



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TESIS**

**ESTABLECIMIENTO DE DIFERENTES TIPOS DE CULTIVO *in vitro* DE  
*Yucca* spp. Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS EN LOS MISMOS**

**PRESENTA**

**Yessica López Ramírez**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**TUTORES**

**Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre  
Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Gabriela Trejo Tapia**

**Aguascalientes, Ags., Enero del 2021**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez**  
**Decano Del Centro de Ciencias Básicas**  
**PRESENTE**

Por medio del presente como cotutor designado de la estudiante **Yessica López Ramírez**, con ID 17422, quien realizó la tesis titulada: **"ESTABLECIMIENTO DE DIFERENTES TIPOS DE CULTIVO in vitro DE *Yucca* spp. Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS MISMOS"**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, 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 17 de noviembre de 2020.

**Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch**  
**Cotutor 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.- Minuta Secretario Técnico





CARTA DE VOTO APROBATORIO  
INDIVIDUAL

**M. en C. Jorge Martín Alfórez Chávez**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**PRESENTE**

Por medio del presente como CO-TUTORA designada de la estudiante **YESSICA LÓPEZ RAMÍREZ**, con ID 17422, quien realizó la tesis titulada: **"ESTABLECIMIENTO DE DIFERENTES TIPOS DE CULTIVO *in vitro* DE *Yucca spp.* Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS MISMOS"**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado III del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

**ATENTAMENTE**

**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 18 de noviembre de 2020.**

  
**Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre**  
**Co-tutora 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. Minuta Secretario Técnico

Elaborado por Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por Depto. Control de Calidad/Depto. Gestión de Calidad  
Aprobado por Depto. Control de Calidad/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: 001-000-PO-07  
Actualización: 01  
Emisión: 11/09/19

**M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**PRESENTE**

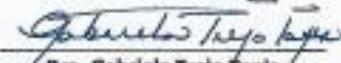
Por medio del presente como ASESORA designada de la estudiante **YESSICA LÓPEZ RAMÍREZ**, con ID 17422, quien realizó la tesis titulada: **"ESTABLECIMIENTO DE DIFERENTES TIPOS DE CULTIVO *in vitro* DE *Yucca spp.* Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS MISMOS"**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla 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 18 de noviembre de 2020.**



**Dra. Gabriela Trejo Tapia**  
**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. Minuta Secretario Técnico

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 31-may-21

**NOMBRE:** YESSICA LÓPEZ RAMÍREZ **ID** 17422

**PROGRAMA:** DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS **LGAC (del posgrado):** BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA VEGETAL Y ANIMAL

**TIPO DE TRABAJO:** ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico

**TÍTULO:** ESTABLECIMIENTO DE DIFERENTES TIPOS DE CULTIVO in vitro DE Yucca spp. Y ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS MISMOS  
**IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):**

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN Yucca spp con POSIBLE USO BIOTECNOLÓGICO

**INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:**

*Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:*

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

*El egresado cumple con lo siguiente:*

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

*En caso de Tesis por artículos científicos publicados:*

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí  SI  
No

FIRMAS

**Elaboró:**

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DRA. ILIANA ERNESTINA MESSINA RAMÍREZ

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIANA GUTIÉRREZ BARRERA

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

**Revisó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDEE MARTÍNEZ RUVALCABA

**Autorizó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

**Callus induction and phytochemical profiling of *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey obtained from *in vitro* cultures****Inducción de callos y perfil fitoquímico de *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey obtenida de cultivos *in vitro***Y. López-Ramírez<sup>1</sup>, E. Cabañas-García<sup>2</sup>, C. Areche<sup>3</sup>, G. Trejo-Tapia<sup>4</sup>,  
E. Pérez-Molphe-Balch<sup>1</sup>, Y.A. Gómez-Aguirre<sup>1,5\*</sup><sup>1</sup>Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Ciudad universitaria, C.P. 20100, Aguascalientes, México.<sup>2</sup>Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería Campus Zacatecas, Instituto Politécnico Nacional, Blvd. del Bote 202 Cerro del Gato, Ejido La Escondida, Col. Ciudad Administrativa, C.P. 98160, Zacatecas, México.<sup>3</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago 7800024, Chile.<sup>4</sup>Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Col. San Isidro, Carretera Yauatepec-Jojutla, Km 6, C.P. 62731, Morelos, México.<sup>5</sup>CONACYT Research Fellow-Universidad Autónoma de Aguascalientes - Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, C.P. 20131, Aguascalientes, México.

Received: November 10, 2020; Accepted: February 15, 2021

**Abstract**

It has been demonstrated that some species of the *Yucca* genus are a source of metabolites with functional properties, as is *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey with antifungal activity. This research aimed to induce the formation of callus tissue in *Y. carnerosana*, to know the growth kinetic, and to analyze the metabolite profile of the formed tissue and plants propagated under *in vitro* and *ex vitro* conditions. Callus induction was achieved using Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 4.4  $\mu\text{M}$  benzyladenine and 4.1  $\mu\text{M}$  4-aminotrichloropicolinic acid (Picloram). The growth kinetics of callus tissue was characterized by a latency phase achieved at the second week of culture, followed by an exponential growth until the fourth week. The culture showed a specific growth rate of 0.0258  $\text{d}^{-1}$ ; the doubling time was 26.866 days, and the growth index was 5.9091. The metabolite profile was analyzed using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS). The chromatographic and mass spectral analysis allowed the separation and identification of 22 compounds in callus tissue, 26 in *in vitro* plants, and 27 in *ex vitro* plants. Our results indicate that the callus tissue and the *in vitro* and *ex vitro* plants of *Y. carnerosana* may be a source of metabolites of interest.

**Keywords:** UHPLC-MS, polyphenols, *in vitro*, growth regulators, Asparagaceae.

**Resumen**

Algunas especies del género *Yucca* han demostrado ser una fuente de metabolitos con propiedades funcionales, tal es el caso de *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey con actividad antifúngica. El objetivo de esta investigación fue inducir la formación de tejido calloso en *Y. carnerosana*, conocer el comportamiento cinético y analizar el perfil de metabolitos del tejido obtenido, así como en plantas propagadas *in vitro* y *ex vitro*. La inducción de callos se logró utilizando medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con benciladenina 4.4  $\mu\text{M}$  y ácido 4-aminotrichloropicolínico (Picloram) 4.1  $\mu\text{M}$ . La cinética de crecimiento se caracterizó por una fase de latencia alcanzada en la segunda semana de cultivo, seguida de un crecimiento exponencial hasta la cuarta semana. La tasa específica de crecimiento fue de 0.0258  $\text{d}^{-1}$ ; el tiempo de duplicación fue de 26.866 días y el índice de crecimiento fue de 5.9091. El perfil de metabolitos se analizó mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS). El análisis cromatográfico y espectrométrico permitió la separación e identificación de 22 compuestos en callos, 26 en plantas *in vitro* y 27 en plantas *ex vitro*. Nuestros resultados indican que el tejido calloso de *Y. carnerosana* así como las plantas *in vitro* y *ex vitro* puede ser fuente de metabolitos de interés.

**Palabras clave:** UHPLC-MS, polifenoles, *in vitro*, reguladores de crecimiento, Asparagaceae.

\* Corresponding author. E-mail: yagomez@correo.uaa.mx

<https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2209>

ISSN:1665-2738, issn-e: 2395-8472

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y por todas las oportunidades que ha puesto en mi camino, por darme las fuerzas necesarias y no dejarme desistir de este deseo de superación y por llevarme de su mano en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis Padres Estela Ramírez Cuellar y Carlos López Macías por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, pero sobre todo en estos últimos años que me han dado su amor incondicional, gracias por su infinito cariño los amo.

A mis hijos Nicolás y Regina que han sido lo más hermoso que Dios me ha dado, son mi motor para ser la mejor versión de mi misma, quiero darles el ejemplo para que tengan alas y puedan volar más alto que yo y sean mucho mejor que yo, mis niños hermosos los amo.

A mi marido Raúl que fue parte de este gran proyecto, apoyándome incondicionalmente y motivándome, no cabe duda que Dios pone en nuestro camino a las personas correctas en el preciso momento, gracias por tanto amor, te amo.

Agradezco a la Dra. Gabriela Trejo Tapia por sus atinadas observaciones y sugerencias en la construcción y mejora del trabajo, espero que las vean reflejadas en el producto final. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre y al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, que con su gran paciencia y compromiso me llevó de la mano por este gran camino. Debo destacar, por encima de todo, su paciencia y dedicación, gracias por ser parte tan importante en este gran paso de mi vida.

A CONACYT por la beca de manutención con registro 467140 otorgado para la realización de mis estudios, gracias a su apoyo se culminó este gran proyecto.

A Martita, Adilene, e Isaac, a todos mis amigos, compañeros y maestros de la UAA, quienes formaron parte de esta aventura y siempre se quedarán en mis recuerdos.

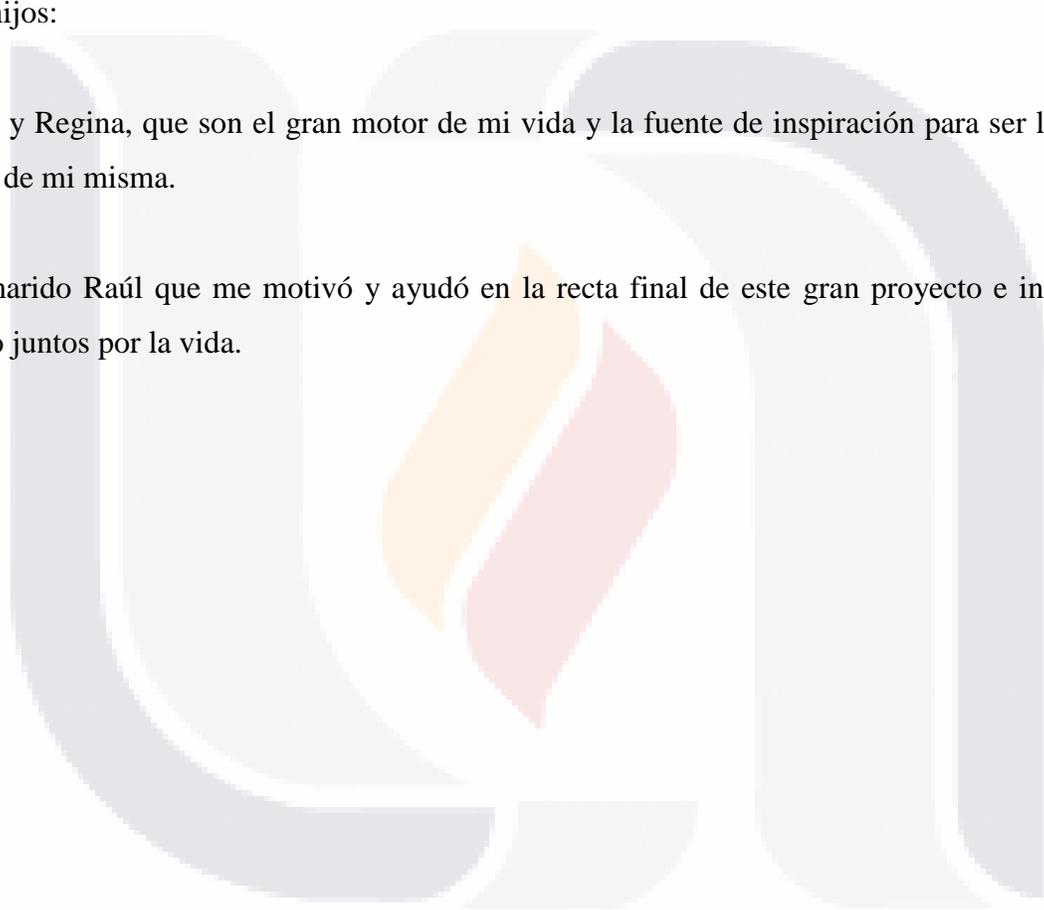
## DEDICATORIA

A mis padres Estela y Carlos que han sabido guiarme en toda mi vida y que lo siguen haciendo con su gran ejemplo, son los mejores papás del mundo que Dios me pudo dar.

A mis hijos:

Nicolás y Regina, que son el gran motor de mi vida y la fuente de inspiración para ser la mejor versión de mi misma.

A mi marido Raúl que me motivó y ayudó en la recta final de este gran proyecto e iniciar un trayecto juntos por la vida.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....5

ABSTRACT.....6

INTRODUCCIÓN .....7

1. ANTECEDENTES.....8

1.1. GÉNERO *Yucca* .....8

1.1.1. DESCRIPCIÓN DE *Yucca carnorerosana* (Trel) Mckelvey .....9

1.1.2. DESCRIPCIÓN DE *Yucca coahuilensis* Matuda & I.L. Pina .....12

1.1.3. DESCRIPCIÓN DE *Yucca elata* (Engelm.) Engelm .....14

1.1.4. DESCRIPCIÓN DE *Yucca filamentosa* L.....16

1.1.5. DESCRIPCIÓN DE *Yucca filifera* Chabaud.....17

1.1.6. DESCRIPCIÓN DE *Yucca periculosa* Baker .....19

1.1.7. FITOQUÍMICA DEL GÉNERO *Yucca* .....21

1.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....23

1.2.1. MEDIOS DE CULTIVO .....23

1.2.2. TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES .....23

1.2.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL .....24

1.2.4. PROPAGACIÓN *in vitro*.....26

1.2.5. GENERACIÓN Y CULTIVO DE TEJIDO CALLOSO.....27

1.2.6. PROPAGACIÓN *in vitro*.....28

1.2.7. APLICACIONES DEL CULTIVO *in vitro* PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....28

1.3. BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL GÉNERO *Yucca*.....29

1.3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS.....29

2. JUSTIFICACIÓN .....32

3. HIPÓTESIS .....32

4. OBJETIVOS.....33

4.1. OBJETIVO GENERAL .....33

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....33

5. METODOLOGÍA .....34

5.1. MATERIAL VEGETAL .....34

5.2. MICROPROPAGACIÓN DE *Yucca* .....34

5.2.1. GERMINACIÓN .....34

5.2.2. MULTIPLICACIÓN DE BROTES .....35

5.2.3. INDUCCIÓN DE RAÍCES .....36

5.2.4. ACLIMATACIÓN.....36

5.3. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS.....37

5.3.1. GENERACIÓN DE TEJIDO CALLOSO .....37

5.3.2. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO PARA TEJIDO CALLOSO.....39

5.3.2.1. CURVA DE CRECIMIENTO CALLOS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO 39

5.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO .....40

5.4.1. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA.....40

5.4.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (UHLPC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS) .....	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
6.1. MICROPROPAGACIÓN DE <i>Yucca</i> .....	42
6.2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS.....	43
6.2.1. <i>Y. carnerosana</i> .....	43
6.2.2. <i>Y. coahuilensis</i> .....	45
6.2.3. <i>Y. elata</i> .....	47
6.2.4. <i>Y. filamentosa</i> .....	48
6.2.5. <i>Y. filifera</i> .....	50
6.2.6. <i>Y. periculosa</i> .....	52
6.3. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO PARA TEJIDO CALLOSO .....	53
6.3.1. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Y. carnerosana</i> EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO Y LÍQUIDO .....	53
6.3.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Y. coahuilensis</i> EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO Y LÍQUIDO .....	55
6.3.3. CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Y. filifera</i> EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO .....	57
6.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO .....	58
6.4.1. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA.....	58
6.4.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (UHLPC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS) .....	59
7. CONCLUSIONES.....	68
8. BIBLIOGRAFÍA.....	69

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Compuestos identificados en algunas especies del género *Yucca* ..... 31

Tabla 2. Concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento utilizado para la formación de brotes múltiples para diferentes especies de *Yucca*. ..... 36

Tabla 3. Diseño experimental para la etapa de formación de tejido calloso..... 37

Tabla 4. Diseño experimental para la etapa de mantenimiento de tejido calloso. .... 38

Tabla 5. Fraccionamiento del extracto metanólico de corteza de *Y. filifera*..... 59

Tabla 6. Identificación de metabolitos en tejido callos, plantas *in vitro* y *ex vitro* de *Y. carnerosana* usando UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS..... 65

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Inflorescencia de *Yucca carnerosana*..... 10

Figura 2 *Yucca carnerosana*. ..... 11

Figura 3. *Yucca carnerosana*. ..... 11

Figura 4. Distribución geográfica de la especie *Yucca carnerosana*. ..... 12

Figura 5. *Yucca coahuilensis*. ..... 13

Figura 6. Distribución geográfica de la especie *Yucca coahuilensis*. ..... 14

Figura 7. *Yucca elata*. ..... 15

Figura 8. Distribución geográfica de la especie *Yucca elata*. ..... 15

Figura 9. Distribución geográfica de la especie *Yucca filamentosa*. ..... 16

Figura 10. *Yuca filamentosa*..... 17

Figura 11. *Yucca filifera*..... 18

Figura 12. Distribución geográfica de la especie *Yucca filifera*. ..... 19

Figura 13. Distribución geográfica de la especie *Yucca periculosa*. ..... 20

Figura 14. *Yucca Periculosa*. ..... 21

Figura 15. Tipos de explante de *Y. carnerosana* para la generación de tejido calloso.. ..... 44

Figura 16. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. carnerosana*..... 45

Figura 17. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. coahuilensis* a los 21 días. .... 46

Figura 18. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. coahuilensis* .....46

Figura 19. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. elata* a los 21 días.....47

Figura 20. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. elata* .....48

Figura 21. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. filamentosa* a los 21 días.....49

Figura 22. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. filamentosa* .....50

Figura 23. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. filifera* a los 21 días.....51

Figura 24. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. fillifera* .....51

Figura 25. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. periculosa* a los 21 días.....52

Figura 26. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. periculosa* .....52

Figura 27. Cinética de crecimiento de callos de *Y. carnerosana*. .....54

Figura 28. Cinética de crecimiento de callos de *Y. coahuilensis*. .....56

Figura 29. Cinética de crecimiento de callos de *Y. filifera* en medio sólido.....57

Figura 30. Separación por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de corteza de *Y. filifera*. .....58

Figura 31. Cromatogramas de UHPLC-PDA-HESI- Orbitrap-MS / MS de extractos metanólicos de *Y. carnerosana*. .....61

## RESUMEN

México es un centro de diversidad del género *Yucca* con una amplia variedad de formas. Las inmensas formas arbóreas, ocurren principalmente en las mesetas interiores, desiertos y montañas secas del norte y centro de México. Varias de estas especies alcanzan una distribución más al sur, en las zonas tropicales de México y Guatemala, se ha utilizado a lo largo de la historia y se le considera como una fuente importante de metabolitos con propiedades funcionales, se ha visto que remueve iones Pb (II) presentes en soluciones acuosas debido al contenido de ácidos y lignina; sin embargo, no se cuenta con información de un análisis fitoquímico de estas especies. El objetivo de esta investigación es establecer cultivos *in vitro* de callos de *Y. carnerosana*, *Y. coahuilensis*, *Y. filamentosa*, *Y. filifera*, *Y. elata* y *Y. periculosa*, identificar algunos compuestos fenólicos no solo en plantas *ex vitro*, sino también generar e identificar compuestos en plantas *in vitro* y en callo utilizando UHPLC junto con la espectrometría de masas de *Y. carnerosana*. Se iniciaron cultivos de callos *in vitro* a partir del tallo. El medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con diferentes concentraciones de benciladenina y ácido aminotricloropicolínico y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad fueron las condiciones óptimas para la inducción de callos. La cinética de crecimiento se caracterizó para las diferentes especies de *Yucca*. En la investigación de patrones de síntesis de los compuestos fenólicos se detectaron 128 compuestos para *Y. carnerosana in vitro*, *ex vitro* y callo y se identificaron 79 de ellos. Entre los compuestos detectados se encontraron varios ácidos fenólicos, glucósidos fenólicos y ácidos orgánicos, con lo que se contribuyó al conocimiento fitoquímico de *Y. carnerosana* para sus aplicaciones potenciales en diferentes industrias. Además, se encontraron compuestos iguales en condiciones *in vitro*, *ex vitro* y en callo, dándonos información que los tejidos generados *in vitro* son capaces de sintetizar algunos compuestos igual que en callos y que en plantas *ex vitro*.

## ABSTRACT

Mexico is a center of diversity of the genus *Yucca* with a wide variety of forms. The immense tree forms occur mainly in the interior plateaus, deserts and dry mountains of northern and central Mexico. Several of these species reach a distribution further south, in the tropics of Mexico and Guatemala, it has been used throughout history and is considered as an important source of metabolites with functional properties, it has been seen to remove Pb(II) ions present in aqueous solutions due to the content of acids and lignin; however, there is no information from a phytochemical analysis of these species. The objective of this research is to establish *in vitro* cultures of calluses of *Y. carnerosana*, *Y. coahuilensis*, *Y. filamentosa*, *Y. filifera*, *Y. elata* and *Y. periculosa*, identify some phenolic compounds not only in *ex vitro* plants, but also generate and identify compounds in plants *in vitro* and in callus using UHPLC together with mass spectrometry of *Y. carnerosana*. Callus cultures were initiated *in vitro* from the stem. The murashige & Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of benzyladenine and aminotriacetic acid and a photoperiod of 16 light hours and 8 hours darkness were the optimal conditions for the induction of calluses. The kinetics of growth were characterized for the different species of *Yucca*. In the investigation of synthesis patterns of phenolic compounds were detected 128 compounds for *Y. carnerosana in vitro*, *ex vitro* and callus and identified 79 of them. Among the compounds detected were found several phenolic acids, phenolic glycosides and organic acids, which contributed to the phytochemical knowledge of *Y. carnerosana* for its potential applications in different industries. In addition, the same compounds were found in *in vitro*, *ex vitro* and callus conditions, giving us information that the tissues generated *in vitro* are able to synthesize some compounds as in calluses and in *ex vitro* plants.

## INTRODUCCIÓN

Existen compuestos presentes en las hojas, tallos y raíces de las plantas, las cuales han tenido interés hoy en día debido a que cuentan con propiedades benéficas, hablamos de los compuestos fenólicos. Estos tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos de benceno, los compuestos fenólicos son característicos de las plantas y, como grupo, generalmente se encuentran como ésteres o glucósidos en lugar de compuestos libres (Vermerris et al., 2008). Existen diferentes maneras de clasificar a este grupo, una de ellas es en 3 familias diferentes: a) fenoles ampliamente distribuidos; b) fenoles menos distribuidos, y; c) fenoles que se presentan como polímeros (fenoles simples, ácidos fenólicos, aldehídos, acetofenoles, ácidos fenilacéticos, ácidos cinámicos, cumarinas, flavonoides, chalconas, auronas, flavanoles, flavanonoles, leucoantocianinas, flavonas, antocianinas, deoxiantocianinas, diflavonoles, benzofenoles, xantonas, estilbenos, benzoquinonas, betacianinas, lignanos, lignina, taninos, polímero fenólicos) (Vermerris et al., 2008).

La exposición a la luz ultravioleta (UV) y las quemaduras de sol incrementan la incidencia de todos los cánceres de piel (Najm, 2010), por lo que se está buscando encontrar nuevas alternativas para protegernos contra dicha radiación. Una alternativa importante es el uso de compuestos de origen natural capaces de proteger contra este impacto, como el resveratrol y estilbenos. El resveratrol es un polifenol natural presente en numerosas plantas y frutos como cacahuetes, moras, arándanos y, sobre todo, en la uva y el vino tinto. Su síntesis está condicionada por la presencia de factores estresantes, tales como la contaminación fúngica o la radiación ultravioleta. En las plantas actúa como fitoalexina, es decir, posee la capacidad de inhibir el progreso de ciertas infecciones. La medicina antigua ha utilizado extractos de plantas que contienen resveratrol desde hace más de 2 años y hace más de 30 años que se aisló y se comenzaron a estudiar sus propiedades, entre ellas cabe destacar su actividad como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio, antialérgico, etc. (Gambini et al., 2013).

El cultivo de tejidos es una técnica biotecnológica eficaz que permite la rápida producción de alta calidad, libre de enfermedades y una obtención de material uniforme de siembra en periodos de tiempo relevantemente cortos, ofreciendo ventajas distintas que no son posible con técnicas convencionales de propagación.

