



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES BIÓTICOS Y  
ABIÓTICOS EN LA ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *E. platyacanthus* y  
*T. lophophoroides***

PRESENTA

**GLADIS JUDITH SOLIS CASTAÑEDA**

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

TUTORES

**Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre**

**Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**

COMITÉ TUTORAL

**Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez**

**Aguascalientes, Ags., Mayo del 2019**





UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

**M. en C. JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**PRESENTE**

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **GLADIS JUDITH SOLIS CASTAÑEDA** con ID 101428 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS EN LA ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides***, 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, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATE NTAMENTE  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de mayo de 2019.

\_\_\_\_\_  
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre  
Cotutor de tesis

\_\_\_\_\_  
Dr. Eugenio Perez Molphe Balch  
Cotutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

**MÉXICO**  
GOBIERNO DE LA REPÚBLICA



DELEGACIÓN ESTATAL MORELOS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL SUR  
Argentina No. 1, Col Centro  
Xochitepec, Morelos., C.P. 62790



Xochitepec Morelos a 27 de mayo de 2019

**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**PRESENTE**

Por medio del presente como Asesor designado de la estudiante **GLADIS JUDITH SOLIS CASTAÑEDA** con ID 101428 quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS EN LA ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS TIPO FENÓLICO EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides***, 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:

Xochitepec, Mor., a 29 de mayo de 2019.

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez  
Miembro del Comité Tutorial (Asesor)

c.c.p. Interesado  
c.c.p.- Secretaria Técnica del Programa de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

**GLADIS JUDITH SOLIS CASTAÑEDA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS EN LA ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS TIPO FENÓLICO EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE *E. platycanthus* y *T. lophophoroides*”** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 29 de Mayo de 2019

*“Se lumen proferre”*

**EL DECANO**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José de Jesús Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.



## COPIA DE ACEPTACIÓN DE PUBLICACIÓN DEL ARTICULO

Yahoo Mail - Ad hoc: Editor to Author, copyedit in progress: IVPL-D-18-00245R1

5/20/19, 8:24 AM

Ad hoc: Editor to Author, copyedit in progress: IVPL-D-18-00245R1

---

De: David R. Duncan (em@editorialmanager.com)

Para: gomezze@yahoo.com

Fecha: miércoles, 17 de abril de 2019 4:16 p. m. CDT

---

In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant

Identification and quantitative determination of feruloyl-glucoside from hairy root cultures of *Turbinicarpus lophophoroides* (Cactaceae)

Gladis Judith Solis-Castañeda, Bachelor's Degree; Alejandro Zamilpa, Doctor's Degree; Emmanuel Cabañas, Master's Degree; Silvia Marquina, Master's Degree; Eugenio Pérez-Molphe-Balch, Doctor's Degree

Dear Dr. Aguirre,

The Associate Editor handling your submission has determined that it is acceptable for publication and it is currently in line for copyediting. Unfortunately, the software that the journal uses does not allow status updates once a manuscript enters the copyediting process. Your copyedited manuscript will be returned to you soon with a recommendation of "accept with minor revision". After you make the final modifications and address all of the questions that are included in the copyedited manuscript, your submission will be formally accepted for publication in In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. Please let me know if you have any additional questions.

Sincerely,

David R. Duncan, Ph. D. ([ivpeditor@sivb.org](mailto:ivpeditor@sivb.org))  
Editor in Chief  
In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ivpl/login.asp?a=r>) Please contact the publication office if you have any questions.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mis padres.

A mis hermanos.

A la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch.

Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

A la Dra. Silvia Marquina Bahena.

A Martita.

A Isaac, Ale, Lucy, Vicky, Ady, Krys, Lolita, Jonathan, Arturo.

A mis compañeros del área de Biotecnología Vegetal.

A mis compañeros y amigos de la 5ta Generación del Doctorado Directo en Ciencias  
Biológicas.

Al Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS).

Al Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos  
(CIQ-UAEM).

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su apoyo al proyecto PIBT16-6.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 614365.

Al Proyecto 1030 de Cátedras CONACyT.

