico: vitaminas, carbohidratos o reguladores de crecimiento.

Metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM): tipo de metabolismo vegetal que permite a algunas plantas absorber dióxido de carbono durante la noche y fijarlo durante el día; la mayoría de las plantas realizan estas dos actividades durante el día.

Metabolito: Cualquier sustancia producida durante el metabolismo.

Metabolitos secundarios: Compuestos orgánicos sintetizados por el organismo, que no tienen un rol directo en el crecimiento o la reproducción del mismo.

Micronutrientes: Los micronutrientes vegetales llamados también oligoelementos no sobrepasan el 0.01 % en masa seca del tejido vegetal (Cl, B, Mn, Zn, Cu, Ni y Mo, entre otros).

Moléculas señalizadoras: Moléculas producidas por células específicas y transportadas a una o varias células diana para desencadenar una acción determinada.

Neoplásica: Adjetivo, relativo a la neoplasia, término médico utilizado para designar una masa anormal de tejido

Nutracéutico: Composición de las palabras nutrición y farmacéutico. Se refiere a la cualidad que posee un alimento o parte de un alimento de proporcionar beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de enfermedades.

Opinas: Compuestos químicos de bajo peso molecular derivados de aminoácidos, que se encuentran en tumores o en raíces transformadas de plantas, producidos por bacterias del género *Agrobacterium*.

Plagiotrópica: En botánica, que tiene los ejes más largos inclinados lejos de la línea vertical, esto es que se favorece su crecimiento horizontal en mayor medida.

Plásmido: Moléculas de DNA extracromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientemente del DNA cromosómico.

Presión osmótica: Presión que se debe aplicar a una solución para detener el flujo neto de disolvente a través de una membrana semipermeable.

Precursor: Sustancia indispensable para producir otra en un proceso químico o en una ruta metabólica.

Reacción Redox: Tipo de reacción química en donde se transfieren electrones entre dos especies químicas (átomos, moléculas o iones).

Regresión lineal: Modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre una variable dependiente, las variables independientes y un término aleatorio (error).

Reguladores de crecimiento vegetal: Sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas, y que por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas, también suelen ser llamadas hormonas vegetales.

Respuesta quimiotáctica: Relativo al quimiotaxismo, tipo de fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos uni o pluricelulares dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Rizogénica: Que genera o produce raíces.

Ruta metabólica: Sucesión de reacciones químicas que ocurren dentro de una célula, para formar un producto final que puede ser almacenado o utilizado en otra ruta metabólica.

Subcultivo: Siembra de material ya establecido *in vitro* (resiembra).

Tejido caloso (o callo): Masa amorfa de células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación, generada como mecanismo de cicatrización en plantas.

Totipotencialidad: Capacidad que poseen las células vegetales de regenerar plantas completas

Traslocación: En plantas, es el transporte de agua, minerales o nutrientes a larga distancia.

Virulencia: Grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.