Esta técnica proporciona herramientas como la propagación masiva *in vitro*, que conduce a la transferencia al invernadero, así, el cultivo *in vitro* y la generación de callos podrían permitir generar varias líneas de investigación sobre metabolismo celular, mecanismos de respuesta celular a diferentes tipos de estrés, generación de embriogénesis somática, entre otros, sin necesidad de extraer especímenes de su hábitat natural, así como como el estudio y producción de compuestos en condiciones controladas. Una de las alternativas para poder obtener estos compuestos secundarios de las especies de *Yucca* spp. es la utilización de dichas técnicas biotecnológicas generando tejido calloso y cultivos en suspensión para analizar sus patrones de síntesis de compuestos fenólicos comparándolos con los de plantas de las mismas especies creciendo *ex vitro*.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. GÉNERO *Yucca*

Unas de las plantas suculentas más representativas de la flora de México son las pertenecientes al género *Yucca* (Asparagaceae) (Matuda et al., 1980). Se conocen cerca de 49 especies de *Yucca* (Rocha et al., 2006). El género *Yucca* se considera como una fuente importante de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos entre otros (Patel, 2012). Las yucas han tenido un lugar preponderante en las culturas indígenas de Norteamérica; las fibras extraídas de las hojas de las plantas fueron muy empleadas para confeccionar cuerdas, sandalias, ropa, redes y bolsas. En Arizona se han identificado restos de estas fibras con antigüedades de más de dos mil años (Webber 1953, citado por Matuda et al., 1980).

México es un centro de diversidad del género *Yucca* con una amplia variedad de formas. Las inmensas formas arbóreas, ocurren principalmente en las mesetas interiores, desiertos y montañas secas del norte y centro de México. Varias de estas especies alcanzan una distribución más al sur, en las zonas tropicales de México y Guatemala.

México también es el hogar de dos especies únicas. *Yucca endlichiana* Trel. de los desiertos del estado de Coahuila, que cuenta con hojas cortas rígidas que surgen directamente de la tierra para formar cúmulos espesos de plantas similares en apariencia a *Agave lechuguilla*.

Otra especie interesante, *Yucca lacandonica* Gómez Pompa & J. Valdés, es del estado de Chiapas, donde crece como una verdadera epífita en grandes árboles en los bosques tropicales (Irish et al., 2000). La palma samandoca (*Yucca carnerosana* [Trel.] McKelvey.) se encuentra en el norte de México y es utilizada para la extracción de una fibra dura conocida como ixtle. Los Ixtleros (personas que trabajan el ixtle), venden la mayor parte de la fibra que recogen, y la región en la que el ixtle se explota actualmente con fines comerciales se llama la Zona Ixtlera.

La fibra no vendida se convierte en cuerda y cepillos en las comunidades ixtleras y se utiliza para una variedad de propósitos. Varias partes de la lechuguilla y la palma samandoca también se emplean para satisfacer la construcción local, la limpieza y las necesidades dietéticas (Sheldon, 1980).

La especie *Yucca elata* (Engelm.) Engelm. posee fibras largas y delgadas que tienen potencial en la fabricación de papeles especiales. La mayor parte de la variación de *Y. elata* se encuentra dentro de poblaciones en las que la longitud de fibras está altamente correlacionada con el largo de las hojas. El largo de fibra no varía entre hojas de distintas edades pero sí varía dentro de una misma hoja. Las fibras ubicadas en la base de la hoja son más cortas y más anchas que las de las secciones media y distal; las fibras de las secciones distales son las más angostas (McLaughlin, 1992).

La *Yucca filifera* Chabaud, presenta un periodo reproductivo durante el cual comienza en febrero, alcanzando su máxima producción en marzo y abril, finalizando en mayo (Cantú 2003). Esta especie se ha utilizado desde hace muchos años (periodo histórico) para la producción de canastas tradicionales de Coahuila y en los condados de San Diego y de Riverside en el sur de California (Pearlstein, 2008). Las plantas se han utilizado durante miles de años para curar enfermedades (Efferth, 2018). En el caso del género *Yucca* ha tenido diferentes usos, debido a sus propiedades particulares que tiene cada especie, que va desde lo cosmético hasta lo farmacéutico.

### 1.1.1. DESCRIPCIÓN DE *Yucca carnerosana* (Trel) McKelvey

La *Yucca carnerosana* crece solitaria, formando tallos con una altura 2-8 m, teniendo una base del tallo 0.4 m de diámetro, raramente con ramas irregulares. Las hojas rígidas variables, de color verde azulado, forman fibras en los bordes de las hojas. La inflorescencia vertical, que comienza por encima de las hojas, tiene 1-2 m de altura, las flores son de color blanco a verde, 65-100 mm de largo y 10-20 mm de ancho. Período de floración: marzo a abril. Maduración de semillas: mayo a junio. *Yucca carnerosana* es similar a *Yucca torreyi*, pero las rosetas parecen menos compactas. La especie es resistente a las heladas a menos 20°C. Se pueden admirar especímenes antiguos en Belén y Albuquerque, Nuevo México. Las plántulas de cuatro años alcanzan una altura de 20 cm (Hochstätter Fritz et al., 2002).



**Figura 1. Inflorescencia de *Yucca carnerosana*. Galindo-Leal Carlos. 27 de Mayo 2015. Cuenca de Libres-Oriental, DF, México. Latitud: 19.553675, longitud: -97.493525 y precisión: 31m. <https://www.naturalista.mx/taxa/270699-Yucca-carnerosana>**



**Figura 2 *Yucca carnerosana*. López- Domínguez Juan Carlos. 13 Agosto 2017. San Pedro Cholula, Puebla, México. Latitud: 19.078597 y longitud: -98.382361.  
<https://www.naturalista.mx/taxa/270699-Yucca-carnerosana>**



**Figura 3. *Yucca carnerosana*. Camino Real de 14, San Luis Potosí, México.  
<https://www.consumer.es/medio-ambiente/yucca-carnerosana.html>**



Figura 4. Distribución geográfica de la especie *Yucca carnerosana*. Los colores muestran la ubicación donde han encontrado esta especie. <https://www.naturalista.mx/taxa/281054-Yucca-carnerosana>

### 1.1.2. DESCRIPCIÓN DE *Yucca coahuilensis* Matuda & I.L. Pina

*Yucca coahuilensis* crece de forma solitaria y no tiene tronco. Las hojas flexibles, similares a hierba, flexibles, finamente fibrosas, de color verde a azul verdoso, miden entre 40 y 80 cm de largo y 1,5 cm de ancho. La inflorescencia ramificada que comienza en las hojas sobresale mucho más allá de las hojas y alcanza una altura de 1.5-2.5 m. Flores colgantes, acampanadas, de color blanco a crema, de 15-30 mm de largo con un diámetro de 15 mm. Periodo de floración: abril a junio. Crece en el norte de México (Hochstätter Fritz et al., 2004).

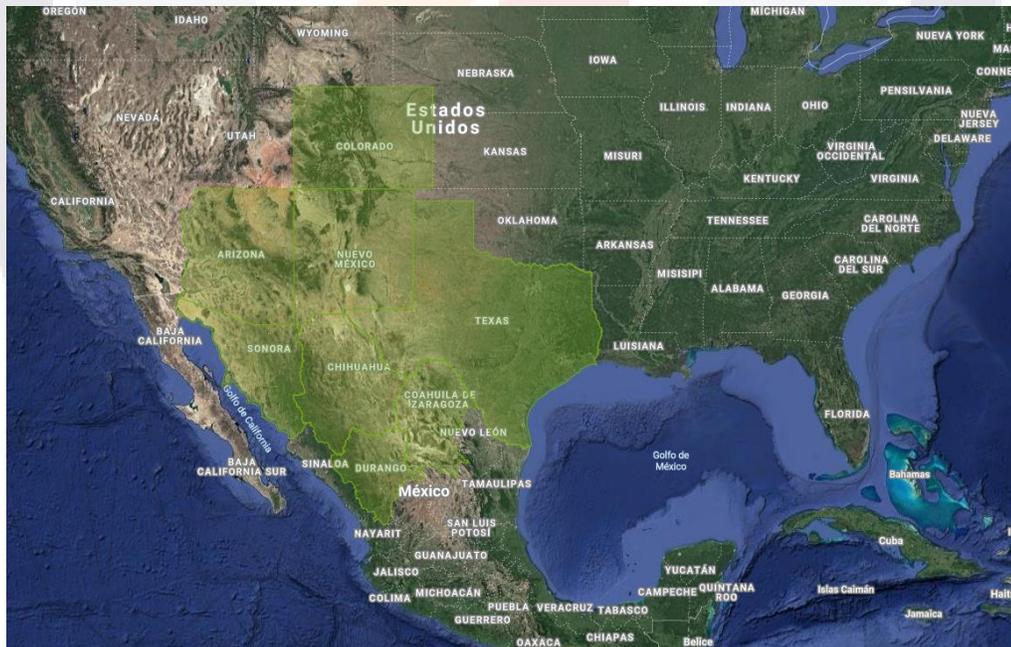


**Figura 5. *Yucca coahuilensis*. Nevárez Manuel. 3 de Junio 2010. Hermanas Coahuila. Desierto Chihuahuense. Latitud: 27.220117 y longitud: -101.216899**





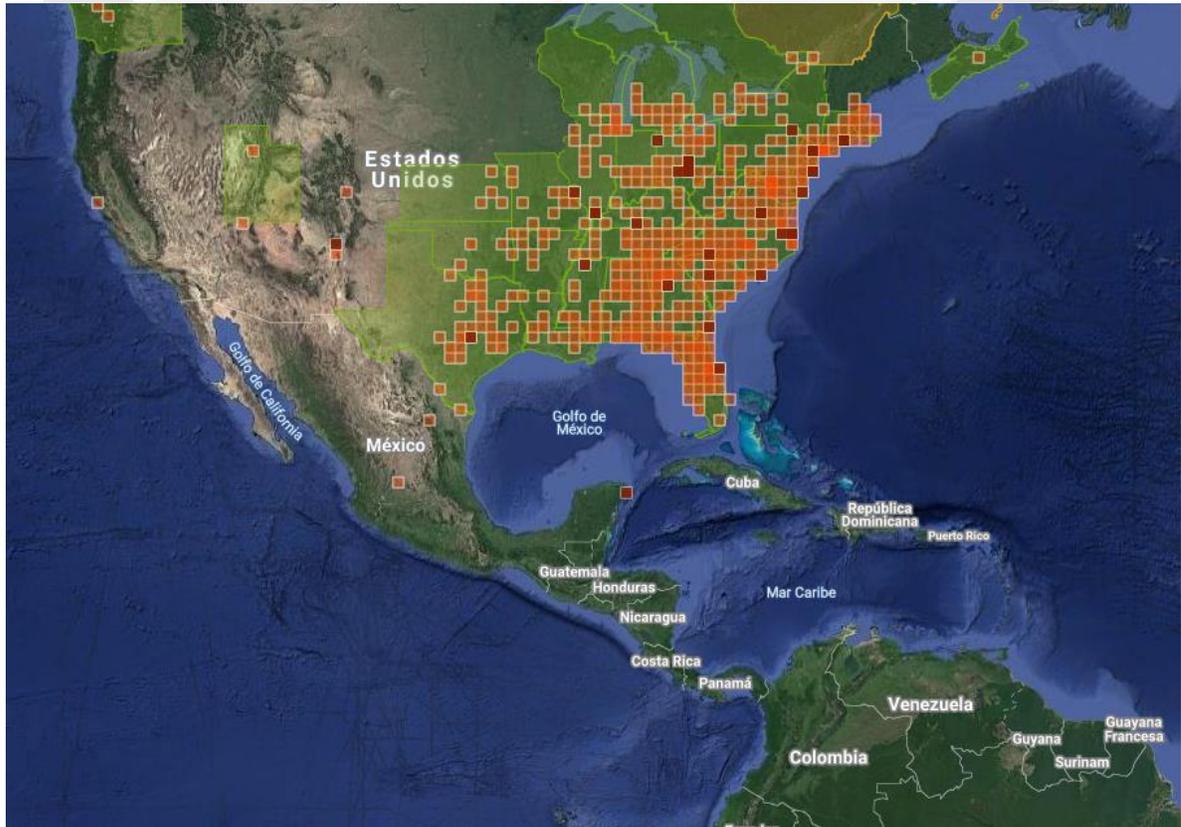
**Figura 7. *Yucca elata*. Balam Aaron. 21 de Mayo del 2016. Desierto de Chihuahua. Latitud: 31.468643, longitud: -106.490049 y precisión: 4.51km**



**Figura 8. Distribución geográfica de la especie *Yucca elata*. Arizona, Nuevo México, Texas, Noroeste y Noreste de México. Los colores muestran la ubicación donde han encontrado esta especie. <https://www.naturalista.mx/taxa/170387-Yucca-elata>**

**1.1.4. DESCRIPCIÓN DE *Yucca filamentosa* L**

*Yucca filamentosa* crece de forma solitaria y no tiene tronco o forma grupos tupidos. Las fibras se pueden encontrar en los bordes de las hojas de verde a azul verdoso, rugosas en la parte inferior, de 20 a 60 cm de largo, inflorescencia ramificada de 2-3 m de altura, flores de color crema blanca en forma de campana de 40-80 mm de largo y ancho. Periodo de floración junio a julio, madurez de la semilla: agosto a septiembre (Hochstätter Fritz et al., 2002). Se han encontrado en el este de Estados Unidos en las regiones montañosas del azul Ridges, Great Smoky Mountains, Apalachian Mountains, Pockono Mountains, crece en la región costera atlántica en los estados de Florida, Georgia, Virginia, Carolina del Norte y Carolina del Sur en llanuras en suelo arenoso, pastizales y en los bordes de bosques a nivel del mar (Hochstätter Fritz et al., 2002).



**Figura 9. Distribución geográfica de la especie *Yucca filamentosa*. Los colores muestran la ubicación donde han encontrado esta especie. <https://www.naturalista.mx/taxa/81605-Yucca-filamentosa>**



**Figura 10. *Yuca filamentosa* A) Semillas de *Yuca filamentosa*. B) Planta de *Y. filamentosa* en Florida. John C. 25 de Octubre del 2019. Levy, Florida, United States. Latitud: 29.536111, longitud: -82.635.**

Las raíces de la *Y. filamentosa* se han utilizado para el tratamiento de trastornos glandulares, del hígado y de la vesícula biliar; en dolores de cabeza biliosos acompañados de lengua amarilla; en el desaliento y la irritabilidad (Khare 2007). Las hojas contienen saponinas esteroidales, sarsasapogenina, gitogenina, tigogenina, diosgenina, kammogenina, yuccagenina, hecogenina, manogenina, mexogenina, chlorogenina y smilagenina. Los rizomas contienen principalmente sarsasapogenina (Khare 2007). Además se han aislado dos glicósidos de las raíces de *Y. filamentosa* L. uno de ellos es trillina, y el segundo - yucósido B - 3-0- [galactopiranosil - 1 (i - \* 4) - glucopiranosil] tigogenina (Dragalin, 1975).

#### **1.1.5. DESCRIPCIÓN DE *Yucca filifera* Chabaud**

La *Yucca filifera* crece solitaria, forma un tronco y crece hasta una altura de 10-15 m. Con hasta 50 ramas, es una de las especies más inusuales del género. Las rosetas variables son de 0.4-0.8 m de ancho. Hojas, verdes, rígidas, ásperas, de 40-80 cm de largo, márgenes foliares formando fibras, punta espina, marrón a gris, puntiaguda, fuerte. La inflorescencia caída y ramificada es de 1-1.5 m de largo. Flores, blancas a blanquecinas, esféricas a acampanadas, 30-65 mm de largo, 15-25 mm de ancho. Frutos en cápsula, redondos a oblongos, 30-50 mm de largo, 15-20 mm de ancho. Semillas negras, variables, planas a esféricas, 5 mm de largo y ancho, 1 mm de grosor. Período de floración de marzo a julio, crece en el centro y oriente de México. El área de distribución principal se encuentra en el desierto de Chihuahua en los

estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Tamaulipas, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo y Michoacán en diferentes tipos de suelo, en llanuras o en laderas pedregosas a una altitud de 500-2600 m. La especie puede confundirse con *Yucca valida* y *Yucca periculosa*. *Yucca filifera* tiene una de las áreas de distribución más grandes del género. El tallo caído es típico. La *Yucca filifera* es resistente a heladas de al menos 15 ° C.



**Figura 11. *Yucca filifera*. Vant Patrick. 18 de Mayo 2019. Carretera Alto de Guadalupe, Galeana, Nuevo León, México. Latitud: 24.885322, longitud: -100.179838 y precisión: 3m**



**Figura 12. Distribución geográfica de la especie *Yucca filifera*. Los colores muestran la ubicación donde han encontrado esta especie. <https://www.naturalista.mx/taxa/290831-Yucca-filifera>**

**1.1.6. DESCRIPCIÓN DE *Yucca periculosa* Baker**

La *Yucca periculosa* crece de manera solitaria, en forma de árbol y ramificada hasta una altura de 4-8 m. Las rosetas son variables tienen 0.3-0.8 m de ancho. Hojas verdes, flexibles, lisas, lineales a lancetas, de 50-70 cm de largo, 3 cm de ancho, márgenes de las hojas variablemente fibrosos, mandril marrón, puntiagudo. La inflorescencia densa, amplia y paniculada que comienza entre las hojas se convierte en 0.8-1.2 m de largo. Flores fragantes, blancas, de color crema, con forma de campana de 30-45 mm de largo, 20-30 mm de ancho. Frutos carnosos, marrones, caídos, oblongos en forma de huevo, 60-100 mm de largo, 10-30 mm de ancho. Semillas negras, variables, planas, esféricas, finamente estructuradas, 6 mm de largo y ancho, 1 mm de grosor. Período de floración: abril a julio. Es resistente a heladas a menos 15 ° C.

En los extractos metanólicos obtenidos de la corteza de la *Y. periculosa* se identificaron tres compuestos, el trans-3,3', 5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (MS), el resveratrol y la naringenina, se descubrió que estos compuestos tienen un efecto foto-protector. En dicho estudio se utilizó como modelo biológico a la bacteria *Escherichia coli*, a la cual se le sometió

a radiación UV durante cierto periodo, los resultados obtenidos demostraron que el MS y el resveratrol poseen mayores propiedades foto-protectoras, éstas poseen un factor de protección solar (FPS) mayor que el octil metoxicinnamato OMC, el cual es un filtro solar comercial que se utiliza en la actualidad (García-Bores 2010).

En los extractos de metanol obtenidos de la corteza de *Y. periculosa* se encontró el 3,3', 5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno, el cual tiene una actividad reguladora del crecimiento contra el gusano oruga militar o cogollero, *Spodoptera frugiperda*, una plaga del cultivo de maíz. Los compuestos presentes tienen efectos selectivos sobre el metabolismo de preemergencia del insecto (Torres et al., 2003).

Además de ese uso que se le ha dado a la *Y. periculosa*, se ha descubierto que tiene diferentes actividades biológicas como, antibacteriano, antifúngico y antioxidante (Hernández 2015).



Figura 13. Distribución geográfica de la especie *Yucca periculosa*. Los colores muestran la ubicación donde han encontrado esta especie <https://www.naturalista.mx/taxa/281054-Yucca-periculosa>



**Figura 14. *Yucca Periculosa*. Soriano-Flores Leticia. 21 de Noviembre del 2018. San Martín del Valle. Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Latitud: 18.312783, longitud: -97.519231 y precisión: 252m.**

#### **1.1.7. FITOQUÍMICA DEL GÉNERO *Yucca***

Existen compuestos de gran interés presentes en las hojas de las plantas del género *Yucca*, un grupo importante de estos compuestos son los llamados polifenoles, los cuales se ha visto que tienen propiedades benéficas. Estos son compuestos que tienen más de un grupo hidroxilo fenólico unido a uno o más anillos de benceno, los compuestos fenólicos son característicos de las plantas y, como grupo, generalmente se encuentran como ésteres o glucósidos en lugar de compuestos libres (Vermerris et al., 2008). Existen diferentes maneras de clasificar a este grupo, una de ellas es la propuesta por Ribéreau-Gayon (1972), que divide a estos compuestos en 3 familias diferentes: a) fenoles ampliamente distribuidos; b) fenoles menos distribuidos, y; c) fenoles que se presentan como polímeros (fenoles simples, ácidos fenólicos, aldehídos, acetofenoles, ácidos fenilacéticos, ácidos cinámicos, cumarinas, flavonoides, chalconas, auronas, flavanoles, flavanonoles, leucoantocianinas, flavonas, antocianinas, deoxiantocianinas, diflavonoles, benzofenoles, xantonas, estilbenos, benzoquinonas, betacianinas, lignanos, lignina, taninos, polímero fenólicos) (Vermerris et al., 2008).

El resveratrol es un polifenol natural presente en numerosas plantas y frutos como cacahuetes, moras, arándanos y, sobre todo, en la uva y el vino tinto. Su síntesis está condicionada por la presencia de factores estresantes, tales como la contaminación fúngica o la radiación ultravioleta. En las plantas actúa como fitoalexina, es decir, posee la capacidad de inhibir el progreso de ciertas infecciones. La medicina antigua ha utilizado extractos de plantas que contienen resveratrol y hace más de 30 años que se aisló y se comenzaron a estudiar sus propiedades, entre ellas cabe destacar su actividad como anticancerígeno, antiagregante plaquetario, antiinflamatorio, antialérgico, etc. (Gambini et al., 2013).

Otro compuesto es el estilbeno, su estructura está representada por dos anillos fenilo unidos entre sí mediante un puente de dos átomos de carbono (puente eteno). Se encuentran en un grupo relativamente pequeño de especies (pino, vid, maní entre otras) y muestra una diversidad interesante de actividades biológicas. Particularmente, se le ha visto que tiene propiedades anti fúngicas (Ringuelet et al., 2013). Una de las especies que contienen estos metabolitos secundarios de gran importancia, son las pertenecientes al género *Yucca*. Se han realizado cultivos *in vitro* de *Yucca periculosa*, identificando al trans-3,3', 5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno (MS) y al resveratrol y se ha visto que además de todo lo anterior posee efectos foto-protectores mayores que el octil metoxicinnamato (OMC) el cual es un filtro solar comercial (García-Bores, 2010). La *Yucca shidigera* la cual contiene yuccaol A, B y C (Marzocco et al., 2004), también se ha visto que contienen saponinas esteroidales y resveratrol, las cuales han sido identificados como los principios activos de acciones biológicas (antitumoral, antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatorio, anti-artrítico, anti-diabético, anti-levaduras) (Atel, 2012). El extracto de metanol de la corteza de *Yucca periculosa* contiene 4,4'-dihidroxiestilbeno, resveratrol y 3,3', 5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno la cual tiene actividad reguladora del crecimiento contra la larva *Spodoptera frugiperda*, *Lepidoptera: Noctuidae*, una plaga de insectos del maíz (Torres et al., 2003). La *Yucca aloifolia* tiene un alto contenido de ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico mostrando que el biodiésel obtenido del aceite de esta especie se podría usar como combustible (Nehdia et al., 2015; Nakashima et al., 2016). Los extractos de etanol y de hexano de *Yucca carnerosana* demostraron actividad inhibidora en diferentes porcentajes

frente al desarrollo de *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium digitatum* (Cespedes et al., 2015).

## **1.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES**

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que comprende el mantenimiento de plantas o componentes de estas en condiciones ambientales controladas, ausencia de microorganismos, nutrición heterotrófica y en recipientes de plástico o vidrio; que ha sido utilizado en muchos aspectos del desarrollo agrícola y la investigación vegetal. El establecimiento exitoso de plantas, o partes de estas, ha permitido desarrollar técnicas alternativas de manejo agronómico que han revolucionado los sistemas de producción agrícola, y en algunos casos ha posibilitado la aplicación de ciertos métodos que sin el desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* sería imposible ejecutarlos (Suárez-Padrón 2020).

### **1.2.1. MEDIOS DE CULTIVO**

El primer reporte conocido de un cultivo de tejidos vegetales fue consignado por Henri-Louis Duhamel du Monceau, Agrónomo e inspector general de la marina francesa (Arditi, 2008). El desarrollo de formulaciones que proporcionaran el medio de cultivo ideal para el crecimiento de los cultivos aislados y cultivados en condiciones *in vitro* están basados en cantidades relativamente bajas de sales. Murashige y Skoog (1962) estudiaron de forma detallada los requerimientos minerales de cultivos celulares de tabaco, obteniendo una formulación con mayores cantidades de sales. El alto contenido de  $\text{NO}_3$  y  $\text{NH}_4$  permitió que los tejidos tuvieran tasas de crecimiento hasta 25 veces superiores a las obtenidas hasta ese momento con otras formulaciones. En la actualidad, el medio de Murashige y Skoog es el más utilizado en el cultivo de tejidos vegetales a nivel mundial (Suárez-Padrón 2020).

### **1.2.2. TIPOS DE CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES**

La micropropagación de plantas permite la propagación clonal masiva de plantas en espacios reducidos y obteniendo tasas de multiplicación inimaginables bajo condiciones normales de multiplicación de propágulos asexuales, la de producir plantas sanas a partir de material infectado con contaminantes sistémicos. El cultivo de protoplastos facilita la inserción de moléculas o componentes en el citoplasma celular que son imposibles de introducir en tejidos

o células intactas. El cultivo de porciones caulinares, células de callo o embriones somáticos facilita el almacenamiento de recursos genéticos de deterioros naturales y amenazas ambientales. Las mismas estrategias ofrecen la posibilidad de convertirse en fuentes alternas de generación por métodos tradicionales de mejoramiento vegetal y la posibilidad de regenerar plantas a partir de células de forma individual es condición indispensable para recuperar plantas que se originan por procedimientos de transformación genética (Suárez-Padrón 2020).

### **1.2.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL**

Los reguladores de crecimiento de las plantas son hormonas naturales y análogas de hormonas sintéticas que tienen la capacidad de influir en la división celular, la expansión celular y la estructura y función celular, además de mediar el estrés ambiental (Small et al. 2018). Estos reguladores son los componentes críticos de los medios para determinar el patrón de desarrollo de las células vegetales (Rastogi, 2007). Se ha demostrado que la aplicación directa a raíces de plantas, brotes, hojas, brotes y flores aumenta la resistencia al estrés abiótico y biótico, rompe la latencia de las semillas, mejora la tolerancia a la sequía y la eficiencia del uso del agua, mejora la tolerancia a la temperatura, mejora la eficiencia del uso de nitrógeno, promueve la elongación de los brotes y la generación, aumenta la masa de los brotes y las raíces, estimula el crecimiento de las raíces y el desarrollo lateral de las raíces, y promueve la fotosíntesis (Small et al., 2018). Existen cinco clases principales de reguladores del crecimiento de las plantas utilizados en el cultivo de células vegetales: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Rastogi, 2007). Los medios de cultivo enriquecidos con reguladores de crecimiento se consideran como clave para el desempeño de funciones vitales en el alargamiento del tallo, el tropismo y el dominio apical (Saad et al., 2012).

Para regenerar con éxito una planta a partir de células individuales es necesario añadir reguladores de crecimiento al sustrato de nutrientes. Estas controlan el crecimiento y las diferenciación de las células vegetales: las auxinas regulan el crecimiento de la raíz y, además se ocupan de que solo salgan los capullos situados en la parte más alta de una planta. Por el contrario, las citocininas inducen el crecimiento de los brotes e inhiben de este modo el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

crecimiento de la raíz. La proporción entre citocininas y auxinas es decisiva (Renneberg 2009). La combinación de estas dos hormonas que promueven el crecimiento, auxina y citoquinina, han logrado obtener la inducción de callo en plantas *in vitro* (Ikeuchi et al., 2013). Los productos obtenidos al utilizar reguladores de crecimiento se usan comúnmente en la agricultura, la viticultura y la horticultura para mejorar el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos en condiciones ambientales y de suelo no ideales. Su uso puede mejorar el éxito de la recuperación al aumentar el crecimiento de plantas nativas de crecimiento lento y de plántulas y esquejes trasplantados; promover el desarrollo de comunidades bacterianas del suelo (incluidas las rizobacterias); potenciar el crecimiento de las plantas en condiciones ambientalmente estresantes; y, el aumento de la adaptación y la resistencia durante el cambio climático. Existen oportunidades significativas para el desarrollo de semillas, la propagación de plantas y la bioingeniería en América del Norte, tanto para aplicaciones basadas en invernaderos como en aplicaciones de campo (Small et al., 2018).

Las auxinas promueven el crecimiento de las plantas debido a un aumento de la expansión celular de acuerdo a la hipótesis del “efecto ácido”, las cuales estimulan la actividad de la bomba de protones ( $H^+$ -ATPasa) que se encuentra en la membrana plasmática a través de dos mecanismos: activación de las bombas preexistentes y por inducción de síntesis de nuevas  $H^+$ -ATPasas. La extracción de protones hacia la pared celular genera una reducción del pH acidificandola, lo que a su vez activa proteínas que rompen enlaces de hidrógeno entre los constituyentes de la pared. Los candidatos más probables para este papel inicial son las expansinas, proteínas de pared que favorecerían inicialmente a la plasticidad de la célula. Otras enzimas hidrolíticas actuarían posteriormente y la célula crecería como resultado de la presión de turgor generada por la vacuola y por el depósito de nuevos materiales, cuya síntesis y transporte también parecen ser regulados por auxinas.

Las auxinas también inducen la síntesis de giberelinas, hormonas que promueven el crecimiento del tallo, por lo que las auxinas también estimularían el crecimiento en forma indirecta (Jordán et al., 2006). Los lugares más importantes de síntesis de auxinas son las hojas jóvenes en expansión, el tejido cambial, los ovarios inmaduros semillas en desarrollo.

Sin embargo, otros tejidos también tienen la capacidad de sintetizar AIA (hojas maduras, tallos y raíces). Se ha propuesto la hipótesis basada en que los lugares de síntesis activa de auxinas están asociadas con la muerte de las células, ya sea durante la diferenciación vascular, la digestión del endospermo o la senescencia de las hojas. El triptófano es el factor limitante para la síntesis de auxinas y el nivel del triptófano en células vivas es normalmente demasiado bajo para que haya síntesis. Al morir la célula se libera triptófano mediante autólisis de las proteínas, lo que hace que aumente la concentración de triptófano y pueda llevarse a cabo la síntesis de AIA (Carrillo, 2005). Entre los compuestos análogos a las auxinas, sintetizados en el laboratorio, están el ácido naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y el picloram. En el cultivo de tejidos *in vitro*, los más usados son el IBA y el ANA en la micropropagación de meristemos y organogénesis. El 2,4-D y el picloram tienen efectos más fuertes, por lo que son utilizados en la inducción de tejidos embriogénicos (Suárez-Padrón 2020).

Las citocininas se encuentran tanto en el apoplasto como en el simplasto, de manera que se asume la existencia de transportadores específicos a este nivel. Se ha demostrado que estas hormonas son primero percibidas por proteínas histidina-quinasa y que la transducción de la señal por ellas provoca una fosforilación en su porción conservada y con transferencia del grupo fosforilo a un regulador de respuesta más distante, regula a su vez la cascada de señales. La primera de estas proteínas tipo histidina-quinasa fue identificada en *Arabidopsis*, citokinin-quinasa (CKII), la que al ser sobre expresada en *Arabidopsis* produce efectos típicos asociados a citocininas en ausencia de estas hormonas (Jordán et al., 2006). Naturalmente, la zeatina y el 2-isopentenil adenina (2iP) son sintetizadas por la planta, pero en el comercio se pueden encontrar sustitutos como la benzilaminopurina (BAP o BA), la kinetina y el tiazuron (TDZ). De todos estos compuestos, BA es la más utilizada en cultivo *in vitro*, especialmente en la multiplicación de meristemos pre-existentes y organogénesis (Suárez-Padrón 2020).

#### **1.2.4. PROPAGACIÓN *in vitro***

La primera aplicación comercial de las técnicas de cultivo de tejidos resultó de la publicación de Ernest Ball relacionada con la propagación sostenida de plantas *in vitro* (Ball, 1946). El

trabajo consistió en la identificación de meristemos apical y axilar como los explantes ideales para desarrollar una planta completa. Este avance vino a convertirse en el método de micropropagación a partir de explantes con meristemos pre-existentes, el cual es el más utilizado en la micropropagación comercial moderna para la producción masiva de plantas en condiciones *in vitro* (Suárez-Padrón, 2020).

### **1.2.5. GENERACIÓN Y CULTIVO DE TEJIDO CALLOSO**

Cuando las células de las plantas y el tejido se cultivan *in vitro*, generalmente muestran un grado muy alto de plasticidad, lo que permite iniciar un tipo de tejido u órgano de otro tipo. De esta forma, toda la planta puede regenerarse posteriormente. Esta regeneración de organismos completos depende del concepto de que todas las células planificadas pueden, dados los estímulos correctos, expresar el potencial genético total de la planta original. Este mantenimiento del potencial genético se llama totipotencia (Rastogi, 2007). Las condiciones exactas requeridas para iniciar y mantener células de plantas en cultivo, o para regenerar plantas intactas a partir de células cultivadas, son diferentes para cada especie de planta. El enfoque empírico ha demostrado que tres factores, a saber, la elección del explante, la composición del medio y el control del entorno físico son importantes en los cultivos exitosos. Cuando los medios de cultivo de plantas completamente definidos no dieron los resultados deseados, el empleo de sustancias naturales tiene efectos beneficiosos en cultivos de células y tejidos de plantas *in vitro* (Molnár et al., 2011). El crecimiento óptimo y la morfogénesis de los tejidos pueden variar para diferentes plantas de acuerdo con sus requerimientos nutricionales. Además, los tejidos de diferentes partes de las plantas también pueden tener diferentes requisitos para un crecimiento satisfactorio (Abobkar et al., 2011). Los tejidos dañados que crecen en forma desorganizada se conocen en las plantas como callos (Bhatia et al., 2015). Las plantas desarrollan masas celulares no organizadas como callos y tumores en respuesta a diversos estímulos bióticos y abióticos (Ikeuchi et al., 2013).

En las plantas se forman en la superficie cortada de los esquejes. Los callos se pueden introducir en agar como cultivos superficiales para luego seguirlos cultivando como grumos celulares no des-diferenciados, o bien, añadiendo hormonas de crecimiento, se obtienen nuevas plantas completas. Una posibilidad especial de reproducir (Renneberg, 2009). Los

avances más significativos en el cultivo de callos fueron publicados de forma independiente y simultánea por Pierre Nobercourt, Philip White y Roger Gauthereith (Nobercourt, 1938; Gautheret, 1939; White, 1939). Nobercourt utilizó explantes consistentes de discos de raíces de zanahoria, mientras que White estableció tejidos originados en tumores de un híbrido de *Nicotiana glauca* x *Nicotiana langsdorffii*. Además de utilizar explantes de zanahoria, Gauthereith utilizó tejido cambial de diversas especies y observó el dinámico crecimiento de estos. Con el fin de mejorar las posibilidades de supervivencia y subcultivo de los tejidos adicionó por primera vez una hormona aislada (ácido indolacético) al medio de cultivo, lo cual incrementó la proliferación del callo inducido e inició una nueva era en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Suárez-Padrón, 2020).

La biotecnología en el área de las plantas ha alcanzado terrenos inesperados, la aplicación de la bioingeniería en la generación de callos y de cultivos en suspensión ofrecen una amplia gama de usos. Al aplicar técnicas biotecnológicas se ha podido generar tejido caloso y con ello la síntesis de metabolitos secundarios. Aunque aún no se ha explotado todo el potencial de la tecnología de cultivo de callos, ha llegado el momento de desarrollar y comercializar más productos basados en cultivos de callos (Efferth, 2018.)

#### **1.2.6. PROPAGACIÓN *in vitro***

#### **1.2.7. APLICACIONES DEL CULTIVO *in vitro* PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

Se ha encontrado que *Yucca schidigera* contiene yuccaol A, B y C, este último se ha visto que tienen efecto antiinflamatorio (Marzocco et al., 2004). *Yucca filamentosa* y *Yucca schidigera* contienen saponinas esteroidales y resveratrol, las cuales han sido identificados como los principios activos con acciones biológicas (antitumoral, antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, anti-artrítico, anti-diabético, anti-levaduras) (Patel, 2012). El extracto de metanol de la corteza de *Yucca periculosa* contiene 4,4'-dihidroxiestilbeno, resveratrol y 3,3', 5,5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno, y ha mostrado actividad reguladora del crecimiento contra la larva *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), una plaga del maíz (Torres et al., 2003). La *Yucca aloifolia* tiene un alto contenido de ácido linoleico, ácido oleico y

ácido palmítico, por lo que el biodiésel obtenido del aceite de esta especie se podría usar como combustible (Nakashima et al., 2016).

Los extractos etanólicos y hexanólicos de *Yucca carnerosana* demostraron actividad inhibidora frente al desarrollo de *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium digitatum* (Cespedes et al., 2015), además se ha encontrado que remueve iones Pb (II) presentes en soluciones acuosas debido al contenido de ácidos y lignina (Medellín-Castillo et al. 2017). Debido a lo anterior ha surgido un gran interés por aprovechar estas especies. En la actualidad se comercializan como cápsulas, bebidas o polvos (Patel, 2012), sin tener la caracterización fitoquímica de esos extractos. Esto ha favorecido que las poblaciones disminuyan, por lo que se debe emplear enfoques biotecnológicos para la producción sostenible de biomasa vegetal y su contenido fitoquímico. El cultivo de tejidos vegetales puede ofrecer una herramienta muy eficaz para mejorar la producción de metabolito secundarios (Khan et al. 2019). Esta técnica ofrece herramientas como la propagación masiva *in vitro*, la cual ya se ha reportado para especies como *Yucca elephantipes* utilizando citocininas y auxinas para su enraizamiento (Pierik et al., 1983), *Yucca glauca* elaborando un sistema de micropropagación para facilitar la liberación de flores (Bentz et al., 1988), *Yucca aloifolia* multiplicando brotes por medio de thidiazurón y ácido indól acético (Atta-Alla et al., 1997), *Yucca valida* utilizando un método de micropropagación para generar líneas isogénicas o clonales (Arce-Montoya et al., 2006), *Yucca coahuilense*, *Yucca filamentosa* y *Yucca periculosa* desarrollando un sistemas de propagación *in vitro* comenzando por semillas utilizando reguladores de crecimiento (López-Ramírez et al., 2018). Por otro lado, el cultivo *in vitro* y la generación de callo podría permitir el estudio y la obtención de compuestos secundarios de la especie *Y. carnerosana* sin la necesidad de extraer ejemplares de su hábitat natural.

### **1.3. BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL GÉNERO *Yucca***

#### **1.3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS**

Las plantas son una fuente de obtención de compuestos benéficos para la humanidad, el uso de plantas medicinales se ha visto a lo largo de la historia, sin embargo hace solo 200 años se logró aislar el primer componente químico activo, el cuál es el responsable del efecto farmacológico que tienen las plantas medicinales (Häkkinen et al., 2012). Los metabolitos secundarios incluyen alcaloides, glucósidos, flavonoides, aceites volátiles, taninos, resinas, etc. Estos no solo desempeñan un papel vital en la defensa de las plantas contra los herbívoros y otras defensas inter especies, sino que también son medicamentos. Muchos de los medicamentos que se venden en la actualidad son simples modificaciones sintéticas de las sustancias obtenidas de forma natural (Jamwal et al., 2018). Alrededor del 25% de los medicamentos son derivados de plantas (Davey, 2017).

Actualmente, la mayoría de estos metabolitos secundarios se aíslan de plantas silvestres o cultivadas debido a que su síntesis química es extremadamente difícil o económicamente imposible. La producción biotecnológica en cultivos de células vegetales es una alternativa atractiva, pero hasta la fecha solo ha tenido un éxito comercial limitado debido a la falta de comprensión de cómo se sintetizan estos metabolitos (Namdeo, 2007; Jamwal et al., 2018). A continuación se muestran diferentes compuestos aislados de *Yucca* (Tabla 1).

Tabla 1. Compuestos identificados en algunas especies del género *Yucca*

NOMBRE DE LA ESPECIE/PARTE	COMPUESTO	RELACION MASA CARGA m/z	REFERENCIA
<i>Yucca filamentosa</i> (hoja)	3-O-((β-D-glucopiranosil-(1→3)	Sin relación m/z	Plock A. et al., 2001
	β-D-glucopiranosil-(1→2))	Sin relación m/z	Plock A. et al. 2001
	(α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)	Sin relación m/z	Plock A. et al. 2001
	β-D-glucopiranosil-(1→3))	Sin relación m/z	Plock A. et al. 2001
	β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil)-25R,	Sin relación m/z	Plock A. et al. 2001
	5α-espirostan-2α, 3β-diol	Sin relación m/z	Plock A. et al. 2001
<i>Yucca filamentosa</i> (Raíces)	sarsasapogenina	Sin relación m/z	Khare 2007
	(glucósido) Trillina	Sin relación m/z	<a href="#">Dragalin1975</a>
	(glucósido) yucósido B - 3-O- [galactopiranosil - 1 (i - * 4)		<a href="#">Dragalin1975</a>
	- glucopiranosil] tigogenina	Sin relación m/z	
	Yuccoside B	Sin relación m/z	<a href="#">Kintys P.K. 1972.</a>
<i>Yucca periculosa</i> (corteza)	trans-3,3', 5,5'-tetrahidroxi-4'-metoxiestilbeno (MS)	Sin relación m/z	García-Bores 2010
	Naringenina	Sin relación m/z	García-Bores 2010
	Resveratrol	Sin relación m/z	García-Bores 2010
	4,4'.dihidroxi estilbeno	Sin relación m/z	Torres P. 2003.
	Estilbeno (resveratrol)	Sin relación m/z	Torres P. 2003.
	3,5,3',5'-tetrahidroxi-4-metoxi- estilbeno	Sin relación m/z	Torres P. 2003.
<i>Yucca schidigera</i> (raíces)	(Glucósido) sarsasapogenin	Sin relación m/z	Kaneda et al.,1987
	(glucósido) markogenin	Sin relación m/z	Kaneda et al.,1987
	(alcaloides esteroidales) smilagenin	Sin relación m/z	Kaneda et al.,1987
	(alcaloides esteroidales) samogenin	Sin relación m/z	Kaneda et al.,1987
	(alcaloides esteroidales)	Sin relación m/z	Kaneda et al.,1987
	(polifenólicos) resveratrol	Sin relación m/z	Cheeke et al., 2006
	(polifenoles) yuccaols	Sin relación m/z	Cheeke et al., 2006
	Saponinas esteroidales	Sin relación m/z	Cheeke et al., 2006
<i>Yucca periculosa</i>	4,4'.dihidroxi estilbeno	Sin relación m/z	Torres P. 2003.
	Estilbeno (resveratrol)	Sin relación m/z	Torres P. 2003.
	3,5,3',5'-tetrahidroxi-4-metoxi- estilbeno	Sin relación m/z	Torres P. 2003.
<i>Yucca schidigera</i> Roezl	Compuesto relacionado con saponina esteroidea	[M-H] - a m / z 1065.5119 (C 50 H 82 O 24 , Δ ppm 0.86 ppm)	Tenon M. 2016.
	Compuesto relacionado con saponina esteroidea	[M - H] - en m / z 1051.5356 (C 50 H 84 O 23 Δ ppm 2.09 ppm)	Tenon M. 2016.
	Compuesto relacionado con saponina esteroidea	[M - H] - en m / z 1033.5250 (C 50H 82 O 22 Δ ppm 1.27 ppm)	Tenon M. 2016.
	Compuesto relacionado con saponina esteroidea	[M + COOH] - a m / z 931.4585 (C 44 H 70 O 18 Δppm 4.4 ppm)	Tenon M. 2016.
	Compuesto relacionado con saponina esteroidea	[M - H] - a m / z 871.4681 (C 44 H 72) O 17 Δ ppm 0.29 ppm)	Tenon M. 2016.
<i>Yucca gloriosa</i>	Yucalide A	m/z 541.1155 [M-H]-(calcd for C30H21O10, 541.1140)	Nakashima K. 2016.
	Yucalide B	m/z 541.1141 [M-H]- (calcd for C30H21O10, 541.1140)	Nakashima K. 2016.
	Yucalide C	m/z 541.1131 [M-H]- (calcd for C30H21O10, 541.1140)	Nakashima K. 2016.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Una de las especies con alto valor ornamental, medicinal, gastronómico, útil para la elaboración de productos secundarios y que además en México, se encuentran algunas de las especies únicas en el mundo, son las del género *Yucca*. Estas plantas además de todo lo anterior, tienen la característica de producir metabolitos secundarios los cuales tienen propiedades terapéuticas además de tener un valor económico tanto en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica entre otras.

Una de las herramientas importantes para lograr tanto la conservación como la obtención de estos metabolitos secundarios de algunas de las especies de la familia *Yucca* es el uso de la biotecnología vegetal por medio de la micropropagación, el cultivo de tejidos vegetales, la generación de callo y cultivos en suspensión para su análisis de patrones de síntesis de compuestos.

El cultivo *in vitro* de tejidos es una fuente alternativa para la producción de valiosos compuestos activos a partir de plantas. El cultivo de tejido caloso ha sido objeto de numerosas investigaciones durante los últimos años. Diferentes estrategias *in vitro* han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos de gran interés en la industria farmacéutica, fundamentalmente. Sin embargo, aún hay muy pocos trabajos en el campo del cultivo de tejidos y patrones de síntesis de compuestos tanto *in vitro*, *ex vitro* y callo de este género. En esta reseña se pone en evidencia estos aspectos así como las perspectivas futuras de la producción de metabolitos secundarios *in vitro*.

## 3. HIPÓTESIS

Es posible generar y mantener cultivos *in vitro* de plantas completas, tejido caloso y células en suspensión de especies del género *Yucca*. Estos cultivos producirán metabolitos secundarios similares a los que produce la planta en condiciones *in vivo*. Por lo anterior, los diferentes tipos de cultivos *in vitro* serán una alternativa para el estudio y producción de metabolitos secundarios de interés en estas especies.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer cultivos *in vitro* de plantas completas, tejido calloso y cultivos en suspensión de especies del género *Yucca*, y analizar sus patrones de síntesis de compuestos fenólicos comparándolos también con los de plantas de las mismas especies creciendo *ex vitro*.

### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-Obtener y mantener cultivos *in vitro* de plantas completas de varias especies del género *Yucca*.
- 2.-Probar el efecto de varios tratamientos con auxinas y citocininas en la generación y mantenimiento de tejido calloso en las especies de *Yucca* establecidas *in vitro*.
- 3.- Caracterizar el desarrollo del tejido calloso en aquellas especies en las que se hayan generado líneas estables de este tejido.
- 4.-Establecer cultivos en suspensión a partir de las líneas de tejido calloso generadas y caracterizar su desarrollo.
- 5.-Analizar los patrones de biosíntesis de compuestos fenólicos en los diferentes tipos de cultivos *in vitro* generados y compararlos con los de ejemplares de las mismas especies creciendo *ex vitro*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. MATERIAL VEGETAL

En el presente trabajo se estudiaron 9 especies vegetales del género *Yucca* las cuales fueron:

1. *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey \*
2. *Yucca elata* (Engelm.) Engelm. \*
3. *Yucca faxoniana* Sarg. °
4. *Yucca filamentosa* L. \*
5. *Yucca filifera* Chabaud \*
6. *Yucca periculosa* Baker \*
7. *Yucca rígida* (Engelm.) Trel. °
8. *Yucca rupícola* Scheele ° y
9. *Yucca whipplei*

Las especies marcadas con \*, se obtuvieron previamente de condiciones *in vitro* generadas López-Ramírez (2014) y en las especies marcadas con ° se establecieron los cultivos *in vitro* a partir de semillas. Además la *Y. filifera ex vitro* se recolectó en la comunidad El Ocote, un ejemplar se depositó en el herbario de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (HUAA) con el número de acceso 16463.