9. REFERENCIAS

- Anderson, E. F. 2001: *The Cactus Family*. 776 pp. Timber Press, Inc., Portland, Oregon.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C. & Restrepo, J. 2009: Aspectos Ingenieriles del Cultivo *in vitro* de Células Vegetales para la Producción de Metabolitos Secundarios. *Dyna* 76, 109-121.
- Arias-Zabala, M., Angarita-Velásquez, M. J., Aguirre-Cardona, A. M., Restrepo-Flórez, J. M. & Montoya-Vallejo, C. 2009: Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 62, 4881-4895.
- Azeredo, H. M. C. 2009: Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology* 44, 2365-2376.
- Bhojwani, S. S. & Dantu, P. K. 2013: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. 328 pp. Springer India, New Delhi, India.
- Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. 1996: Tissue culture media. In Bhojwani, S. S. & Razdan, M. K. (eds.): *Studies in Plant Science*, 39-62 pp. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Bilyk, A. 1981: Thin-Layer Chromatographic Separation of Beet Pigments. *Journal of Food Science* 46, 298-299.
- Bravo-Hollis, H. & Sánchez-Mejorada R., H. 1991: *Las cactáceas de México*. 404, 643 pp. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Carlín, A., Tafoya, F., Alpuche Solís, A. & Pérez-Molphe-Balch, E. 2015: Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 1-8.
- Castellanos-Santiago, E. & Yahia, E. M. 2008: Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 5758-5764.
- Chattopadhyay, P., Chatterjee, S. & Sen, S. K. 2008: Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. *African Journal of Biotechnology* 7, 2972-2985.
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y. & Bi, F. Y. 1975: Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18, 659-668.
- CITES 2015: *Appendices I, II and III*. <http://www.cites.org/esp/app/appendices.php>. Date accessed: 23 de Febrero 2015.
- Coke, J. E. 1996: Basal Nutrient Medium for *in vitro* Cultures of Loblolly pines Basal Nutrient Medium for in vitro Cultures of Loblolly pines. In Patent, U. S. (ed.) www.freepatentsonline.com. L12N 5/02 ed. Westvaco Corporation, USA.
- Contreras-Ovalle, N. I. 2011a: Caracterización química y funcional de los pigmentos del Xoconostle (*Opuntia spp.*). *Centro de Ciencias Básicas*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México.
- Contreras-Ovalle, N. I. 2011b: Caracterización química y funcional de los pigmentos del Xoconostle (*Opuntia spp.*) Caracterización química y funcional de los pigmentos del Xoconostle (*Opuntia spp.*). *Centro de Ciencias Básicas*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México.
- de Boer, L. 2014: Biotechnological Production of Colorants. In Zorn, H. & Czermak, P. (eds.): *Biotechnology of Food and Feed Additives*, 51-89 pp. Springer Berlin Heidelberg.

- De la Cerda Lemus, M. 1989: *Cactáceas de Aguascalientes*. 98 pp. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags., México.
- Delgado-Vargas, F. & Paredes-López, O. 2003: *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. 327 pp. CRC Press LLC, Boca Ratón, Fla. USA.
- Downham, A. & Collins, P. 2000a: Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology* 35, 5-22.
- Downham, A. & Collins, P. 2000b: Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science & Technology* 35, 5-22.
- Driver, J. A. & Kuniyuki, A. H. 1984: In vitro propagation of paradox walnut rootstock [Juglans hindsii X Juglans regia, tissue culture]. *HortScience (USA)* 19, 507-509.
- Eibl, R. & Eibl, D. 2008: Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews* 7, 593-598.
- Fitz-Maurice, B., Fitz-Maurice, W. A., Sotomayor, M. & Smith, M. 2013a: *Turbinicarpus pseudopectinatus*. www.iucnredlist.org/details/40986/0. Date accessed: 10 de Marzo 2014.
- Fitz-Maurice, W. A., Sotomayor, M., Smith, M. & Fitz-Maurice, B. 2013b: *Turbinicarpus laui*. www.iucnredlist.org/details/40980/0. Date accessed: 10 de Marzo 2014.
- Flores, J., Jurado, E. & Jiménez-Bremont, J. F. 2008: Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology* 23, 43-46.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. & Ojima, K. 1968: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151-158.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. & Escribano, J. 2005: Fluorescent pigments: New perspectives in betalain research and applications. *Food Research International* 38, 879-884.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y. & Joaquín-Cruz, E. 2013: Physical, Chemical, and Antioxidant Activity Characterization of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition* 68, 403-410.
- George, E., Hall, M. & Klerk, G.-J. 2008: The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G.-J. D. (eds.): *Plant Propagation by Tissue Culture*, 65-113 pp. Springer Netherlands.
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I. & Bley, T. 2007: Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 1175-1185.
- Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T. & Pavlov, A. 2008: Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 581-593.
- Georgiev, V. G., Bley, T. & Pavlov, A. I. 2012: Bioreactors for the Cultivation of Red Beet Hairy Roots. In Neelwarne, B. (ed.): *Red Beet Biotechnology*, 251-281 pp. Springer US.
- Goettsch, B. & Hernández, H. M. 2006: Beta diversity and similarity among cactus assemblages in the Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments* 65, 513-528.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M. & Gantet, P. 2006: Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 341-346.
- Haude, M. E. 1997: Identification and Classification of Colorants Used During Mexico's Early Colonial Period. *The Book and Paper Group ANNUAL* 16.

- Heller, R. 1953: Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 11, 1-223.
- Hendry, G. A. F. 1996: Natural pigments in biology. In Hendry, G. A. F. & Houghton, J. D. (eds.): *Natural Food Colorants*, 1-39 pp. Second ed. Blackie Academic & Professional, Great Britain.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C. & Carle, R. 2006: Betalain Stability and Degradation—Structural and Chromatic Aspects. *Journal of Food Science* 71, R41-R50.
- Hernández, H. M. & Godinez-A., H. 1994: Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, 33 - 52.
- Hoffmann, W. A. & Poorter, H. 2002: Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Annals of botany* 90, 37-42.
- Hunger, K. 2007: Dyes, general survey. In Hunger, K. (ed.): *Industrial dyes: Chemistry, properties, applications*, 1-12 pp. Wiley-VCH, Germany.
- IUCN 2014: *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3*. <http://www.iucnredlist.org/>. Date accessed: 24 de Febrero 2015.
- 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, Tissue and Organ Culture* 80, 247-257.
- Jeong, G.-T., Woo, J.-C. & Park, D.-H. 2007: Effect of plant growth regulators on growth and biosynthesis of phenolic compounds in genetically transformed hairy roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12, 86-91.
- Jeong, G. T. & Park, D. H. 2006: Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system: effect of abiotic elicitors. *Appl Biochem Biotechnol* 129-132, 436-446.
- Jeong, J.-A., Wu, C.-H., Murthy, H., Hahn, E.-J. & Paek, K.-Y. 2009: Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14, 91-98.
- Jiménez-Sierra, C. L. & Eguiarte, L. E. 2010: Candy Barrel Cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto): A Traditional Plant Resource in Mexico Subject to Uncontrolled Extraction and Browsing. *Economic Botany* 64, 99-108.
- Kim, Y. J., Weathers, P. J. & Wyslouzil, B. E. 2003: Growth dynamics of *Artemisia annua* hairy roots in three culture systems. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 428-443.
- Kleinowski, A. M., Brandão, I. R., Einhardt, A. M., Ribeiro, M. V., Peters, J. A. & Braga, E. J. B. 2014: Pigment production and growth of *Alternanthera* plants cultured *in vitro* in the presence of tyrosine. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57, 253-260.
- Martin, Y. & Vermette, P. 2005: Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 26, 7481-7503.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962: A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Murthy, H. N., Dandin, V. S., Zhong, J.-J. & Paek, K.-Y. 2014: Strategies for Enhanced Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures. In Paek, K.-Y., Murthy, H. N. & Zhong, J.-J. (eds.): *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*, 471-508 pp. Springer Netherlands, Dordrecht.