### 5.2. MICROPROPAGACIÓN DE *Yucca*

Se efectuó el proceso de micropropagación el cual consta de cuatro pasos muy importantes, la germinación, la multiplicación de brotes, la inducción de raíces y la aclimatación. Para este proceso se utilizaron las especies *Y. carnerosana*, *Y. coahuilensis*, *Y. elata*, *Y. faxoniana*, *Y. filamentosa*, *Y. filifera*, *Y. periculosa*, *Y. rígida*, *Y. rupícola* y *Y. whipplei*.

#### 5.2.1. GERMINACIÓN

Como primer paso se procedió a la desinfección de las semillas de *Y. faxoniana*, *Y. rígida*, *Y. rupícola* y *Y. whipplei* de acuerdo a la metodología propuesta por López-Ramírez (2014). Las semillas se sometieron a cinco lavados con agua corriente y con jabón líquido (Dermoclean) durante 10 min c/u en agitación, enseguida se lavó por 60 segundos con etanol al 70%. Se eliminó rápidamente el etanol y se enjuagó dos veces con agua corriente. Se desinfectó con

hipoclorito de sodio (Cloralex al 10%) por 20 minutos bajo agitación suave. Posteriormente, en la campana de flujo laminar se eliminó el hipoclorito de sodio (Cloralex) y se enjuagaron las semillas tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas se distribuyeron en frascos de vidrio de 500 mL, los cuales contenían medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog et al., 1962), con 3% de sacarosa y 8 gL<sup>-1</sup> de agar (Sigma-Aldrich) como gelificante, ajustado el pH a 5.7 y esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos. Este medio estuvo libre de reguladores de crecimiento. Los frascos se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz (40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 h oscuridad hasta su germinación.

### **5.2.2. MULTIPLICACIÓN DE BROTES**

Para la multiplicación de brotes se tenían establecidas las especies *in vitro* de *Y. carnerosana*, *Y. coahuilensis*, *Y. elata*, *Y. filamentosa*, *Y. filifera* y *Y. periculosa*, las cuales se colocaron en medios enriquecidos con reguladores de crecimiento (ver tabla 2) para la activación de yemas axilares.

Dichas especies se colocaron en medio Murashige y Skoog (Murashige et al., 1962), con 3% de sacarosa y 8 gL<sup>-1</sup> de agar (Sigma-Aldrich) como gelificante, ajustado el pH a 5.7 y esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos, este medio se encontró enriquecido con diferentes reguladores de crecimiento, con el objetivo de obtener brotes. En la tabla 1, se describen las concentraciones de auxinas y citocininas empleadas para la multiplicación según López-Ramírez 2014. Los frascos se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz (40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 h oscuridad, hasta aproximadamente 30-40 días.

**Tabla 2. Concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento utilizado para la formación de brotes múltiples para diferentes especies de Yucca.**

ESPECIE VEGETAL	REGULADORES DE CRECIMIENTO
<i>Y. carnerosana</i>	12.43 $\mu$ M Meta-topolina
<i>Y. coahuilensis</i>	4.44 $\mu$ M Benciladenina
<i>Y. elata</i>	4.44 $\mu$ M Benciladenina
<i>Y. filamentosa</i>	2.85 $\mu$ M Ácidoindolacético + 4.44 $\mu$ M Benciladenina
<i>Y. filifera</i>	12.43 $\mu$ M Meta-topolina
<i>Y. periculosa</i>	2.85 $\mu$ M Ácidoindolacético + 4.44 $\mu$ M Benciladenina

### 5.2.3. INDUCCIÓN DE RAÍCES

Para lograr el enraizamiento, los brotes obtenidos a partir de diversos tratamientos, se colocaron en medio Murashige y Skoog (1962), con 3% de sacarosa y 8 gL<sup>-1</sup> de agar (sigma-Aldrich) como gelificante, ajustado el pH a 5.7 y esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos. Este medio estuvo libre de reguladores de crecimiento. Los frascos se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz (40  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 h oscuridad (López-Ramírez 2014), la aparición de raíces robustas se presentó a las 5 semanas. Una vez obtenidos las raíces se procedió a la adaptación de las plántulas a suelo.

### 5.2.4. ACLIMATACIÓN

El proceso de adaptación de las plantas generadas *in vitro* se realizó de una manera gradual, se fue reduciendo lentamente la humedad relativa de los frascos donde contenían las plantas, primero se retiró el sello y luego se aflojó la tapa de los mismos; al día siguiente se realizó una pequeña apertura en el frasco manteniéndolos así durante 4 ± 1 día, se procedió a sacar las plantas ya enraizadas y se enjuagó perfectamente la raíz al chorro del agua, con la finalidad de eliminar cualquier remanente del medio de cultivo que pudiera quedar adherido a la raíz y con esto evitar la proliferación de microorganismos potencialmente nocivos. Enseguida, estas plantas ya enraizadas y lavadas se colocaron en macetas de 8 pulgadas de color negro con peat-moss (marca Hoffman), las cuales a su vez se les colocó dentro de una bolsa de plástico con el fin de mantener un poco más la humedad y se colocaron en el invernadero; dicha bolsa de plástico se retiró a la semana de haberlas pasado en macetas (López-Ramírez, 2014).

### 5.3. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS

#### 5.3.1. GENERACIÓN DE TEJIDO CALLOSO

Para la obtención de tejido calloso se utilizaron diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento auxinas y citocininas, se evaluaron 12 tratamientos diferentes, los seis primeros (tratamiento 1 al 6) son mezclas de la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y citoquinina benciladenina (BA) a diferentes concentraciones. Los siguientes tratamientos (tratamiento 7 al 12), son mezcla de auxina, ácido 4-amino-3, 5,6-tricloropiridin-2-carboxílico (picloram) y benciladenina (BA), ver tabla 3.

Se sembraron nueve explantes, tres explantes en cada frasco, de tal forma que la variable de respuesta era el porcentaje de formación de callo. Se utilizaron los mismos tratamientos para diferentes explantes, se tomaron como explantes tres partes diferentes de la planta: 1) el tallo, 2) base de la hoja (de manera vertical en el medio) y 4) parte media de la hoja (Forma horizontal en el medio).

**Tabla 3. Diseño experimental para la etapa de formación de tejido calloso.**

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (µM)		
	*	**	***
	BA	2,4-D	Picloram
Control	0.0	0.0	0.0
1	2.22	4.52	-
2		6.79	-
3		9.05	-
4	4.44	4.52	-
5		6.79	-
6		9.05	-
7	2.22	-	4.14
8		-	6.21
9		-	8.28
10	4.44	-	4.14
11		-	6.21
12		-	8.28

\* BA: Bencilaminopurina, \*\*2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético, \*\*\*Picloram: ácido 4-amino-3, 5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico

Una vez colocados los explantes en los frascos con medio Murashige y Skoog (MS) enriquecido con reguladores de crecimiento (de acuerdo al tratamiento) se sellaron y se incubaron a una temperatura de 25°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz (40 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8

h oscuridad, la formación de callo se evaluó después de 3±1 mes dependiendo del crecimiento de cada especie.

Después de haber obtenido los explantes se procedió a sembrarlos en frascos de 250 mL con 60 mL de medio MS con 3% de sacarosa y 8 gL<sup>-1</sup> de agar (sigma-Aldrich) como gelificante, ajustando el pH a 5.7 y esterilizando en autoclave a 121°C por 20 minutos, este medio se encontró enriquecido con los diferentes reguladores de crecimiento con la variante de que se reduce a la mitad la concentración de auxina y conservado la misma concentración de citocinina ver tabla 4, debido a que si se mantiene la misma concentración de auxina, el tejido calloso comienza a necrosarse. Una vez sembrados los explantes, los frascos se sellaron y se incubaron como se indica anteriormente y fueron sometidos a revisión visual periódica para establecer la formación de callos friables y posibles contaminaciones.

Los callos formados se subcultivaron cada 60 días en las mismas condiciones anteriores. Se realizaron al menos 3 sub-cultivos de callos antes de proceder a iniciar la curva de crecimiento de tejido calloso y el establecimiento de las suspensiones celulares.

**Tabla 4. Diseño experimental para la etapa de mantenimiento de tejido calloso.**

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (µM)		
	*	**	***
	BA	2,4-D	Picloram
<b>Control</b>	0.0	0.0	0.0
<b>1</b>	2.22	2.26	-
<b>2</b>		3.395	-
<b>3</b>		4.525	-
<b>4</b>	4.44	2.26	-
<b>5</b>		3.395	-
<b>6</b>		4.525	-
<b>7</b>	2.22	-	2.07
<b>8</b>		-	3.105
<b>9</b>		-	4.14
<b>10</b>	4.44	-	2.07
<b>11</b>		-	3.105
<b>12</b>			4.14

\* BA: Bencilaminopurina, \*\*2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético, \*\*\*Picloram: ácido 4-amino-3, 5,6-tricloro-2-piridinacarboxílico

### **5.3.2. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO PARA TEJIDO CALLOSO**

Para la realización de las curvas de crecimiento del tejido calloso, la preparación del medio es igual a la descrita en el apartado de generación de biomasa de tejido calloso. En condiciones asépticas (campana de flujo laminar) se colocaron 1 g de tejido generado en tratamientos anteriores para cada frasco, una vez sembrados, los frascos se sellaron y se incubaron a una temperatura de 25°C bajo un fotoperiodo de 16 h luz ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y 8 h oscuridad, y sometidos a revisión visual periódica para establecer la formación de callos friables (se observan de color más claro y brillosos y al tomarse se desprenden con gran facilidad) y posibles contaminaciones. Cada semana (cada 7 días), se tomaron tres frascos y se abrieron en campana, se sacó el tejido callosos y se pesó en balanza analítica (todo en condiciones asépticas), una vez registrado el peso se colocaba nuevamente el tejido a el frasco en donde se tomó el explante y se volvían a incubaron a una temperatura de 25°C bajo un fotoperiodo de luz (16 horas luz, 8 horas oscuridad). El proceso de pesado se realizó durante 9 semanas (63 días).

#### **5.3.2.1. CURVA DE CRECIMIENTO CALLOS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO**

Para el establecimiento de cultivo de callos en medio líquido, el material utilizado fue recolectado de los tejidos callosos que se generaron, solo se tomaron los tejidos de los tratamientos que indujeron mayor biomasa en *Y. carnerosana* T<sub>11</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>7</sub>, *Y. coahuilensis* (T<sub>10</sub>) y *Y. filifera* (T<sub>10</sub>).

Se colocó 1g de tejido calloso, a matraces que contenían 50 mL de medio MS líquido, con 3% de sacarosa, ajustado el pH a 5.7 y esterilizado en autoclave a 121°C por 20 minutos, enriquecido con los diferentes reguladores de crecimiento de acuerdo al tratamiento en donde se generaron. Los matraces se mantuvieron en agitación orbital a 80 rpm.

Después de haber pasado 7 días de la siembra, se tomaron al azar tres matraces y cada uno se filtró con papel filtro wattman #41, se recuperó el tejido calloso que quedó en el filtro y se

procedió a pesarlo en una charola, enseguida este mismo tejido se sometió a secado en una estufa (Ecoshel) a 38 °C por 7 días, al cumplir este tiempo se sacó de la estufa se aclimató la muestra a temperatura ambiente y se pesó. Este procedimiento se realizó durante 12 semanas. Se graficó la cinética de crecimiento con los pesos de biomasa fresca y seca y se calcularon los parámetros cinéticos (velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación e índice de crecimiento).

#### **5.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO**

##### **5.4.1. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA**

Para el fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de *Y. filifera*, se utilizó una columna de vidrio vertical con un diámetro de 6 cm y 60 cm de altura, la cual fue empacada con 100 g de sílice gel 60 (0.040-0.063 mm) Merck, Alemania (1.09385.2500). La fase móvil fue cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y metanol (MeOH) a diferentes concentraciones, CHCl<sub>3</sub>:MeOH (100:0, 97:3, 95:5, 93:7, 90:10, 87:13, 85:15, 80:20, 75:25, 65:35, 60:40, 0:100).

##### **5.4.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (UHLPC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS)**

Se recolectó tejido calloso, plantas *in vitro* y plantas *ex vitro* de *Y. carnerosana*, para la extracción metanólica, las cuales se colocaron en charolas previamente pesadas y se anotó el peso de la muestra utilizada, se procedió a secar la muestra en una estufa marca ECOSHEL 9025H a una temperatura de 38°C durante dos semanas, una vez secas se molieron y se colocaron en matraces de 250 mL, se agregó 200 mL de hexano y se tapó el matraz con papel aluminio y se colocó en baño maría a una temperatura de 60°C durante 10 minutos, posteriormente pasando ese tiempo se filtró la muestra por papel filtro Whatman No. 41, se recuperó el sobrenadante y la muestra que se quedó en el papel filtro se recuperó y se colocó en el matraz de 250 mL para realizar el mismo procedimiento durante dos veces más. Este procedimiento se realizó enseguida con Cloroformo (3 veces) y se finalizó con la extracción

con metanol. Al final se obtuvieron 3 extracciones diferentes las cuales correspondían a hexano, cloroformo y metanol.

El análisis fitoquímico se realizó utilizando un sistema Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) con una columna C18 (ID: 150 × 4.6 mm, 5 µm; Restek Corporation, Bellefonte, PA, EE. UU.) Y equipado con una bomba RS de la serie Quaternary y un compartimento de columna Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS con un inyector automático Ultimate 3000 Series WPS-3000RS (Thermo Fisher Scientific) y separaciones rápidas Detector PDA. Las longitudes de onda de detección fueron 254, 280, 320 y 440 nm, y se registró PDA de 200 a 800 nm para la caracterización máxima. La separación se realizó en un modo de elución en gradiente compuesto por solución acuosa fórmica al 1% (A) y acetonitrilo (B). El caudal fue de 1.0 mL · min<sup>-1</sup> y el volumen de inyección de 10 µL. El programa de gradiente [tiempo (min), % B] fue: (0.00, 5), (5.00, 5), (10.00, 30), (15.00, 30), (20.00, 70), (25.00, 70), (35.00, 5) y 12 min para el equilibrio de la columna antes de cada inyección. El sistema fue controlado por el software Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU. Y la división Dionex Softron GmbH de Thermo Fisher Scientific) y se guionó con un espectrómetro de masa de enfoque exacto Thermo Q de alta resolución (Thermo Fisher Scientific).

El sistema cromatográfico se acopló al espectrómetro de masas con una fuente de ionización por electropulverización II calentada (HESI II). Se empleó nitrógeno (pureza > 99,999%) como gas de colisión y de amortiguación. El nitrógeno se obtuvo de un generador de nitrógeno Genius NM32LA (Peak Scientific, Billerica, MA, EE. UU.). La calibración de masa para Orbitrap se realizó una vez por semana, tanto en modo negativo como positivo. La cafeína y la N-butilamina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE. UU.) Fueron los patrones de calibración para iones positivos y clorhidrato de buspirona, dodecil sulfato de sodio y sal de sodio de ácido taurocólico para calibrar el espectrómetro de masas. Estos compuestos se disolvieron en una mezcla de ácido acético, acetonitrilo, agua y metanol (Merck Darmstadt, Hesse, Alemania) y se infundieron usando una bomba de jeringa Chemyx Fusion 100. El software XCalibur 2.3 y el Trace Finder 3.2 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, EE. UU.) Se utilizaron para el control UHPLC y el procesamiento de datos, respectivamente. Se

usó Q Exactive 2.0 SP 2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Para controlar el espectrómetro de masas (Cabañas-García et al., 2019).

Los parámetros HESI se optimizaron de la siguiente manera: caudal de gas de revestimiento 75 unidades; caudal de gas auxiliar 20 unidades; temperatura capilar 400 ° C; temperatura del calentador de gas auxiliar 500 ° C; voltaje de pulverización 2500 V (para ESI-); y el nivel de RF de la lente S 30. Los datos de exploración completa en modo negativo se obtuvieron a una potencia de resolución de 70,000 ancho medio completo (FWHM) a  $m/z$  200. Para los compuestos de interés, un rango de exploración de  $m/z$  100–1000 fue elegido; el control automático de ganancia (AGC) se ajustó a  $3 \times 10^6$  y el tiempo de inyección se ajustó a 200 ms. La velocidad de escaneo se estableció en 2 escaneos  $s^{-1}$ . La calibración externa se realizó utilizando una solución de calibración en los modos positivo y negativo antes de cada serie de muestras. Además del método de adquisición de exploración completa, para fines de confirmación, se realizó un análisis dirigido MS / MS utilizando la lista de inclusión masiva y los tiempos de retención esperados de los analitos objetivo, con una ventana de tiempo de 30 segundos, con el espectrómetro Orbitrap operando tanto en positivo como en modo negativo a 17,500 FWHM ( $m/z$  200). El objetivo de AGC se estableció en  $2 \times 10^5$ , con un tiempo de inyección máximo de 20 ms. Los iones precursores se filtraron por el cuadrupolo que funcionaba en una ventana de aislamiento de  $m/z$  2. El vacío anterior, el alto vacío y el ultra alto vacío se mantuvieron a aproximadamente 2 mbar, de 105 a menos de 1010 mbar, respectivamente. La energía de colisión (célula HCD) se hizo funcionar a 30 eV. La detección se basó en la masa exacta calculada y en el tiempo de retención de los compuestos objetivo. La ventana de tolerancia de masa se estableció en 5 ppm (Cabañas-García et al. 2019).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. MICROPROPAGACIÓN DE *Yucca*

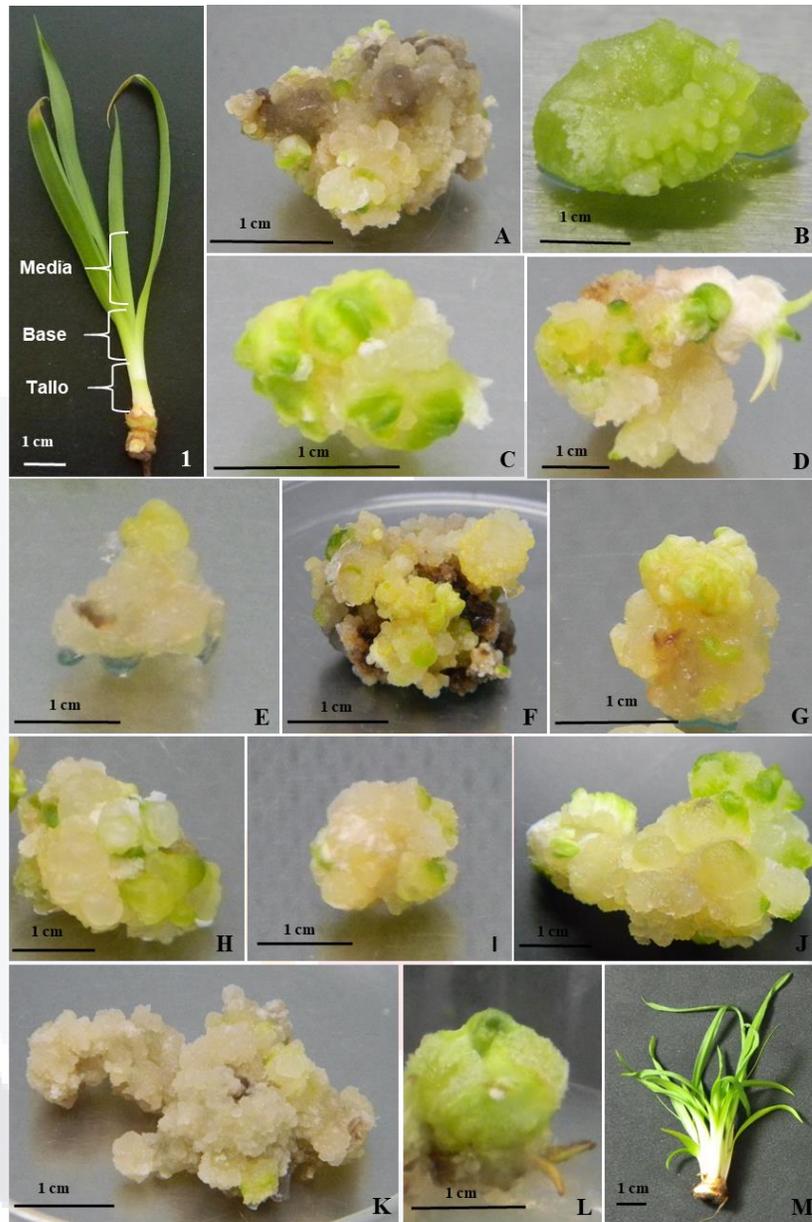
Para la propagación de especies del género *Yucca* se siguió el protocolo de López-Ramírez (2018), obteniendo generación de brotes durante 60 días con los siguientes reguladores de crecimiento, para *Y. carnerosana* y *Y. filifera* se utilizó el regulador de crecimiento metatopolina (MT) a una concentración de 3mg/L obteniendo resultados para *Y. carnerosana*

de  $10 \pm 3$  brotes por explante y para *Y. filifera* de  $2 \pm 2$  brotes por cada explante, para *Y. filamentosa* y *Y. periculosa* se utilizó la mezcla de ácido indol acético + Benciladenina ( $0.5 \text{ mgL}^{-1} + 1.0 \text{ mgL}^{-1}$ ) obteniendo para *Y. filamentosa*  $2 \pm 1$  brotes por explante y para *Y. periculosa*  $1 \pm 1$  brotes por explante, en el caso de *Y. coahuilensis* y *Y. elata* se utilizó benciladenina a una concentración de  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  dando por resultado  $2 \pm 2$  brotes por explante.

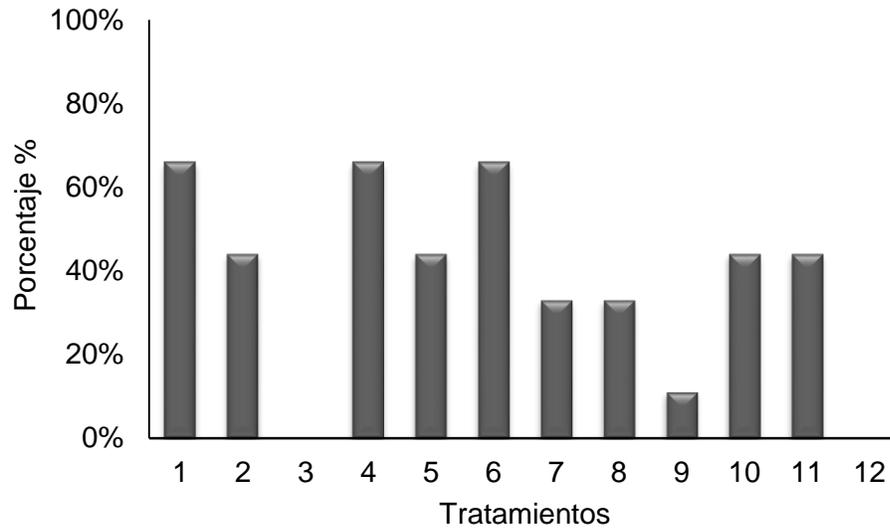
## 6.2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE CALLOS

### 6.2.1. *Y. carnerosana*

Para la *Y. carnerosana* se observó que los explantes de tallo que dieron mayor biomasa, friable y de apariencia saludable fueron MS suplementado con  $4.44 \mu\text{M}$  BA +  $6.79 \mu\text{M}$  2,4-D (T<sub>5</sub>),  $4.44 \mu\text{M}$  BA +  $4.14 \mu\text{M}$  Picloram (T<sub>10</sub>),  $4.44 \mu\text{M}$  BA +  $6.21 \mu\text{M}$  Picloram (T<sub>11</sub>) (Figura 15), después de 4-5 semanas de cultivo, arrojando un porcentaje del 44% de formación de tejido para los cuatro tratamientos descritos anteriormente (Figura 16). Las condiciones exactas requeridas para iniciar y mantener células de plantas en cultivo, o para regenerar plantas intactas a partir de células cultivadas, son diferentes para cada especie (Molnár Z. et al., 2011). Además, los tejidos de diferentes partes de las plantas también pueden tener diferentes requisitos para un crecimiento satisfactorio (Abobkar et al., 2012). La biosíntesis y homeostasis de citocininas, están finamente controladas por factores internos y externos como el nivel de otras fitohormonas y las fuentes de nitrógeno inorgánico, además su mecanismo de translocación está relacionado con el mismo sistema de transporte de purinas y nucleósidos tanto a nivel de toda la planta, como a nivel celular (Sakakibara, 2006).



**Figura 15. Tipos de explante de *Y. carnerosana* para la generación de tejido calloso. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. carnerosana* a los 21 días. A) 2.2  $\mu$ M BA + 4.5  $\mu$ M 2,4-D, B) 2.2  $\mu$ M BA + 6.8  $\mu$ M 2,4-D, C) 2.2  $\mu$ M BA + 9.5  $\mu$ M 2,4-D, D) 4.4  $\mu$ M BA + 4.5  $\mu$ M 2,4-D, E) 4.4  $\mu$ M BA + 6.8  $\mu$ M 2,4-D, F) 4.4  $\mu$ M BA + 9.0  $\mu$ M 2,4-D, G) 2.2  $\mu$ M BA + 4.1  $\mu$ M Picloram, H) 2.2  $\mu$ M BA + 6.2  $\mu$ M picloram, I) 2.2  $\mu$ M BA + 8.3  $\mu$ M Picloram, J) 4.4  $\mu$ M BA + 4.1  $\mu$ M Picloram, K) 4.4  $\mu$ M BA + 6.2  $\mu$ M Picloram, L) 4.4  $\mu$ M BA + 8.3  $\mu$ M Picloram, M) Control (libre de reguladores de crecimiento) a las 12 semanas de incubación.**



**Figura 16. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. carnerosana*, utilizando el explante de la parte del tallo (no se agregaron los resultados de base y parte media de la hoja ya que se tiene cero porcentaje), donde T<sub>1</sub>: 2,4-D 4.52 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>2</sub>: 2,4-D 6.79 μM + BA 2.22 μM, T<sub>3</sub>: 2,4-D 9.05 μM + BA 2.22 μM, T<sub>4</sub>: 2,4-D 4.52 μM + BA 4.44 μM, T<sub>5</sub>: 2,4-D 6.79 μM + BA 4.44 μM, T<sub>6</sub>: 2,4-D 9.05 μM + BA 4.44 μM, T<sub>7</sub>: picloram 4.14 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>8</sub>: picloram 6.21 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>9</sub>: picloram 8.28 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>10</sub>: picloram 4.14 μM+ BA 4.44 μM, T<sub>11</sub>: picloram 6.21 μM+ BA 4.44 μM, T<sub>12</sub>: picloram 8.28 μM+ BA 4.44 μM.**

### 6.2.2. *Y. coahuilensis*

Para la *Y. coahuilensis* se observó que los explantes de tallo que dieron mayor biomasa, friable y de apariencia saludable fueron MS suplementado con 4.44 μM BA + 4.14 μM Picloram (T<sub>10</sub>), 4.44 μM BA + 6.21 μM Picloram (T<sub>11</sub>) (Figura 17), después de 4-5 semanas de cultivo, arrojando un porcentaje del 88% de formación de tejido para los dos tratamientos descritos anteriormente (Figura 18).

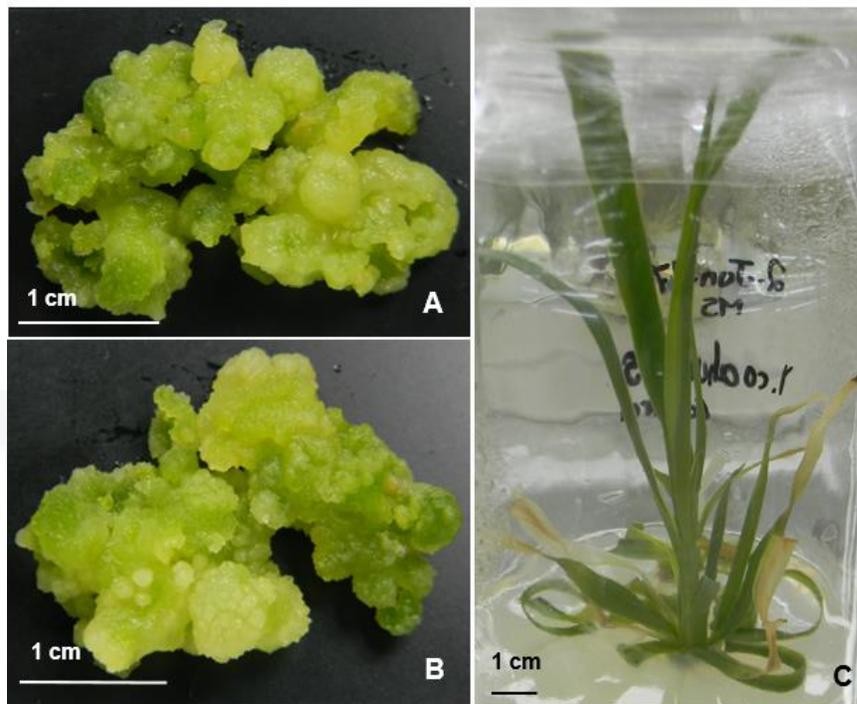


Figura 17. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. coahuilensis* a los 21 días. A) 4.4  $\mu\text{M}$  BA + 4.14  $\mu\text{M}$  Picloram (T<sub>10</sub>), B) 4.4  $\mu\text{M}$  BA + 6.21  $\mu\text{M}$  picloram (T<sub>11</sub>), C) Control (libre de reguladores de crecimiento) a las 12 semanas de incubación.

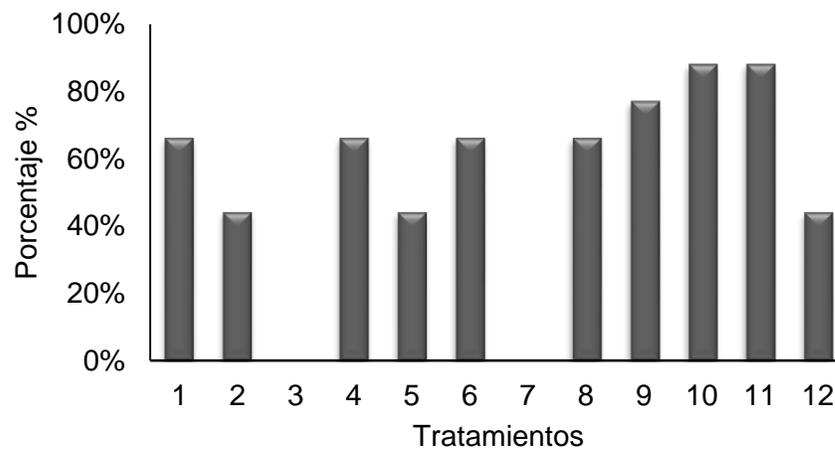
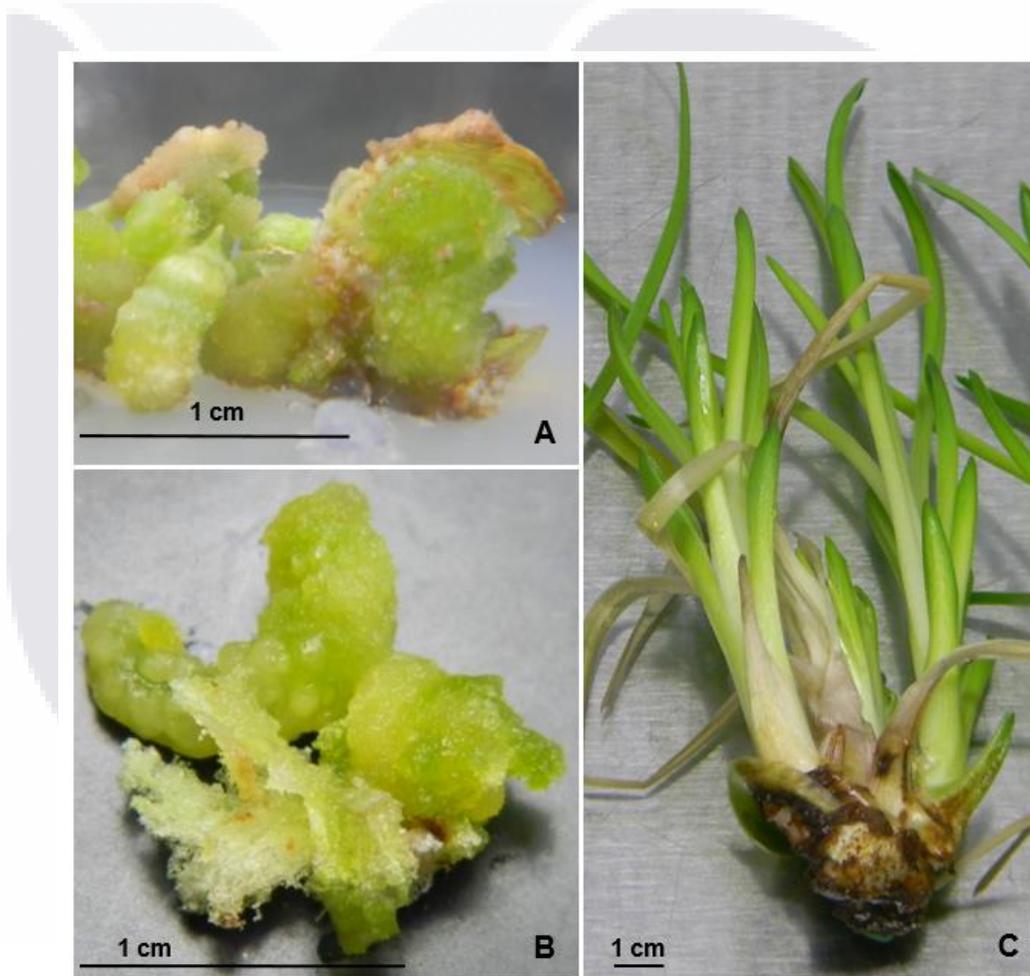


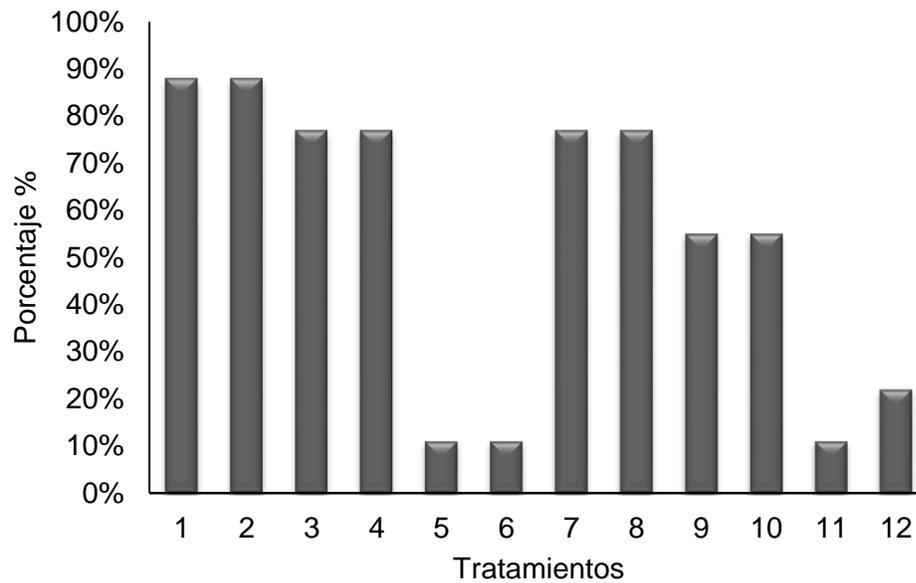
Figura 18. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. coahuilensis* utilizando el explante de la parte del tallo (no se agregaron los resultados de base y parte media de la hoja ya que se tiene cero porcentaje), donde T<sub>1</sub>: 2,4-D 4.52  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ , T<sub>2</sub>: 2,4-D 6.79  $\mu\text{M}$  + BA 2.22  $\mu\text{M}$ , T<sub>3</sub>: 2,4-D 9.05  $\mu\text{M}$  + BA 2.22  $\mu\text{M}$ , T<sub>4</sub>: 2,4-D 4.52  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ , T<sub>5</sub>: 2,4-D 6.79  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ , T<sub>6</sub>: 2,4-D 9.05  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ , T<sub>7</sub>: picloram 4.14  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ , T<sub>8</sub>: picloram 6.21  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ , T<sub>9</sub>: picloram 8.28  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ , T<sub>10</sub>: picloram 4.14  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ , T<sub>11</sub>: picloram 6.21  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ , T<sub>12</sub>: picloram 8.28  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ .

**6.2.3. *Y. elata***

Para la *Y. elata* se observó que los explantes de tallo que dieron mayor biomasa, friable y de apariencia saludable fueron MS suplementado con 2.22  $\mu$ M BA + 4.52  $\mu$ M 2,4-D (T<sub>1</sub>), 2.22  $\mu$ M BA + 6.79  $\mu$ M 2,4-D (T<sub>2</sub>) (Figura 19), después de 4-5 semanas de cultivo, arrojando un porcentaje del 88% de formación de tejido para los dos tratamientos descritos anteriormente (Figura 20).



**Figura 19. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. elata* a los 21 días. A) 2.2  $\mu$ M BA + 4.52  $\mu$ M 2,4-D (T<sub>1</sub>), B) 2.2  $\mu$ M BA + 6.79  $\mu$ M 2,4-D (T<sub>2</sub>), C) Control (libre de reguladores de crecimiento) a las 12 semanas de incubación.**



**Figura 20. Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. elata* utilizando el explante de la parte del tallo (no se agregaron los resultados de base y parte media de la hoja ya que se tiene cero porcentaje), donde T<sub>1</sub>: 2,4-D 4.52  $\mu$ M+ BA 2.22  $\mu$ M, T<sub>2</sub>: 2,4-D 6.79  $\mu$ M + BA 2.22  $\mu$ M, T<sub>3</sub>: 2,4-D 9.05  $\mu$ M + BA 2.22  $\mu$ M, T<sub>4</sub>: 2,4-D 4.52  $\mu$ M + BA 4.44  $\mu$ M, T<sub>5</sub>: 2,4-D 6.79  $\mu$ M + BA 4.44  $\mu$ M, T<sub>6</sub>: 2,4-D 9.05  $\mu$ M + BA 4.44  $\mu$ M, T<sub>7</sub>: picloram 4.14  $\mu$ M+ BA 2.22  $\mu$ M, T<sub>8</sub>: picloram 6.21  $\mu$ M+ BA 2.22  $\mu$ M, T<sub>9</sub>: picloram 8.28  $\mu$ M+ BA 2.22  $\mu$ M, T<sub>10</sub>: picloram 4.14  $\mu$ M+ BA 4.44  $\mu$ M, T<sub>11</sub>: picloram 6.21  $\mu$ M+ BA 4.44  $\mu$ M, T<sub>12</sub>: picloram 8.28  $\mu$ M+ BA 4.44  $\mu$ M.**

#### 6.2.4. *Y. filamentosa*

Para la *Y. filamentosa* se observó que los explantes de tallo que dieron mayor biomasa, friable y de apariencia saludable fueron MS suplementado con 2.22  $\mu$ M BA + 4.52  $\mu$ M 2,4-D (T<sub>1</sub>), 2.22  $\mu$ M BA + 6.79  $\mu$ M 2,4-D (T<sub>2</sub>), 2.22  $\mu$ M BA + 6.21  $\mu$ M picloram (T<sub>8</sub>), 2.22  $\mu$ M BA + 8.28  $\mu$ M picloram (T<sub>9</sub>), 4.44  $\mu$ M BA + 8.28  $\mu$ M picloram (T<sub>12</sub>) (Figura 21), después de 4-5 semanas de cultivo, arrojando un porcentaje del 77% de formación de tejido para los cinco tratamientos descritos anteriormente (Figura 22).

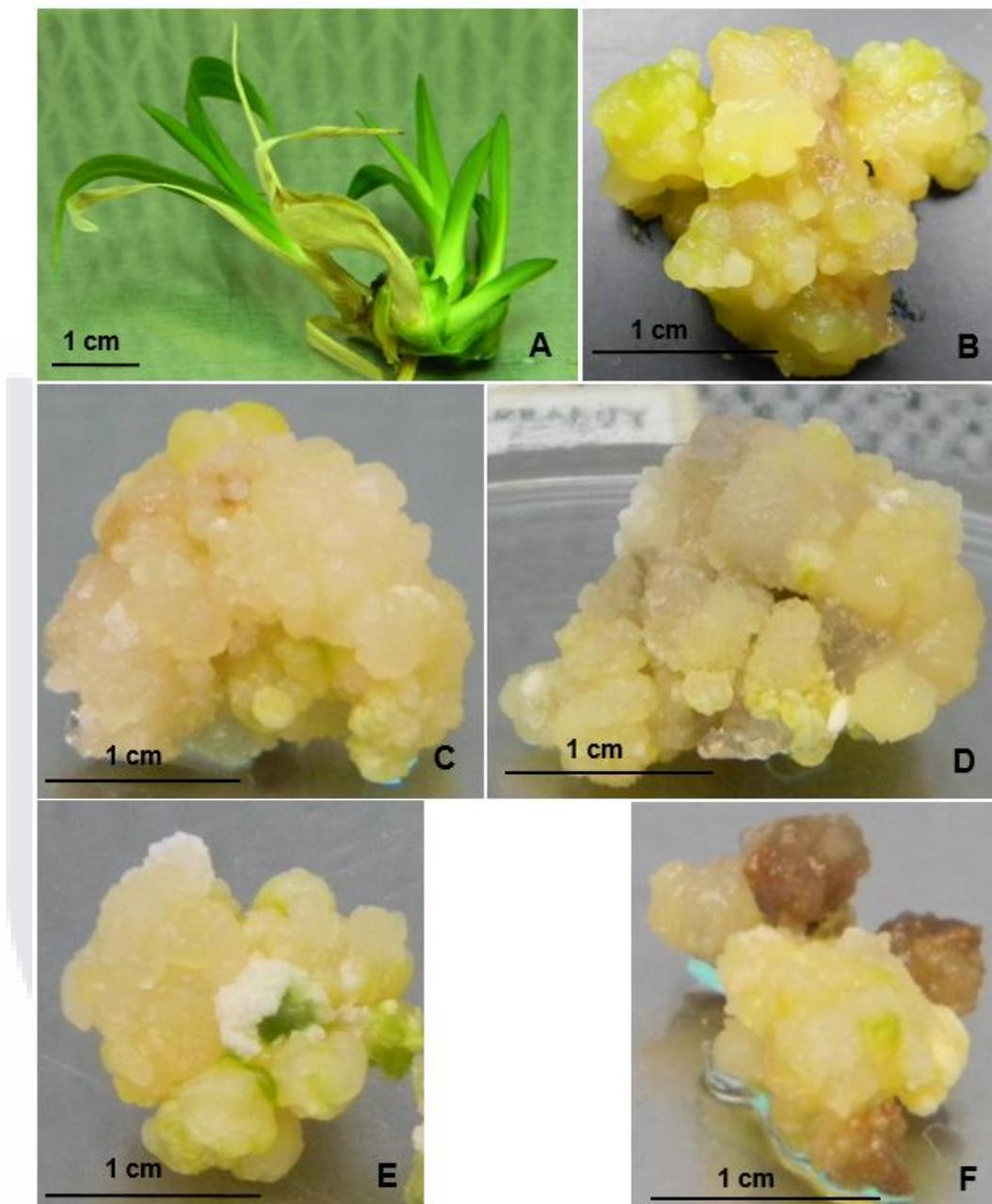
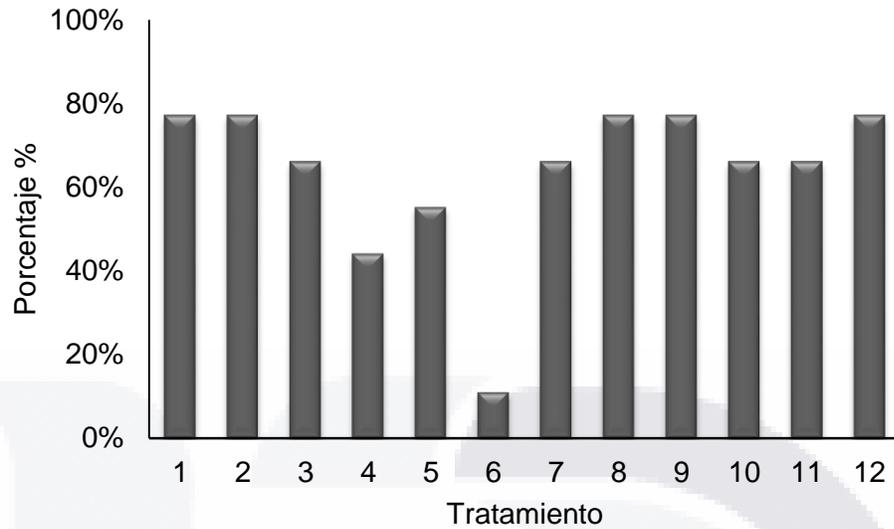


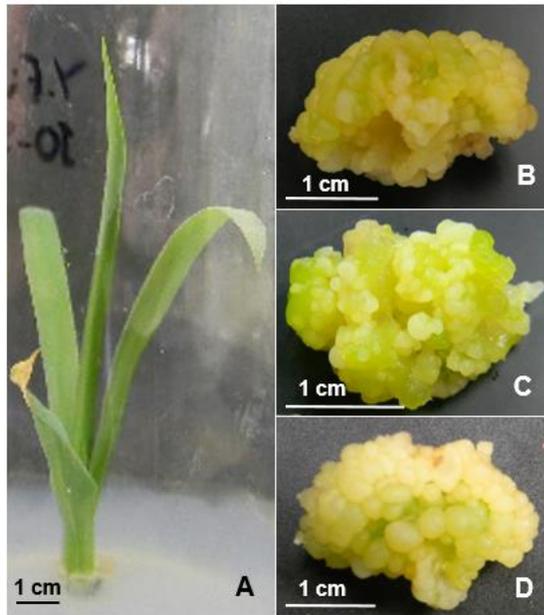
Figura 21. Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. filamentosa* a los 21 días. A) Control (libre de reguladores de crecimiento), B) 2.2  $\mu\text{M}$  BA + 4.52  $\mu\text{M}$  2,4-D ( $T_1$ ), C) 2.2  $\mu\text{M}$  BA + 6.79  $\mu\text{M}$  2,4-D ( $T_2$ ), D) 2.2  $\mu\text{M}$  BA + 6.21  $\mu\text{M}$  picloram ( $T_8$ ), E) 2.2  $\mu\text{M}$  BA + 8.28  $\mu\text{M}$  picloram ( $T_9$ ), F) 4.4  $\mu\text{M}$  BA + 8.28  $\mu\text{M}$  picloram, a las 12 semanas de incubación.