- Murthy, H. N., Dijkstra, C., Anthony, P., White, D. A., Davey, M. R., Power, J. B., Hahn, E. J. & Paek, K. Y. 2008: Establishment of *Withania somnifera* hairy root cultures for the production of withanolide A. *Journal of integrative plant biology* 50, 975-981.
- Nakatsuka, T., Yamada, E., Takahashi, H., Imamura, T., Suzuki, M., Ozeki, Y., Tsujimura, I., Saito, M., Sakamoto, Y., Sasaki, N. & Nishihara, M. 2013: Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. *Sci. Rep.* 3.
- Nambiar, N., Tee, C. & Maziah, M. 2012: Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in *Dendrobium* Alya Pink. *Plant Omics* 5, 10-18.
- Nazareno, M. A. 2014: Phytochemicals of nutraceutical importance from cactus and their role in human health. In Prakash, D. & Sharma, G. (eds.): *Phytochemicals of nutraceutical importance*, 103-115 pp. CAB International, United Kingdom.
- Nazareno, M. A. & Padrón-Pereira, C. A. 2011: Nuevas tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de las cactáceas en la elaboración de alimentos. Componentes funcionales y propiedades antioxidantes. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 2, 202-238.
- Neelwarne, B. 2012: Red Beet Hairy Root Cultures. In Neelwarne, B. (ed.): *Red Beet Biotechnology*, 199-249 pp. Springer US.
- Ortega-Baes, P., Sühring, S., Sajama, J., Sotola, E., Alonso-Pedano, M., Bravo, S. & Godínez-Alvarez, H. 2010: Diversity and Conservation in the Cactus Family. In Ramawat, K. G. (ed.): *Desert Plants*, 157-173 pp. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Pavlik, 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.
- Pavlova, O. A., Matveyeva, T. V. & Lutova, L. A. 2014: rol-Genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 4, 137-145.
- Pavokovi, D. & Krsnik-Rasol, M. 2011: Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. *Food Technology and Biotechnology* 49, 145-155.
- Poloni, R. & de Luca, M. 2007: Corantes naturais frente às tendências mundiais. *Periódico Tchê Química* 4, 33-40.
- Prieto-García, F., Filardo-Kerstup, S., Pérez-Cruz, E., Beltrán-Hernández, R., Román-Gutiérrez, A. & Méndez-Marzo, M. 2006: Caracterización física y química de semillas de opuntias (*Opuntia spp.*) cultivadas en el Estado de Hidalgo, México. *Bioagro* 18, 163-169.
- Pérez-Alonso, N. & Jiménez, E. 2011: Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Bioteología Vegetal*. Instituto de Bioteología de las Plantas de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.
- Reis, A., Kleinowski, A. M., Klein, F. R. S., Telles, R. T., do Amarante, L. & Braga, E. J. B. 2015: Light quality on the in vitro growth and production of pigments in the genus *Alternanthera*. *Journal of crop science and biotechnology* 18, 349-357.
- Rymbai, H., Sharma, R. & Srivastav, M. 2011: Biocolorants and Its Implications in Health and Food Industry—A Review. *International Journal of PharmaTech Research* 3, 2228-2244.
- Santos-Díaz, M. S., Velásquez-García, Y. & González-Chávez, M. M. 2005: Producción de pigmentos por callos de *Mammillaria candida* Scheidweiler (cactaceae). *Agrociencia* 39, 619-626.

- Schoefs, B. 2005: Plant Pigments: Properties, Analysis, Degradation. *Advances in Food and Nutrition Research*, 41-91 pp. Academic Press.
- SEMARNAT 2010: Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. In SEGOB:SEMARNAT (ed.). Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
- Sharma, S., Shahzad, A. & Sahai, A. 2013: Hairy Root Culture: An Efficient System for Secondary Metabolite Production. In Shahid, M., Shahzad, A., Malik, A. & Sahai, A. (eds.): *Recent Trends in Biotechnology and Therapeutic Applications of Medicinal Plants*, 51-78 pp. Springer Netherlands.
- Sherma, J. & Fried, B. 2003: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. 1048 pp. CRC Press, USA.
- Shetty, A. A., Rana, M. K. & Preetham, S. P. 2012: Cactus: a medicinal food. *Journal of Food Science and Technology* 49, 530-536.
- Smith, M., Fitz-Maurice, W. A., Fitz-Maurice, B. & Sotomayor, M. 2013: *Turbinicarpus lophophoroides*. <http://www.iucnredlist.org/details/40981/0>. Date accessed: 10 de Marzo 2014.
- Soriano-Santos, J., Franco-Zavaleta, M., Pelayo-Zaldívar, C., Armella-Villalpando, M., Yáñez-López, M. & Guerrero-Legarreta, I. 2007: Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la "Jiotilla" (*Escontria chiotilla* Weber Britton & Rose). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6, 19-25.
- Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A. & Pavlov, A. 2013: Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Engineering in Life Sciences* 13, 26-38.
- Stiles, A. & Liu, C.-Z. 2013: Hairy Root Culture: Bioreactor Design and Process Intensification. In Doran, P. M. (ed.): *Biotechnology of Hairy Root Systems*, 91-114 pp. Springer Berlin Heidelberg.
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R. & Felker, P. 2005: Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia spp.*) Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 442-451.
- Suresh, B., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N. & Ravishankar, G. A. 2004: Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments. *Process Biochemistry* 39, 2091-2096.
- Szabados, L. & Savouré, A. 2010: Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science* 15, 89-97.
- Veena, V. & Taylor, C. G. 2007a: Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43, 383-403.
- Veena, V. & Taylor, C. G. 2007b: Agrobacterium rhizogenes: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43, 383-403.
- Wahby, I. 2007: Aproximaciones biotecnológicas tendientes a la mejora del cañamo (*Cannabis sativa* L.): Obtención y cultivo de raíces transformadas, transformación genética y regeneración *in vitro*. *Departamento de Fisiología Vegetal*. Universidad de Granada, Granada, España.