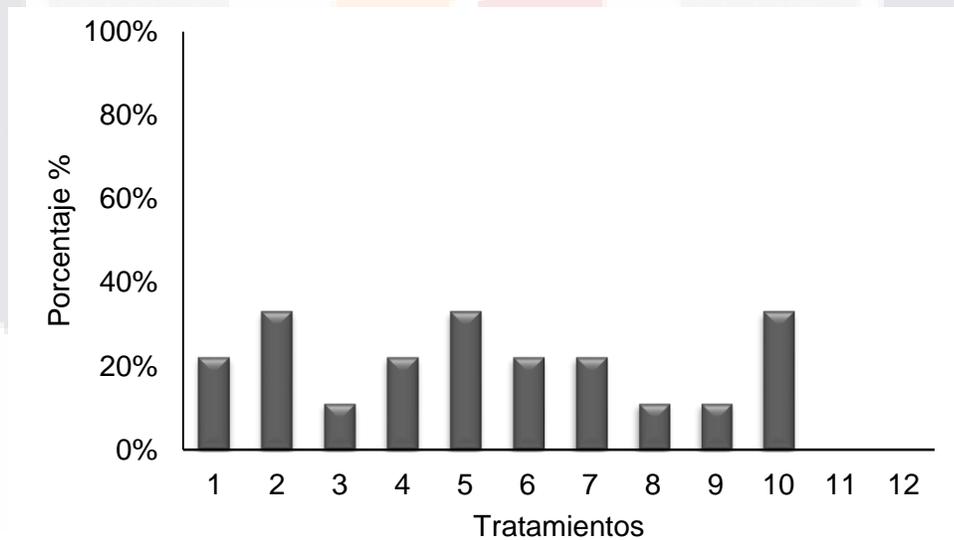
**Figura 22.** Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. filamentosa* utilizando el explante de la parte del tallo (no se agregaron los resultados de base y parte media de la hoja ya que se tiene cero porcentaje), donde T<sub>1</sub>: 2,4-D 4.52 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>2</sub>: 2,4-D 6.79 μM + BA 2.22 μM, T<sub>3</sub>: 2,4-D 9.05 μM + BA 2.22 μM, T<sub>4</sub>: 2,4-D 4.52 μM + BA 4.44 μM, T<sub>5</sub>: 2,4-D 6.79 μM + BA 4.44 μM, T<sub>6</sub>: 2,4-D 9.05 μM + BA 4.44 μM, T<sub>7</sub>: picloram 4.14 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>8</sub>: picloram 6.21 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>9</sub>: picloram 8.28 μM+ BA 2.22 μM, T<sub>10</sub>: picloram 4.14 μM+ BA 4.44 μM, T<sub>11</sub>: picloram 6.21 μM+ BA 4.44 μM, T<sub>12</sub>: picloram 8.28 μM+ BA 4.44 μM.

### 6.2.5. *Y. filifera*

Para la *Y. filifera* se observó que los explantes de tallo que dieron mayor biomasa, friable y de apariencia saludable fueron MS suplementado 2.22 μM BA + 6.79 μM 2,4-D (T<sub>2</sub>), 4.44 μM BA + 6.79 μM 2,4-D (T<sub>5</sub>), 4.44 μM BA + 4.14 μM picloram (T<sub>10</sub>) (Figura 23), después de 4-5 semanas de cultivo, arrojando un porcentaje del 33% de formación de tejido para los tres tratamientos descritos anteriormente (Figura 24).



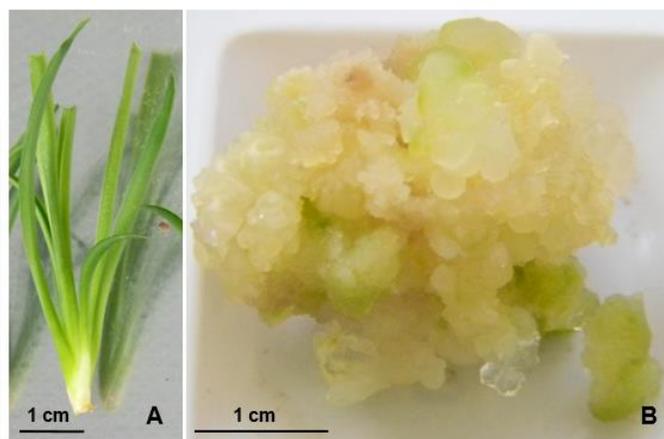
**Figura 23.** Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. filifera* a los 21 días. A) Control (libre de reguladores de crecimiento), B) 2.2  $\mu\text{M}$  BA + 6.79  $\mu\text{M}$  2,4-D ( $T_2$ ), C) 4.4  $\mu\text{M}$  BA + 6.79  $\mu\text{M}$  2,4-D ( $T_5$ ), D) 4.4  $\mu\text{M}$  BA + 4.14  $\mu\text{M}$  picloram ( $T_{10}$ ), a las 12 semanas de incubación.



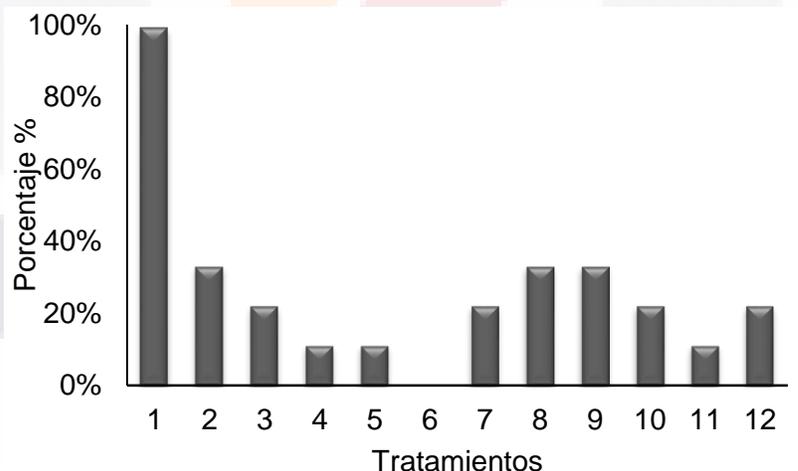
**Figura 24.** Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. filifera* utilizando el explante de la parte del tallo (no se agregaron los resultados de base y parte media de la hoja ya que se tiene cero porcentaje), donde  $T_1$ : 2,4-D 4.52  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_2$ : 2,4-D 6.79  $\mu\text{M}$  + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_3$ : 2,4-D 9.05  $\mu\text{M}$  + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_4$ : 2,4-D 4.52  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_5$ : 2,4-D 6.79  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_6$ : 2,4-D 9.05  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_7$ : picloram 4.14  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_8$ : picloram 6.21  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_9$ : picloram 8.28  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_{10}$ : picloram 4.14  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_{11}$ : picloram 6.21  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_{12}$ : picloram 8.28  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ .

**6.2.6. *Y. periculosa***

Para la *Y. periculosa* se observó que los explantes de tallo que dieron mayor biomasa, friable y de apariencia saludable fueron MS suplementado 2.22  $\mu\text{M}$  BA + 4.52  $\mu\text{M}$  2,4-D ( $T_1$ ) (Figura 25), después de 4-5 semanas de cultivo, arrojando un porcentaje del 100% de formación de tejido calloso (Figura 26).



**Figura 25.** Efecto de los reguladores de crecimiento en la inducción de callo, en el tallo de *Y. periculosa* a los 21 días. A) Control (libre de reguladores de crecimiento), B) 2.2  $\mu\text{M}$  BA + 4.52  $\mu\text{M}$  2,4-D ( $T_1$ ), a las 12 semanas de incubación.



**Figura 26.** Porcentaje de formación de callo según la combinación de los reguladores de crecimiento BA, 2,4-D y picloram para la especie *Y. periculosa* utilizando el explante de la parte del tallo (no se agregaron los resultados de base y parte media de la hoja ya que se tiene cero porcentaje), donde  $T_1$ : 2,4-D 4.52  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_2$ : 2,4-D 6.79  $\mu\text{M}$  + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_3$ : 2,4-D 9.05  $\mu\text{M}$  + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_4$ : 2,4-D 4.52  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_5$ : 2,4-D 6.79  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_6$ : 2,4-D 9.05  $\mu\text{M}$  + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_7$ : picloram 4.14  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_8$ : picloram 6.21  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_9$ : picloram 8.28  $\mu\text{M}$ + BA 2.22  $\mu\text{M}$ ,  $T_{10}$ : picloram 4.14  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_{11}$ : picloram 6.21  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ ,  $T_{12}$ : picloram 8.28  $\mu\text{M}$ + BA 4.44  $\mu\text{M}$ .

Para *Y. carnerosana*, *Y. coahuilensis*, *Y. filamentosa*, *Y. filifera*, *Y. elata* y *Y. periculosa* se tomaron tres partes diferentes de la planta para la generación de tejido calloso, obteniéndolo solamente de la parte del tallo de la misma, debido a que los tejidos de diferentes partes de la planta también pueden tener diferentes requisitos para un crecimiento satisfactorio (Abobkar et al., 2012), además que cada órgano presenta una sensibilidad a los reguladores de crecimiento, este puede variar con la edad y las condiciones ambientales, aunque algunos autores sostienen que la respuesta hormona únicamente estaría condicionada por la sensibilidad (Azcón-Brieto 2013), también dependiendo de diferentes estímulos tanto bióticos y abióticos (Ikeuchi et al., 2013), en el caso de los explantes de hoja joven de camote (*Ipomoea batatas* L. (Lam.)), las porciones apicales del tallo fueron las más regenerativas (Porobo et al., 1995).

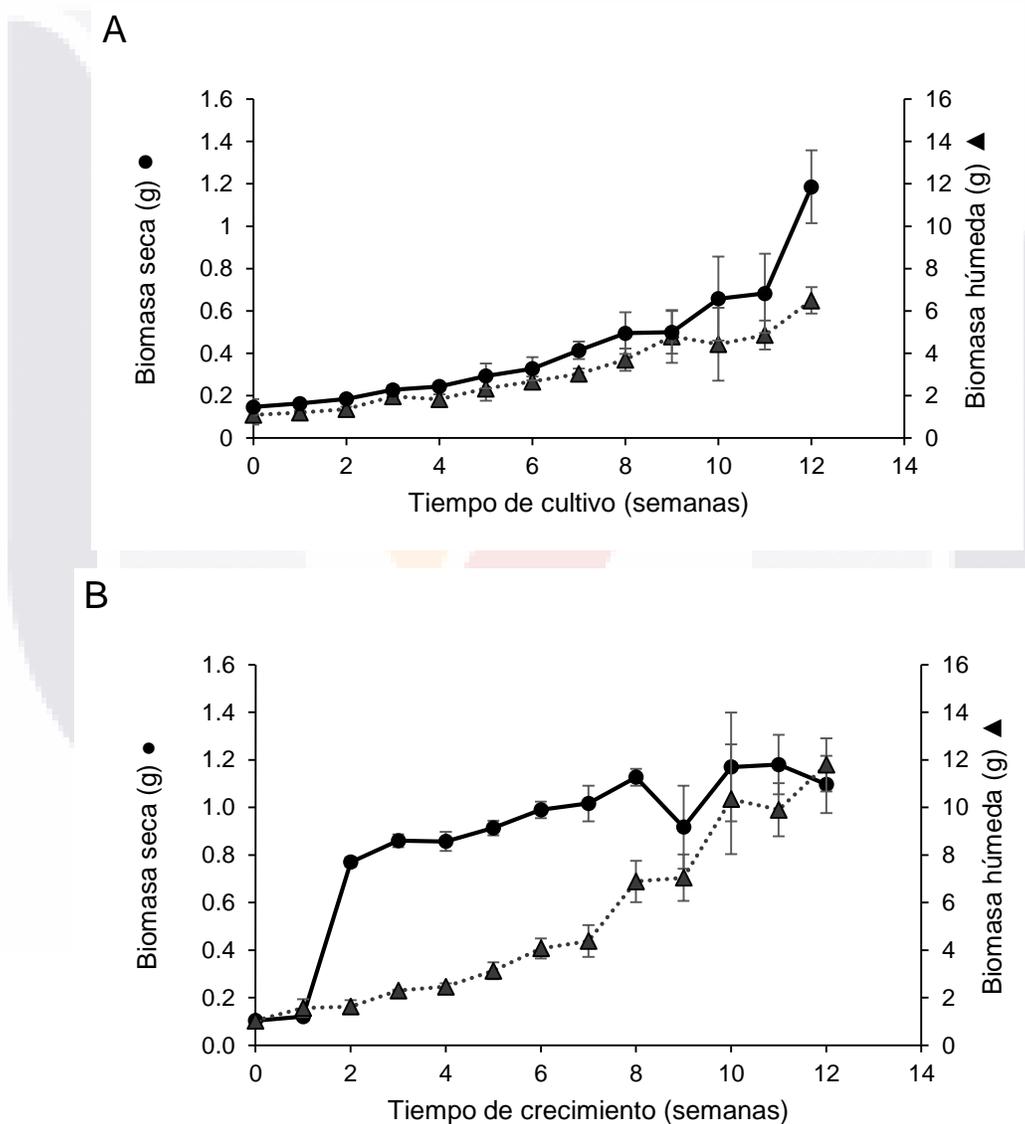
Para el mantenimiento de tejido calloso fue necesario disminuir la concentración de auxina, debido a que la respuesta fisiológica de la planta depende de la dosis de reguladores de crecimiento que se le aplica pudiendo estimular el crecimiento celular a dosis bajas, mientras que a dosis altas muestran efectos herbicidas (Carrillo, 2009), además se tiene que la formación de tejido calloso es promovida por balances auxina/citocinina favorables a las citocininas (es decir mayor concentración debido a que las concentraciones de las citocininas endógenas son muy bajas 1-10  $\mu\text{M}$ ) (Azcón-Brieto 2013).

### **6.3. DETERMINACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO PARA TEJIDO CALLOSO**

#### **6.3.1. CURVA DE CRECIMIENTO DE *Y. carnerosana* EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO Y LÍQUIDO**

Los resultados se reportan en gramo de tejido calloso en base húmeda y base seca, a lo largo de 12 semanas para *Y. carnerosana*, observando que conforme transcurre el tiempo el crecimiento también aumenta de manera exponencial, debido a que las células comienzan a dividirse y a crecer (Figura 27). Para la elaboración de la cinética de crecimiento de *Y. carnerosana* en medio sólido y medio líquido se utilizaron los callos generados en el tratamiento 10 (4.4  $\mu\text{M}$  BA + 4.1  $\mu\text{M}$  Picloram), pudiendo observar una fase lag hasta la

semana 2 en los dos diferentes tipos de medio, enseguida un crecimiento exponencial de la semana 2 a la 4 en ambos casos, sin embargo hasta la semana 12 seguimos apreciando un incremento en la biomasa, sin lograr ver la fase estacionaria ni la fase de muerte, teniendo para el medio sólido biomasa seca una velocidad de crecimiento de  $0.79 \text{ d}^{-1}$ , tiempo de duplicación de 1.65 y un índice de crecimiento de 11.36 Para la cinética de crecimiento en medio líquido biomasa seca una velocidad de crecimiento de  $0.75 \text{ d}^{-1}$ , tiempo de duplicación de 1.43 y un índice de crecimiento de 10.61.

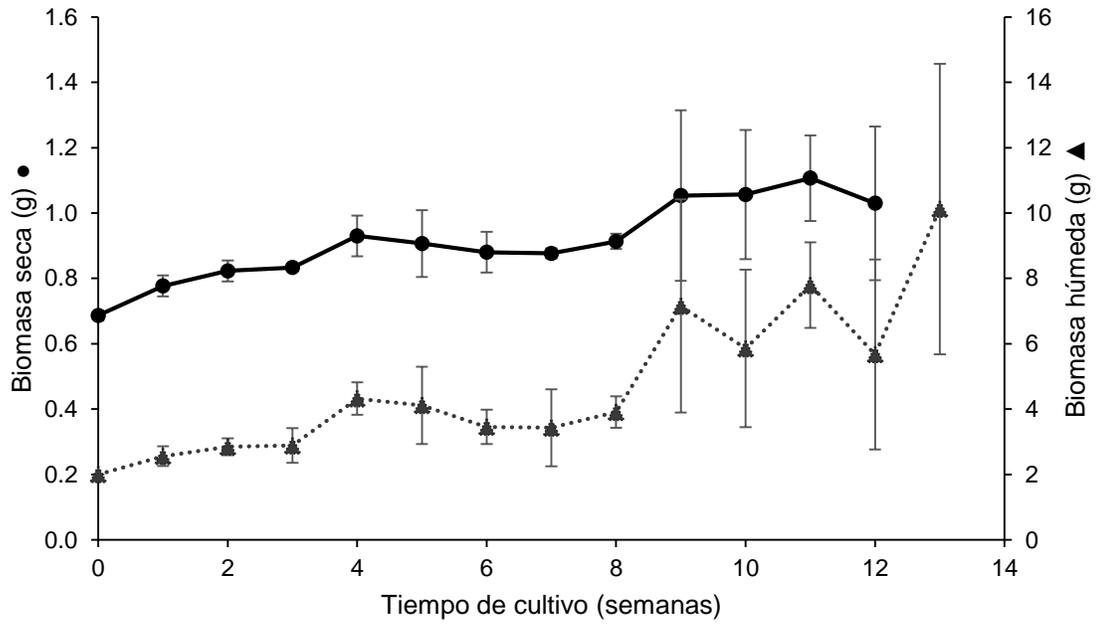


**Figura 27. Cinética de crecimiento de callos de *Y. carnerosana*. A) Tejido calloso en medio sólido, B) tejido calloso en medio líquido. Cada punto representa el promedio n=3. Las barras representan la desviación estándar.**

### 6.3.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE *Y. coahuilensis* EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO Y LÍQUIDO

Para la elaboración de la cinética de crecimiento de *Y. coahuilensis* en medio sólido y medio líquido se utilizaron los callos generados en el tratamiento 10 (4.4  $\mu\text{M}$  BA + 4.1  $\mu\text{M}$  Picloram), para el medio líquido los pesos iniciales de la muestra fueron de  $2\pm 0.5$  g de tejido calloso y para medio sólido fueron de  $1\pm 0.5$  g de callo (debido a la cantidad de muestra con la que se contaba), pudiendo observar una fase lag hasta la semana 4 en los dos diferentes tipos de medio, enseguida un crecimiento exponencial de la semana 4 a la 12 en medio sólido sin embargo hasta la semana 12 seguimos apreciando un incremento en la biomasa, sin lograr ver la fase estacionaria ni la fase de muerte, en medio líquido se aprecia una fase de muerte a la semana 11 (Figura 28), teniendo para el medio sólido biomasa seca una velocidad de crecimiento de  $0.93\text{ d}^{-1}$ , un tiempo de duplicación de 0.50 y un índice de crecimiento de 1.50. Para la cinética de crecimiento en medio líquido biomasa seca se obtuvo una velocidad de crecimiento de  $0.85\text{ d}^{-1}$ , un tiempo de duplicación de 0.25 y un índice de crecimiento de 1.25. El comportamiento para los dos diferentes tipos de medio (sólido y líquido) fue parecido, al parecer no existe cambio al utilizar diferentes pesos iniciales en esta especie.

A



B

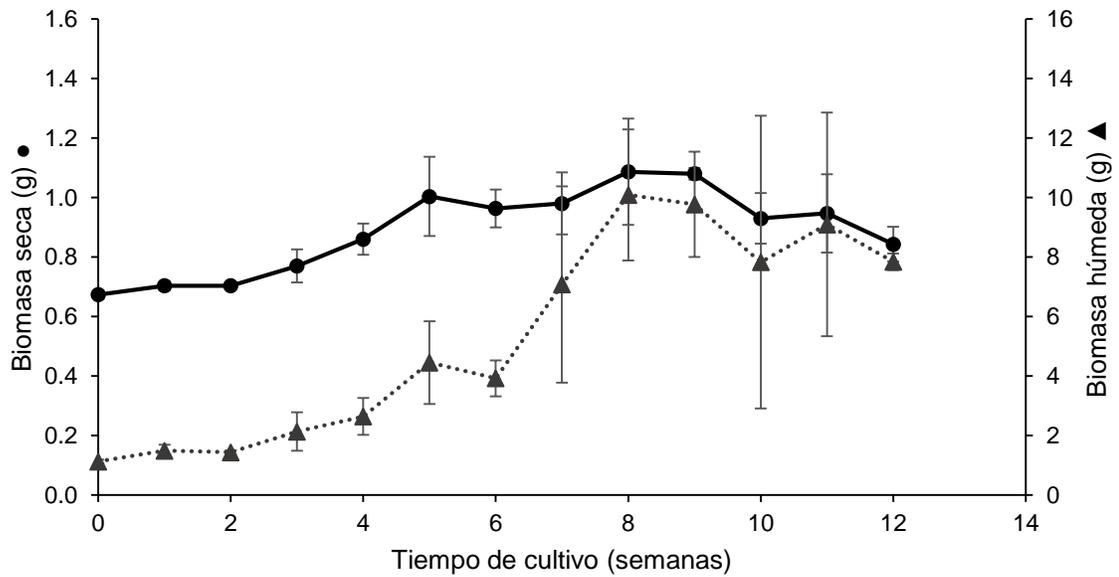


Figura 28. Cinética de crecimiento de callos de *Y. coahuilensis*. A) Tejido calloso en medio sólido, B) tejido calloso en medio líquido. Cada punto representa el promedio n=3. Las barras representan la desviación estándar.

### 6.3.3. CURVA DE CRECIMIENTO DE *Y. filifera* EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO

Los resultados se reportan en gramo de tejido calloso en base húmeda y base seca, a lo largo de 12 semanas (Figura 29). Para la elaboración de la cinética de crecimiento de *Y. filifera* en medio sólido se utilizaron los callos generados en el tratamiento 10 (4.4  $\mu\text{M}$  BA + 4.1  $\mu\text{M}$  Picloram), en esta especie no se pudo apreciar un cambio significativo en el crecimiento de tejido calloso, no se observa fase lag, crecimiento exponencial, estacionaria ni fase de muerte, sin embargo se puede apreciar que hasta la semana 11 el tejido calloso sigue en una fase estacionaria y en la semana 11 a la 12 se observa un decremento tanto en biomasa seca como en biomasa húmeda.

Dicho experimento se realizó en base a Hurtado (1988) que menciona que existen algunos cultivos muy activos en donde alcanzan su máxima densidad hasta los 25 días, por lo que no es factible para nuestra especie, ya que en base a los resultados obtenidos podemos afirmar que se requiere más semanas de monitorear para lograr ver el comportamiento completo de la cinética de crecimiento (fase de desaceleración, fase estacionaria y fase de muerte) de esta especie en particular. Se tiene como resultado de esta cinética en medio sólido biomasa seca una velocidad de crecimiento de  $1.82 \text{ d}^{-1}$ , un tiempo de duplicación de 0.05 y un índice de crecimiento de 1.05, observando un crecimiento lento.

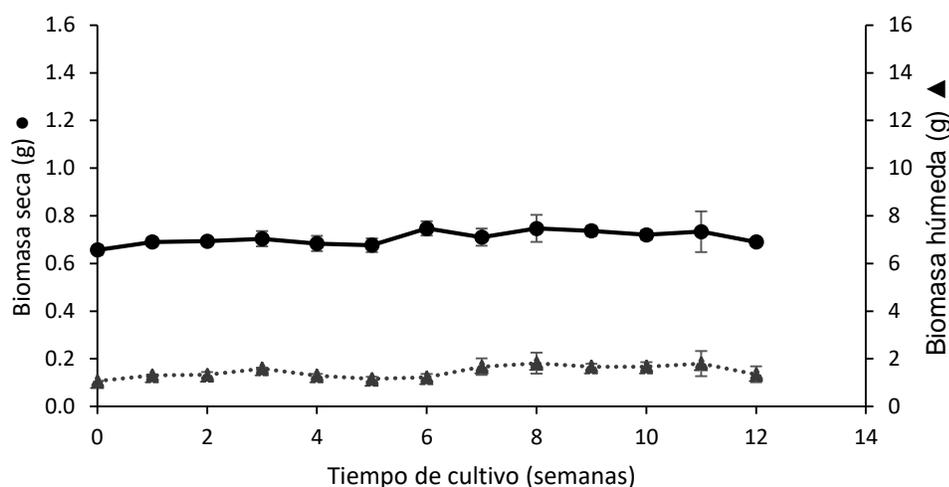
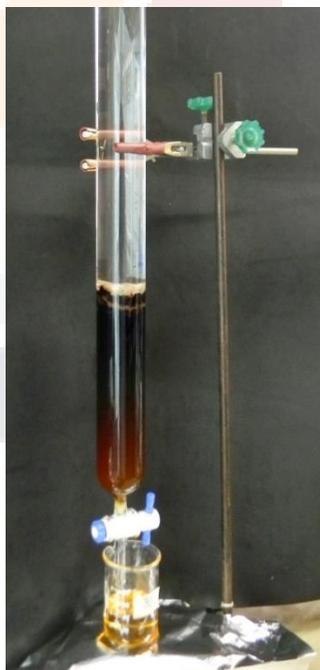


Figura 29. Cinética de crecimiento de callos de *Y. filifera* en medio sólido. Cada punto representa el promedio n=3. Las barras representan la desviación estándar.

## 6.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

### 6.4.1. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA

En este tipo de separación la fase estacionaria se encuentra empaquetada en el interior de una columna de vidrio, dicha fase estacionaria (silica gel 60 0.040-0.063 mm) es más polar que la fase móvil, llevando a cabo la elución con disolventes que tienen una polaridad inferior a la fase estacionaria (cloroformo y metanol), la elución que se utilizó fue en gradiente, cambiando la composición del eluyente durante el proceso de separación (Figura 30). Se obtuvieron un total de 80 fracciones de las cuales se reunieron las que presentaban el mismo  $R_f$  en la cromatografía en capa fina, obteniendo finalmente 19 fracciones en total (ver tabla 5). Se logró observar fluorescencia bajo UV 365 nm en todas las fracciones, además después de utilizar el revelador anisaldehído, indicando presencia de compuestos tipo terpenos en la especie *Y. filifera in situ*.



**Figura 30. Separación por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de corteza de *Y. filifera*.**

**Tabla 5. Fraccionamiento del extracto metanólico de corteza de *Y. filifera***

<b>Sistema de elución</b>	<b>Fraciones colectadas</b>	<b>Fraciones reunidas</b>	<b>Clave</b>
Cloroformo 100%	1-5	1-2	F1
Cloroformo: metanol 97:3%	6-10	3-5	F2
Cloroformo: metanol 95:5%	11-15	6-7	F3
Cloroformo: metanol 93:7%	17-21	8-10	F4
Cloroformo: metanol 90:10%	22-33	11-12	F5
Cloroformo: metanol 87:13%	34-37	13-15	F6
Cloroformo: metanol 85:15%	38-43	17-18	
Cloroformo: metanol 80:20%	44-51	19-21	F7
Cloroformo: metanol 75:25%	52-60	22-23	F9
Cloroformo: metanol 65:35%	61-65	24-33	F10
Cloroformo: metanol 60:40%	66-70	34-37	F11
Metanol 100%	70-80	38-43	F12
		44-46	F13
		47-48	F14
		49-51	F15
		52-60	F16
		61-65	F17
		66-70	F18
		70-80	F19

#### **6.4.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS)**

La técnica UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS se ha utilizado para la caracterización de metabolitos en mezclas complejas (Barbera et al., 2017), y las condiciones cromatográficas utilizadas en este trabajo han demostrado eficiencia para la separación e identificación de diferentes metabolitos secundarios (Cornejo et al., 2016).

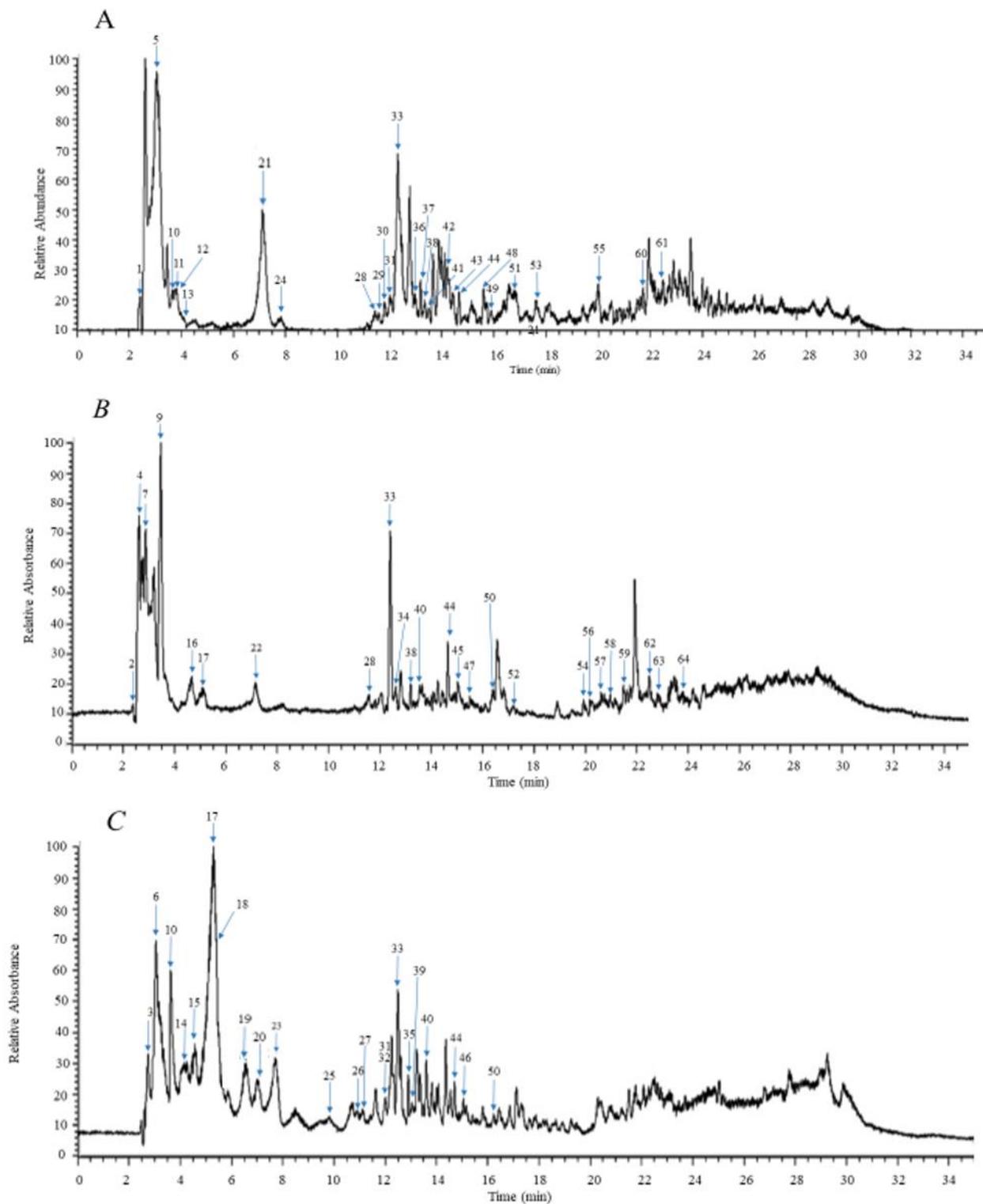
La caracterización fitoquímica de los extractos se logró comparando la información obtenida por UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS con las evidencias espectrométricas existentes en la literatura o estudiando el patrón de fragmentación de las moléculas. Para los extractos *de Y. carnerosana* preparados con diferentes tejidos, las condiciones cromatográficas permitieron la separación e identificación tentativa de 64 metabolitos (ver Figura 31, Tabla 6). Entre los compuestos detectados, 26 ocurrieron *in vitro*, 27 en condición *ex vitro*, y 22 en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultivos de callos. Las características de cada pico, como el tiempo de retención, la masa teórica y medida, el patrón de fragmentación y la identificación tentativa de cada compuesto, se resumen en la Tabla 6.

Los compuestos 1, 2, 4, 5, 7, 8, 14, y 16 fueron identificados como ácidos orgánicos. Entre estos compuestos, se asignaron dos isómeros de ácido glucónico (compuestos 1 y 5), dos isómeros de ácido málico (compuestos 4 y 7) así como ácidos quinico y cítrico (compuestos 2 y 8, respectivamente) según lo propuesto por Taamalli et al. (2015). Estos compuestos estaban presentes en condiciones Taamalli et al. (2015) *in vitro* y *ex vitro*. Del mismo modo, el compuesto 14 fue asignado como ácido shikimic (Chen et al., 2014) y el compuesto 16 como un derivado del ácido malónico ya que el ion pseudomolecular en (Chen et al., 2014)  $m/z$ : 134.8940 produjo un fragmento en  $m/z$ : 103.0035 (ácido malónico). Por otra parte, el compuesto 6 estaba presente en tejido del callo, y fue identificado como resveratrol 3- $\beta$ -mono-glucósido. Para este compuesto, el ion pseudomolecular a  $m/z$ : 389.1220 produjo fragmentos a  $m/z$ : 179.0561 y 211.0717, generados debido a la separación de la mitad hexosa de la estructura polifenólica básica. La presencia de resveratrol se ha reportado en otras especies de *Yucca*, como *Y. schidigera* (Cheeke et al., 2006) *Y. periculosa*, mostrando actividades fotoprotectoras contra los rayos UV (García-Bores et al., 2010) (García-Bores et al., 2010).

Por otro lado, el compuesto 10 sólo se detectó en el tejido calloso, y se identificó como oximinomalonato de dietilo ya que se generó un fragmento a  $m/z$ : 128,0347 debido a la pérdida de etanol y agua. Del mismo modo, los compuestos 11-13 se detectaron sólo en plantas cultivadas *ex vitro*. En este sentido, el compuesto 11 se identificó como ácido succínico debido a la presencia de un fragmento principal a  $m/z$ : 101,0236 generado debido a la pérdida de agua, y el compuesto 12 se identificó como dimetil malato ya que el ion pseudomolecular a  $m/z$ : 161,0451 produjo un fragmento a  $m/z$ : 129,0187, generado debido a la pérdida de un grupo metilo y la posterior eliminación del agua. Además, se detectaron tres isómeros del ácido piscídico (compuestos 13, 21 y 22) en plantas que crecen en condiciones *in vitro* y *ex vitro* y se asignaron como se informó anteriormente (Cabañas-García et al., 2019), ver Tabla 6.



**Figura 31. Cromatogramas de UHPLC-PDA-HESI- Orbitrap-MS / MS de extractos metanólicos de *Y. carnerosana*. A) Hoja de *Y. carnerosana ex-vitro*, B) parte aérea y raíz de *Y. carnerosana in vitro* y C) tejido calloso de *Y. carnerosana*.**

Los compuestos 15, 17, 18 y 50 se detectaron principalmente en el tejido calloso y se identificaron como isómeros de rhynchosporósidos como se informó anteriormente para los cultivos de callos de *Coryphantha macromeris* (Cactaceae) (Cabañas-García et al., 2021). Semejantemente, los compuestos 19 y 23 fueron detectados en tejido del callo e identificados como isómeros del hexopyranose 2-O(2-hydroxyethyl) -4-O-[2-O-(2-hydroxypropyl) hexopyranosyl]. Para este metabolito, la pérdida de un grupo metilo generó un fragmento a (Cabañas-García et al., 2021)  $m/z$ :427.2464, y la pérdida de un radical  $C_3H_7O_2^-$  generó un fragmento a  $m/z$ :369.1401. El compuesto 20 fue propuesto como ácido pantoténico, como se informó anteriormente (Rodríguez-Pérez et al., 2013) y el compuesto 24 como derivado del ácido succínico ya que el ion pseudomolecular generó dos fragmentos a (Rodríguez-Pérez et al., 2013)  $m/z$ :121.0288 y  $m/z$ :117.0186 (ácido succínico), que fueron consistentes con la separación de la mitad del ácido benzoico y la posterior eliminación del agua. Por otra parte, el compuesto 25 fue asignado como 2 (hydroxymethyl) - 6 - [3,4,5-trihydroxy-6-(4-hydroxybutoxy) oxan-2-yl] metoxi oxane-3,4,5-triol. Para este metabolito, la pérdida de un grupo metoxi y la posterior eliminación del agua generaron un fragmento a  $m/z$ :367.1608, y la pérdida de la mitad hexosa produjo un fragmento a  $m/z$ :251.1130. Los compuestos 26 y 35 fueron identificados como isómeros de verbasósido. Este compuesto ocurrió exclusivamente en el tejido del callo, que es la primera vez divulgada para la especie *de Yucca*.

El compuesto 27 fue detectado solamente en tejido del callo, y fue asignado como derivado ácido carboxílico del ciclohexano puesto que el ion pseudomolecular en  $m/z$ :351.1296 rindió fragmentos en  $m/z$ :303.1448, 273.1344, y 287.1499. Se generaron fragmentos a  $m/z$ : 303.1448 y 273.1344 debido a la pérdida de 3 moléculas de agua y la posterior eliminación de un grupo metoxi, y el fragmento a  $m/z$ : 287.1499 correspondió a la eliminación de cuatro moléculas de agua. Por otro lado, el compuesto 28 sólo se detectó en plantas y se identificó tentativamente como ácido 3-oxo-5-amino-hexanoico ya que el ion pseudomolecular produjo un fragmento a  $m/z$ :128,0347 generados debido a la pérdida de agua. Del mismo modo, los compuestos 29 y 30 correspondían a metabolitos de naturaleza glicosídica y estaban presentes sólo en plantas cultivadas en condiciones *ex vitro*. La pérdida de las mitades de la hexosa caracterizó el patrón de fragmentación de estos compuestos. El compuesto 31 se detectó en

todos los tejidos y se asignó como ácido isopropilálico ya que el ion pseudomolecular a  $m/z$ :175.0612 produjo un fragmento a  $m/z$ :143.0713 generado por la pérdida de dos moléculas de agua.

El compuesto 32 fue identificado tentativamente como cistanosido G ya que el ion pseudomolecular a  $m/z$ : 445.1715 produjo un fragmento principal a  $m/z$ : 119.0493 ([M-H-C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>10</sub>]<sup>-</sup>). Este glucósido feniletithanoide ocurrió exclusivamente en tejido insensible. Este metabolito fue reportado por primera vez en plantas de *Cistanche* (Orobanchaceae) (Deyama et al., 2006) y este es el primer informe para especies de *Yucca* y el género *Asparagaceae*.

Adicionalmente, los compuestos 33, 34, 37 y 38 fueron asignados como metabolitos de naturaleza fenólica (ácido cafeico y ácido siringético y uno de sus derivados) como se informó anteriormente (Cabañas-García et al., 2019; Chen et al., 2014; Iswaldi et al., 2013). Para estos compuestos, se han propuesto sus propiedades antioxidantes (Cikman et al., 2015), así como sus efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antidiabéticos, neuroprotectores, cardioprotectores y hepatoprotectores (Srinivasulu et al., 2018). El compuesto 36 se produjo en plantas cultivadas en condiciones (Cabañas-García et al., 2019b; Chen et al., 2014; Cikman et al., 2015; Iswaldi et al., 2013; Srinivasulu et al., 2018) *in vitro*, y se asignó como ácido 6,7-dihidroxi-2-oxo-1-benzopyran-4-carboxílico ya que el ion pseudomolecular a  $m/z$ :221.0090 produjo un fragmento principal a  $m/z$ :177.0190 ([M-H-CHO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>). Para el compuesto 39, las evidencias espectrométricas sugirieron la presencia de β-D-galactopiranosido, 6-hidroxihexil 6-O-β-D-galactopiranosil en el tejido calloso de *Y. carnerosana*. El ion pseudomolecular a  $m/z$ : 441.1975 produjo dos fragmentos a  $m/z$ : 395.1923 ([M-H-OH-CH<sub>3</sub>O]<sup>-</sup>)y 217.1078 ([M-H-hexosa-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O]<sup>-</sup>). Del mismo modo, el compuesto 40 se produjo en tejidos callosos y plantas *in vitro* y se asignó como derivado del ácido ferúlico (Cabañas-García et al., 2019). Se ha propuesto que el ácido ferúlico inhibe el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi*, un hongo responsable de la podredumbre de las raíces en una amplia gama de huéspedes, produciendo pérdidas económicas y ecológicas significativas en todo el mundo (Matei et al., 2020). Por lo tanto, este derivado puede ser interesante para estudios posteriores.

El eriodictyol (compuesto 42) se asignó como se informó anteriormente (Taamalli et al., 2015), y el compuesto 43 como ácido acético 2-[(3-metil benzoilo)amino], ya que se detectaron dos fragmentos a (Taamalli et al., 2015)  $m/z$ :176.0711 ( $[M-H-OH]^-$ ) y 119.0496 ( $[M-H-C_2H_3NO_2]^-$ ). Por otro lado, se detectó el compuesto 44 en todas las muestras, y se asignó como ácido sinápico como lo proponen Cabañas-García et al. (2019) y Liu et al. (2015). Para este metabolito, se ha propuesto su efecto terapéutico contra el fotoenvejecimiento de la piel inducido por UVB (Jeon et al., 2019). El compuesto 45 fue asignado como magnolósido U como se informó anteriormente (Cabañas-García et al., 2021), y el compuesto 46 se asignó como acetato de 3,4,5-triacetyloxy-6-[(4-oxo-2,3-dihydro-cyclopentachromen-7-yl)oxan-2-yl]metil acetato ya que el ion pseudomolecular a (Cabañas-García et al., 2021; Cabañas-García et al., 2019b; Jeon et al., 2019; Liu et al., 2015)  $m/z$ :531.1505 produjo un fragmento a  $m/z$ :134.0365, y el compuesto 47 fue propuesto como el flavonoide glicosilado naringenina 7-O-rutinósido debido a la presencia de un fragmento principal en  $m/z$ :266.0659, generado por la pérdida de la mitad glicosídica.

El compuesto 48 (alcohol 3,4,5-trietoxibencilo) produjo fragmentos a  $m/z$ :209,1178 y 165,0916 generados debido a la eliminación de un grupo metoxi y la posterior eliminación del radical  $C_2H_6O$ . Para el compuesto 51, las evidencias espectrométricas sugirieron la presencia de leaósido (Zhang et al., 2015) en plantas *ex vitro*.

Además de los ácidos cítrico, málico, glucónico, succínico y pantoténico, se detectaron otros ácidos orgánicos (compuestos 49, 54, 56-59, 61 y 63). El patrón de fragmentación se caracterizó principalmente por la pérdida de agua y  $CO_2$ , según lo propuesto por Ledesma-Escobar et al. (2015). Semejantemente, los compuestos 55, 60, y 62 también fueron asignados como flavonoides (alpinetin, sakuranetin, y persicogenin, respectivamente). Los pasos de la fragmentación fueron caracterizados principalmente por la pérdida del B-anillo de la estructura flavonoide básica y la pérdida de agua y de grupos metílicos. Finalmente, el compuesto 64 fue asignado como nordihidrocapsiato, como se informó anteriormente (Cabañas-García et al., 2019b; Ledesma-Escobar et al., 2015).

**Tabla 6. Identificación de metabolitos en tejido callos, plantas *in vitro* y *ex vitro* de *Y. carnerosana* usando UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS**

Peak	Retention time (min)	Compound	Elemental composition [M-H] <sup>-</sup>	Theoretical mass (m/z)	Measured mass (m/z)	Accuracy (ppm)	MSn ions	Reference	Tissue
1	2.61	Gluconic acid isomer I	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	195.0510	195.0506	2.05	129.0186	(Taamalli et al., 2015)	E
2	2.62	Quinic acid	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	191.0561	191.0557	2.09	127.0392	(Taamalli et al., 2015)	I
3	2.73	Sugar	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	-	179.0556	-	-		C
4	2.80	Malic acid isomer I	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	133.0142	133.0136	4.51	115.0029		I
5	3.06	Gluconic acid isomer II	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	195.0510	195.0506	2.05	129.0186	(Taamalli et al., 2015)	E
6	3.07	Resveratrol 3-β-mono-D-glucoside	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>8</sub> <sup>-</sup>	389.1242	389.1220	5.65	179.0561, 211.0717	(Taamalli et al., 2015)	C
7	3.15	Malic acid isomer II	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	133.0142	133.0136	4.51	115.0029		I
8	3.45	Citric acid	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	191.0197	191.0194	1.57	111.0079	(Taamalli et al., 2015)	E
9	3.50	Pyroglutamic acid	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	128.0353	128.0347	4.69	-		I
10	3.62	Diethyl oximinomalonate	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	188.0564	188.0560	2.13	128.0347		C
11	3.68	Succinic acid	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	117.0193	117.0187	5.13	101.0236		E
12	3.82	Dimethyl malate	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	161.0455	161.0451	2.48	129.0187		E
13	4.09	Piscidic acid isomer I	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	255.0510	255.0510	0.00	165.0551, 135.0442	(Cabañas-García et al., 2019b)	E
14	4.17	Shikimic acid	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	173.0455	173.0450	2.89	155.0344, 129.0557, 111.0452	(Chen et al., 2014)	C
15	4.66	Rhynchosporoside isomer I	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	399.1508	399.1508	0.00	353.1455, 309.1192, 279.1088	(Cabañas-García et al., 2021)	I, C
16	5.07	Malonic acid derivative	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	-	134.8940	-	103.0035		I, C
17	5.31	Rhynchosporoside isomer II	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	399.1508	399.1508	0.00	353.1455, 309.1192, 279.1088	(Cabañas-García et al., 2021)	C
18	5.85	Rhynchosporoside isomer III	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	399.1508	399.1508	0.00	353.1455, 309.1192, 279.1088	(Cabañas-García et al., 2021)	C
19	6.57	2-O-(2-hydroxyethyl)-4-O-[2-O-(2-hydroxypropyl)hexopyranosyl] hexopyranose isomer I	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	443.1770	443.1767	0.68	427.2464, 369.1401		C
20	6.98	Pantothenic acid	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>5</sub> <sup>-</sup>	218.1034	218.1029	2.29	146.0815	(Rodríguez-Pérez et al., 2013)	C
21	7.11	Piscidic acid isomer II	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	255.0510	255.0510	0.39	165.0551, 135.0442		E, I
22	7.16	Piscidic acid isomer III	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	255.0510	255.0510	0.39	165.0551, 135.0442		I
23	7.71	2-O-(2-hydroxyethyl)-4-O-[2-O-(2-hydroxypropyl) hexopyranosyl] hexopyranose isomer II	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> O <sub>13</sub> <sup>-</sup>	443.1770	443.1767	0.68	427.2464, 369.1401		C
24	7.83	2-(Benzoyloxy)-3-hydroxysuccinic acid	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	253.0353	253.0353	0.00	117.0186, 121.0288		E
25	9.82	2-(hydroxymethyl)-6-[3,4,5-trihydroxy-	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	413.1664	413.1663	0.24	367.1608, 251.1130		C