- Wang, J. W. & Wu, J. Y. 2013: Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 134, 55-89.
- Watt, M. P. 2012: The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology* 11, 14025-14035.
- White, P. R. 1963: *The cultivation of animal and plant cells*. 228 pp. Ronald Press Company, New York.



10. ANEXOS

A) Contenido de nitrógeno inorgánico y relación $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ de diferentes medios basales

B) Categorías morfológicas de raíces transformadas de cactáceas

C) Composición iónica de diferentes medios de cultivo



A. Contenido de nitrógeno inorgánico y relación NO₃:NH₄ de diferentes medios basales

Medio	Nitrógeno Total (mM)	NO ₃ (mM)	NH ₄ (mM)	Relación NO ₃ :NH ₄
B5 ^a	27.0	25.0	2.0	12.5:1
DKW ^b	47.1	29.4	17.7	1.6:1
Heller ^c	7.1	7.1	-	-
MS ^d	60.0	39.4	20.6	1.9:1
N6 ^e	35.0	28.0	7.0	4:1
White ^f	3.3	3.3	-	-
WV3 ^g	9.0	9.0	-	-

Tomada y modificada de Carlin *et al.* 2015. ^aGamborg *et al.* 1968, ^bDriver y Kuniyuki 1984, ^cHeller 1953, ^dMurashige y Skoog 1968, ^eChu *et al.* 1975, ^fWhite 1963, ^gCoke 1996.

B. Categorías morfológicas de raíces transformadas de cactáceas



1. Categoría R (raíces bien definidas), **2. Categoría RO** (raíces definidas con poca a moderada cantidad de tejido de morfología no definida), **3. Categoría OR** (tejido de morfología no definida con poca a moderada cantidad de raíces definidas) y **4. Categoría O** (tejido con morfología no definida). Imágenes de *T. lophophoroides*, especie que presentó todas las categorías.

C. Composición iónica de diferentes medios de cultivo

Iones	Medio						
	B5 ^a	DKW ^b	Heller ^c	MS ^d	N6 ^e	White ^f	WV3 ^g
<i>miliMolar (mM)</i>							
N (total)	27.0	47.1	7.1	60.0	35.0	3.33	9.0
P	1.08	1.95	0.90	1.25	2.94	0.138	1.98
K	25.00	19.84	10.05	20.05	30.93	1.66	20.29
Ca	1.02	9.34	0.51	2.99	1.13	1.27	4.08
Mg	1.00	3.00	1.01	1.50	0.75	3.04	7.50
Cl	2.04	2.03	11.08	5.98	2.26	0.87	16.97
<i>microMolar (μM)</i>							
Fe	50.10	121.57	3.70	100.00	99.99	12.50	0.10
S	2079.90	12268.74	1013.50	1730.00	4378.93	4502.00	7.62
Na	1089.00	247.14	7966.00	202.00	200.4	2958.00	102.05
B	48.50	77.63	16.00	100.00	25.88	24.20	501.37
Mn	59.20	198.21	0.40	100.00	19.53	22.40	89.70
Zn	7.00	57.14	3.40	30.00	5.22	10.40	29.91
Cu	0.10	1.00	0.10	0.10	-	0.04	1.00
Mo	1.00	1.61	-	1.00	-	0.007	1.03
Co	0.10	-	-	0.10	-	-	0.11
I	4.50	-	0.06	5.00	4.82	4.50	5.00
Al	-	-	0.20	-	-	-	-
Ni	-	0.02	0.10	-	-	-	-

Tomada y modificada de (Bhojwani & Razdan 1996). ^aGamborg *et al.* 1968, ^bDriver y Kuniyuki 1984, ^cHeller 1953, ^dMurashige y Skoog 1968, ^eChu *et al.* 1975, ^fWhite 1963, ^gCoke 1996.