		6-(4-hydroxybutoxy) oxan-2-yl] methoxy oxane-3,4,5-triol							
26	10.91	Verbascoside isomer I	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	461.1664	461.1664	0.00	123.0444, 153.0550		C
27	11.11	Cyclohexanecarboxylic acid, 3-[(6-deoxy-3-O-methyl-d-galactopyranosyl)oxy]-1,4,5-trihydroxy	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub> <sup>-</sup>	351.1296	351.1296	0.00	303.1448, 287.1499, 273.1344		C
28	11.57	3-oxo-5-amino-hexanoic acid	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	144.0666	144.0660	4.16	128.0347		E, I
29	11.58	2,4,6-Trihydroxyacetophenone-2,4-di-O-β-D- glucopyranoside	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	491.1406	491.1408	0.41	329.0883, 167.0346		E
30	11.81	2-Cyclohexylethyl 4-O-α-D- glucopyranosyl-β-D- glucopyranoside	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	451.2185	451.2188	0.66	189.1660		E
31	12.00	Isopropylmalic acid	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	175.0612	175.0609	1.71	143.0713		E, I, C
32	12.06	Cistanoside G	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	445.1715	445.1715	0.00	119.0493		C
33	12.48	Syringic acid acetate isomer I	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	239.0561	239.0559	0.84	195.0658, 179.0344, 149.0601	(Cabañas-García et al., 2019b; Chen et al., 2014)	E, I, C
34	12.60	Caffeic acid	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	179.0349	179.0348	0.84	135.0447	(Iswaldi et al., 2013)	I
35	12.90	Verbascoside isomer II	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	461.1664	461.1664	0.00	123.0444, 153.0550		C
36	13.00	6,7-dihydroxy-2-oxo-1-benzopyran-4-carboxylic acid	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	221.0092	221.0090	0.90	177.0190		E
37	13.18	Syringic acid acetate derivative	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	-	519.1718	-	239.0561, 149.0602, 179.0345		E
38	13.21	Syringic acid acetate isomer II	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	239.0561	239.0559	0.00	195.0658, 179.0344, 149.0601	(Cabañas-García et al., 2019a) (Chen et al., 2014)	E, I
39	13.23	β-D-galactopyranoside, 6-hydroxyhexyl 6-O-β-D-galactopyranosyl	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	441.1977	441.1975	0.45	395.1923, 217.1078		C
40	13.59	Ferulic acid derivative	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	-	475.1821	-	193.0501, 179.0346	(Cabañas-García et al., 2019a)	I, C
41	13.65	Ethyl 2-methyl-3-(methylamino)-3-oxopropanoate	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	158.0823	158.0817	3.80	-		E
42	14.22	Eriodictyol	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	287.0554	287.0560	2.09	151.0032	(Taamalli et al., 2015)	E
43	14.42	2-[(3-methylbenzoyl)amino]acetic acid	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	192.0666	192.0664	1.04	176.0711, 119.0496		E
44	14.70	Sinapic acid	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	223.0610	223.0609	0.45	169.0865, 179.0708, 164.0428	(Cabañas-García et al., 2019b; Liu et al., 2015)	E, I, C
45	15.02	Magnoloside U	C <sub>30</sub> H <sub>39</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	623.2345	623.2352	1.12	179.0558, 135.0444	(Cabañas-García et al., 2021)	I
46	15.04	3,4,5-triacetyloxy-6-[(4-oxo-2,3-dihydro-cyclopentachromen-7-yl)oxy]oxan-2-yl]methyl acetate	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	531.1508	531.1505	0.56	134.0365		C
47	15.51	Naringenin 7-O-rutinoside	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	579.1719	579.1721	0.35	266.0659		I
48	15.61	3,4,5-triethoxybenzyl alcohol	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	239.1289	239.1287	0.84	209.1178, 165.0916		E
49	15.88	9,10-Dihydroxy octadecanedioic acid	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	345.2283	345.2282	0.29	329.2333	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	E

50	16.22	Rhynchosporoside isomer IV	C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup>	399.1508	399.1508	0.00	353.1455, 309.1192	(Cabañas-García et al., 2021)	I, C
51	16.84	Leeaoside	C <sub>24</sub> H <sub>39</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	503.2498	503.2510	2.38	371.2056	(Zhang et al., 2015)	E
52	17.20	1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-5-oxo-3-heptanyl β-D-xylopyranoside	C <sub>24</sub> H <sub>29</sub> O <sub>9</sub> <sup>-</sup>	461.1817	461.1816	0.22	-		I
53	17.64	2-Benzoylisoquinolinium	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> NO <sup>-</sup>	233.0834	233.0850	6.86	157.0497		E
54	19.94	9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid isomer I	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	327.2177	327.2178	0.31	309.2075	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	I
55	20.01	Alpinetin	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	269.0819	269.0819	0.00	223.0737, 193.0506		E
56	20.23	9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid derivative	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	343.2126	343.2126	0.00	327.2177, 309.2071	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	I
57	20.64	9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid isomer II	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	327.2177	327.2178	0.31	309.2075	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	I
58	20.98	9,10-Dihydroxy octadecanedioic acid	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	345.2283	345.2282	0.29	329.2333	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	I
59	21.52	5,8,12-Trihydroxy-9-octadecenoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	329.2335	329.2335	0.00	315.2175	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	I
60	21.72	Sakuranetin	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	285.0768	285.0769	0.35	193.0506, 179.0344, 125.0237		E
61	22.48	9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	327.2177	327.2178	0.31	309.2075	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	E
62	22.50	Persicogenin	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>6</sub> <sup>-</sup>	315.0874	315.0876	0.63	297.0763		I
63	22.85	5,8,12-Trihydroxy-9-octadecenoic acid isomer	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>5</sub> <sup>-</sup>	329.2335	329.2335	0.00	315.2173	(Ledesma-Escobar et al., 2015)	I
64	23.80	Nordihydrocapsiate	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> <sup>-</sup>	293.1758	293.1759	0.34	277.1807	(Cabañas-García et al., 2019)	I

C= Callo; E= *ex vitro*; I= *in vitro*.

## 7. CONCLUSIONES

- Se lograron establecer cultivos *in vitro* de callos de *Y. carnerosana*, *Y. coahuilensis*, *Y. filamentosa*, *Y. filifera*, *Y. elata* y *Y. periculosa* a partir del tallo de la planta utilizando concentraciones variadas de reguladores de crecimiento (auxinas: 2,4-D y picloram, Citocinina: BA), debido a las interacciones diferentes que presentan entre cada especie.
- Se establecieron cultivos en suspensión de *Y. carnerosana* y *Y. coahuilensis* a partir de cultivos *in vitro* de callos friables.
- Se observó que las especies del género *Yucca* presentan un periodo de crecimiento lento en comparación con otras especies.
- La concentración equivalente de ácido gálico del extracto metanólico de la corteza de *Y. filifera* fue de 9.39 mg/g de muestra. La concentración equivalente de catequina del extracto metanólico de la corteza de *Y. filifera* fue de 2.98 mg/g de muestra. La concentración equivalente de trolox del extracto metanólico de la corteza de *Y. filifera* fue de 46  $\mu\text{mol}$  de muestra, demostrando que están presentes los compuestos fenólicos en la especie *Y. filifera*, pudiendo ser una buena alternativa para la extracción de estos compuestos ya que se sabe que tienen efectos terapéuticos.
- Durante el fraccionado de *Y. filifera*, se puede observar presencia de polifenoles hasta la fracción 85, corroborando que se tienen presentes diferentes polifenoles de variados pesos moleculares.
- Para los extractos de *Y. carnerosana* las condiciones de UHPLC permitieron una buena separación de muchos componentes de la muestra. La caracterización fitoquímica se logró comparando la información obtenida por UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS / MS con evidencias espectroscópicas existentes en la literatura o por búsqueda de estructura y estudio del patrón de fragmentación de moléculas. Además,

el tiempo de retención y los espectros UV ( $\lambda_{max}$ ) se utilizaron para la caracterización máxima. El perfil de elución de planta *in vitro*, hoja de planta *ex vitro* y tejido calloso de *Y. carnerosana* y los espectros de masas obtenidos en modo de iones negativos indicaron una composición fenólica altamente compleja.

- La determinación de UHPLC-PDA-HESI-Orbitrap-MS/MS del extracto de metanol de *Y. carnerosana in vitro* mostro 25 compuestos (fenólicos y de otra naturaleza), para la planta *ex vitro* 27 compuestos y para el callo 22 compuestos diferentes.
- Ocho compuestos fenólicos estuvieron presentes en dos o tres de los diferentes tejidos; sin embargo, estuvieron presentes todos en la *Y. carnerosana in vitro*, estos resultados son relevantes ya que, al generar el callo, no se pierden compuestos fenólicos, al contrario, se observan algunos no detectados en otros tejidos.

Como **perspectiva** a futuro se pudieran utilizar estas técnicas de cultivo de tejidos para la selección y propagación de materiales de alta calidad, así como la obtención de metabolitos a gran escala.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abobkar I. M., Saad Ahmed M. Elshahed. (2012). Plant Tissue Culture Media. Intech. Chapter 2. DOI: 10.5772/50569. <http://dx.doi.org/10.5772/50569>.
- Arce-Montoya, M., Rodríguez-Álvarez, M., Hernández-González, JA et al. Micropropagación y desempeño en campo de *Yucca valida*. Plant Cell Rep 25, 777–783 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0144-3>.
- Aregheore, E. (2005). Effect of *Yucca schidigera* saponin on the nutritive value of urea-ammoniated maize stover and its feeding value when supplemented with forage legume (*Calliandra calothyrsus*) for goats. Small Ruminant Research - SMALL RUMINANT RES. 56. 95-102. 10.1016/j.smallrumres.2004.03.006.

- Atta-Alla, H., Van Staden, J. (1997). Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia* Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48, 209–212. <https://doi.org/10.1023/A:1005834406115>.
- Azcón-Brieto J., Talón M. (2013). Fundamentos de fisiología vegetal. Interamericana de España S.L. McGraw-Hill. Edición 2, ISBN 9788448151683.
- Ball, E. (1946). Development in Sterile Culture of Stem Tips and Subjacent Regions of *Tropaeolum Majus* L. And of *Lupinus Albus* L. American Journal of Botany, 33(5), 301-318. doi:10.2307/2437117.
- Barbera, J., Talón, M. (2013). Fundamentos de fisiología vegetal, segunda edición. Mc Graw Hill Interamericana de España, S.L. Education. ISBN: 978844819293
- Bentz, SE, Parlman, BJ, Talbott, HJ. et al. (1988). Factores que afectan la propagación in vitro de *Yucca glauca* . Plant Cell Tiss Organ Cult 14, 111-120 (1988). <https://doi.org/10.1007/BF00041184>
- Bhatia, S., Dahiya, R. (2015). Concepts and techniques of plant tissue culture science. Chapter 4. Editorial. AP.
- Cabañas-García, E., Areche, C., Gómez-Aguirre, Y.A., Borquez, J., Muñoz, R., Cruz-Sosa, F., Balch, E.P.-M., 2021. Biomass production and secondary metabolite identification in callus cultures of *Coryphantha macromeris* (Engelm.) Britton & Rose (*Cactaceae*), a traditional medicinal plant. South African Journal of Botany 137, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.002>.
- Cabañas-García, E., Areche, C., Jáuregui-Rincón, J., Cruz-Sosa, F., Pérez-Molphe Balch, E., 2019a. Phytochemical profiling of *Coryphantha macromeris* (*Cactaceae*) growing in greenhouse conditions using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Molecules 24, 705. 10.3390/molecules24040705.
- Cabañas-García, E., Areche, C., Jáuregui-Rincón, J., Cruz-Sosa, F., Pérez-Molphe Balch, E., 2019b. Phytochemical Profiling of *Coryphantha macromeris* (*Cactaceae*) Growing in Greenhouse Conditions Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Molecules 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24040705>.
- Cantú C. and Renteria L. (2003). El efecto de *Tegeticula yuccasella* Riley (Lepidoptera: Prodoxidae) sobre la fenología reproductiva de *Yucca filifera* Chabaud (Agavaceae) en Linares, N.L., México. Acta zoológica mexicana, (89), 85-92.
- Carrillo, E. A. L. (2005). Auxinas. Plant growth promoting substances. El Cid Editor. ISBN: 978-1-4135-8319-9.

- Carrillo, T. C., (2008). “El origen del maíz. Naturaleza y cultura en Mesoamérica”, en Ciencias, núms. 92-93, pp. 4-13. <https://www.revistacienciasunam.com/es/> ISSN: 0187-6376
- Céspedes, C. L., Alarcon, J., Aqueveque, P. M., Lobo, T., Becerra, J., Balbontin, C., Seigler, D. S. (2015). New environmentally-friendly antimicrobials and biocides from Andean and Mexican biodiversity. *Environmental Research*, 142, 549–562. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.08.004>.
- Cheeke, P.R., Piacente, S., Oleszek, W., 2006. Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *Yucca schidigera*: a review. *Journal of Inflammation* 3, 6-6. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-3-6>.
- Chen, S.D., Lu, C.J., Zhao, R.Z., 2014. Qualitative and quantitative analysis of *Rhizoma Smilacis glabrae* by ultra high performance liquid chromatography coupled with LTQ OrbitrapXL hybrid mass spectrometry. *Molecules* 19, 10427-10439. <https://doi.org/10.3390/molecules190710427>.
- Cikman, O., Soylemez, O., Ozkan, O.F., Kiraz, H.A., Sayar, I., Ademoglu, S., Taysi, S., Karaayvaz, M., 2015. Antioxidant activity of syringic acid prevents oxidative stress in l-arginine-induced acute pancreatitis: an experimental study on rats. *International surgery* 100, 891-896. <https://doi.org/10.9738/INTSURG-D-14-00170.1>.
- Cornejo, A., Salgado, F., Caballero, J., Vargas, R., Simirgiotis, M., and Areche, C. (2016). Secondary Metabolites in *Romalina terebrata* Detected by UHPLC/ESI/MS/MS and Identification of Prietin as Tau Protein Inhibitor. *International Journal of Molecular Science*, 17(8), 1303. DOI: 10.3390/ijms17081303.
- Deyama, T., Kobayashi, H., Nishibe, S., Tu, P., 2006. Isolation, Structure Elucidation and Bioactivities of Phenylethanoid Glycosides from *Cistanche*, *Forsythia* and *Plantago* Plants, In: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 33, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 645-674.
- Small, C. and Degenhardt, D (2018). Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation: A review. *Ecological Engineering*. 118 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.04.010>.
- Dragalin, I. P., Kintia, P. K. (1975). Steroidal saponins of *Yucca filamentosa*: Yuccoside C and protoyuccoside C, *Phytochemistry*, 14(8), 1817-1820, ISSN 0031-9422, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85301-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85301-5).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Efferth T. (2018). Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures. Department of Pharmaceutical Biology, Institute of Pharmacy and Biochemistry, Johannes Gutenberg University, Mainz 55128, Germany.

Gambini J, López G.R, Olaso G.G, Inglés M, Abdelazid K, Alami M, Bonet C.V, Borrás C, Viña J. (2013). Resveratrol: Distribution, properties and perspectives. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*. Elsevier. 48(2), 79-88. DOI: 10.1016/j.regg.2012.04.007

García-Bores A. M., Bello C., Campos Y., Benítez J.C., Flores S., Canales M., Hernández T., and Avila A. J (2010). Photoprotective activity of *Yucca periculosa* polyphenols. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (2), 100 – 108.

García-Bores, A.M., Bello, C., Campos, Y., Benitez, J.d.C., Flores, S., Canales, M., Hernández, T., Avila Acevedo, J.G., 2010. Photoprotective activity of *Yucca periculosa* polyphenols. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9, 100-108. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85612475005>

Häkkinen ST, Ritala A., Rischer H., Oksman-Caldentey KM. (2012) Plantas medicinales, ingeniería de metabolitos secundarios en cultivos celulares. Editorial Meyers. *Encyclopedia of Sustainability Science and Technology*. Springer, Nueva York.

Hernández T., García-Bores A. M., Serrano R., Ávila G., Dávila P., Cervantes H. y Lira R. (2015). Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Tip*, 18(2), 116–121. Doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.003.

Hochstätter F. and Seed Morphology by Hentzschel G. English Translation by Holland C., German Summaries. (2002). Taxonomy & systematics. *Yucca II* (Agavaceae) - Mexico. Indehiscent-fruited species in the Southwest, Midwest and East of the USA. ISBN 3-00-009008-8. [https://www.fhirt.org/yucca/y\\_elata.php](https://www.fhirt.org/yucca/y_elata.php).

Hochstätter F. and Seed Morphology by Hentzschel G. English Translation by Holland C., German Summaries. (2004). Taxonomy & Sysematics. *Yucca III* (Agavaceae) - Mexico. Indehiscent-fruited species, Dehiscent-fruited species. ISBN 3-00-013124-8 [https://www.fhirt.org/yucca/y\\_elata.php](https://www.fhirt.org/yucca/y_elata.php).

Ikeuchi, M., Sugimoto, K., Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression, *The Plant Cell*, Volumen 25, Número 9, septiembre de 2013, páginas 3159–3173, <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>

Irish, V.F. (2000), The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal*, 61: 1014-1028. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04065.x>

Iswaldi, I., Gómez-Caravaca, A. M., Lozano-Sánchez, J., Arráez-Román, D., Segura-

- Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Profiling of phenolic and other polar compounds in zucchini (*Cucurbita pepo L.*) by reverse-phase high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Research International*, 50(1), 77–84. Doi:10.1016/j.foodres.2012.09.030.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S., Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, Volume 9, Pages 26-38, ISSN 2214-7861, <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003>.
- Jeon, J., Sung, J., Lee, H., Kim, Y., Jeong, H.S., Lee, J., 2019. Protective activity of caffeic acid and sinapic acid against UVB-induced photoaging in human fibroblasts. *Journal Food Biochemistry* 43, e12701. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12701>.
- Jordan, M., y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En Squeo, F, A., & Cardemil, L. (eds.). *Fisiología Vegetal* (pp 1 – 28). La Serena: Ediciones. Universidad La Serena. 15 9-10, 22
- Kaneda N., Nakanishia H., Staba E.J. (1987). Steroidal constituents of *Yucca shidigera* plants and tissue cultures. *Phytochemistry*. 26(5) 1425-1429. ISSN 0031-9422. Doi.org/10.1016/S0031-9422 (00)81827-0.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Journal Agricultural and Biological Sciences*, 129, 525-535. <https://doi-org.dibpxy.uaa.mx/10.1016/j.indcrop.2018.12.048>
- Khare C.P. (2007). *Indian Medicinal Plants*. Springer, Nueva York, NY. 727. ISBN 978-0-387-70638-2. Doi.org/10.1007/978-0-387-70638-2.
- Ledesma-Escobar, C.A., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D., 2015. Characterization of lemon (*Citrus limon*) polar extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode. *Journal of Mass Spectrometry* 50, 1196-1205. <https://doi.org/10.1002/jms.3637>.
- Liu, M., Li, P., Zeng, X., Wu, H., Su, W., He, J., 2015. Identification and pharmacokinetics of multiple potential bioactive constituents after oral administration of radix astragali on cyclophosphamide-induced immunosuppression in Balb/c mice. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 5047-5071. <https://doi.org/10.3390/ijms16035047>.
- López-Ramírez Y., Palomeque-Carlín A., Chávez Ortiz LI, de la Rosa-Carrillo M..L., Pérez-Molphe-Balch E. (2018) Micropropagation of *Yucca* Species. En: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) *Protocolos de cultivo de células vegetales. Methods in Molecular Biology*, vol. 1815. Humana Press, Nueva York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_10).

- Marzocco, S., Piacente, S., Pizza, C., Oleszek, W., Stochmal, A., Pinto, A., Sorrentino, R., Autore, G. (2004). Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by yuccaol C from *Yucca schidigera* roezl, Life Sciences, Volume 75, Issue 12, Pages 1491-1501, ISSN 0024-3205, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.03.013>.
- Matuda, E., Piña, L. I. (1980). Las plantas mexicanas del género *yucca*. Colección miscelánea Estado de México. Toluca, Estado de México. Gobierno del estado de México. 143-145.
- McLaughlin S.P., Schuck S.M. (1992). Variación intraespecífica en las propiedades de la fibra en *Yucca elata* y *Hesperaloe funifera* (Agavaceae). Econ Bot 46, 181-186. Doi.org/10.1007/BF02930635.
- Medellin-Castillo, N.A., Padilla-Ortega, E., Regules-Martínez, C. M., Leyva-Ramos, R., Ocampo-Pérez, R., Carranza-Alvarez, C. (2017). Single and competitive adsorption of Cd(II) and Pb(II) ions from aqueous solutions onto industrial chili seeds (*Capsicum annuum*) waste, Sustainable Environment Research, Volume 27, Issue 2, Pages 61-69, ISSN 2468-2039, <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.01.004>.
- Molnár, Z., Virág, E. and Ördög, V. (2011). "Natural substances in tissue culture media of higher plants", Acta Biologica Szegediensis, 55(1), pp. 123-127. Available at: <http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2731>
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 473-497. Doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Nakashima, H., Matsuoka, Y., Yoshida, R. et al. (2016). La proporción de neutrófilos a linfocitos antes del tratamiento predice el resultado de la quimiorradioterapia y la supervivencia en pacientes con carcinoma oral de células escamosas: un estudio retrospectivo. BMC Cancer 16, 41. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2079-6>.
- Namdeo A.G. (2007). Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. Pharmacognosy Reviews. Phcog. Apocalipsis 1 69-79.
- Nehdia, I.A., Abutaha, N., Sbihi, H.M., Tan, C.P., Al-Resayes, S.I. (2015). Chemical composition, oxidative stability and antiproliferative activity of *Anethum graveolens* (dill) seed hexane extract. grasasaceites [Internet]. 2020Sep.15 [cited 2021Jun.19];71(3):e374. Available from: <https://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1841>.
- Nobécourt, P. (1943) Sur le développement de fragments aseptiques du tubercule de Chou-rave. Bulletin de la Société Botanique de France 90:9, pages 201-203. <https://doi.org/10.1080/00378941.1938.10834115>

- Patel S. (2012). *Yucca*: a medicinally significant genus with manifold therapeutic attributes. *Nat Prod Bioprospect.* 2:231–234. [Crossref], [Google Scholar]
- Pearlstein E., de Brer C., Gleeson M., Lewis A., Pickman S., Werden L. (2008). An examination of plant elements used for cahuilla baskets from southern california. *Journal of the American Institute for Conservation.* 47. 183-200. Doi.org/10.1179/019713608804539600.
- Pierik, R.L.M., Steegmans, H.H.M. (1983). Vegetative propagation of a chimerical *Yucca elephantipes* Regel *in vitro*, *Scientia Horticulturae*, Volume 21, Issue 3, Pages 267-272, ISSN 0304-4238, [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(83\)90100-0](https://doi.org/10.1016/0304-4238(83)90100-0).
- Rastogi S.C. (2007). *Biotechnology. Principles and Applications.* Oxford, U.K. Editorial alpha science international. ISBN-13: 978-1842653708.
- Ribereau-Gayon, P. (1972). Evolución de compuestos fenólicos durante la maduración de la uva, II- Discusión de los resultados obtenidos en 1969, 1970 y 1971. *OENO One* , 6 (2), 161-175. <https://doi.org/10.20870/oenone.1972.6.2.2058>
- Ringuelet J. et al. (2013). *Producto naturales y vegetales.* Facultad de ciencias agrarias y forestales. Editorial de la Universidad de la plata (EDULP). 119-120. ISBN 978-950-34-0971-8.
- Rocha, M., Buena-Ávila, S.V., Molina-Freaner, F., Arita, H.T., Castillo, A., García-Mendoza, A., Silva-Montellano, A., Gaut, B.S., Souza, V., and Eguiarte, L.E. (2006) "Pollination Biology and Adaptive Radiation of Agavaceae, with Special Emphasis on the Genus Agave," *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*: Vol. 22: Iss. 1, Article 27. available at: <https://scholarship.claremont.edu/aliso/vol22/iss1/27>
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2013. Comparative characterization of phenolic and other polar compounds in Spanish melon cultivars by using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Research International* 54, 1519-1527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.011>.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology.* Vol. 57:431-449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>.
- Sheldon, S. (1980). Ethnobotany of *Agave lecheguilla* and *Yucca carnerosana* in Mexico's Zona ixtlera. *Economic Botany*, 34(4), 376–390.
- Srinivasulu, C., Ramgopal, M., Ramanjaneyulu, G., Anuradha, C.M., Suresh-Kumar, C., 2018. Syringic acid (SA) – A Review of Its Occurrence, Biosynthesis, Pharmacological

and Industrial Importance. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108, 547-557.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.069>.

Suárez- Padrón I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. 6 77-305 Montería Colombia. ISBN 978-958-5104-09-9.

Taamalli, A., Arráez-Román, D., Abaza, L., Iswaldi, I., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., 2015. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochemical analysis* 26, 320-330. <https://doi.org/10.1002/pca.2566>.

Torres P., Avila A. J., de Vivar A.M. García J.C. Marín E. A., and Céspedes C.L. (2003). Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. 64(2), 463-473. Doi. org/10.1016/s0031-9422(03)00348-0.

Vermerris W., Nicholson R. (2008). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer Países Bajos. ISBN 978-1-4020-5163-0 Doi.org/10.1007 / 978-1-4020-5164-7.

Zhang, X., Lv, H., Li, Z., Jiang, K., Lee, M.-R., 2015. HPLC/QTOF-MS/MS application to investigate phenolic constituents from *Ficus pandurata* H. aerial roots. *Biomedical Chromatography* 29, 860-868. <https://doi.org/10.1002/bmc.3366>.