**ÍNDICE GENERAL**

**RESUMEN.....10**

**ABSTRACT .....11**

**INTRODUCCIÓN .....13**

**1. ANTECEDENTES .....15**

**1.1. GENERALIDADES DE *E. platyacanthus* .....16**

**1.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *E. platyacanthus* .....16**

**1.1.2. USOS DE *E. platyacanthus* .....17**

**1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *E. platyacanthus* .....18**

**1.2. GENERALIDADES DE *Turbinicarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. & Backeb .....18**

**1.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *T. lophophoroides* .....19**

**1.2.2. USOS DE *T. lophophoroides* .....19**

**1.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *T. lophophoroides* .....19**

**1.3. CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS .....20**

**1.4. INDUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES *in vitro* .....24**

**2. JUSTIFICACIÓN .....27**

<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>28</b>
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1. CULTIVOS DE TEJIDOS <i>in vitro</i> DE <i>E. platyacanthus</i> Y <i>T. lophophoroides</i> ..</b>	<b>29</b>
<b>5.1.1. Multiplicación de brotes .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.2. Mantenimiento de cultivos de raíces transformadas .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.3. Análisis histoquímico de GUS (<math>\beta</math>-glucoronidasa).....</b>	<b>29</b>
<b>5.2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS EN AGITACIÓN DE <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.1. Efecto de la luz y el medio de cultivo en el crecimiento de raíces transformadas de <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>5.3. EFECTO DE INDUCTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES EN <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>5.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>5.6. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL FERULOIL GLUCÓSIDO EN CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE <i>T. lophophoroides</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>5.6.1. Obtención de extractos .....</b>	<b>34</b>

5.6.2. Fraccionamiento del extracto metanólico de raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> .....	35
5.6.3. Purificación de la fracción C1F8 .....	36
5.6.4. Purificación de la fracción C1F15 .....	37
5.6.5. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF) .....	38
5.6.6. Elucidación química-estructural por técnicas de espectrometría y espectroscopía	38
5.7. CUANTIFICACIÓN DEL FERULOIL GLUCÓSIDO EN <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i> POR CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN ....	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
6.1. CULTIVOS DE TEJIDOS <i>in vitro</i> DE <i>E. platyacanthus</i> Y <i>T. lophophoroides</i> ..	41
6.1.1. Multiplicación de brotes .....	41
6.1.2. Mantenimiento de cultivos de raíces transformadas .....	41
6.1.3. Análisis histoquímico de GUS ( $\beta$ -glucoronidasa).....	42
6.2. EFECTO DE LA LUZ Y EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE <i>E. platyacanthus</i> Y <i>T. lophophoroides</i> .....	42
6.2.1. Evaluación del crecimiento de raíces transformadas de <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i> en medio B5 en agitación en condiciones de luz en fotoperiodo y oscuridad.....	42
6.2.2. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio MS líquido en la oscuridad de <i>E. platyacanthus</i> .....	44

6.2.3. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio MS líquido en la oscuridad de <i>T. lophophoroides</i> .....	46
6.2.4. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio B5 líquido en la oscuridad de <i>T. lophophoroides</i> .....	48
6.3. EFECTO DE INDUCTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS EN <i>E. platyacanthus</i> 50	
6.3.1. Ácido salicílico .....	50
6.3.2. Metil jasmonato.....	53
6.4. EFECTO DE INDUCTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS EN <i>T. lophophoroides</i> 56	
6.4.1. Ácido salicílico .....	56
6.4.2. Metil jasmonato.....	61
6.4.3. Ácido abscísico.....	65
6.4.4. Quitosano .....	71
6.5. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS MAYORITARIOS..	77
7. CONCLUSIONES.....	86
8. BIBLIOGRAFÍA.....	88
9. ANEXO A. CURVAS DE CALIBRACIÓN .....	95
9.1. ANEXO B. MANUSCRITO.....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ejemplos de compuestos fenólicos producidos en cultivo de raíces transformadas .....	23
Tabla 2. Fraccionamiento del extracto metanólico de raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> .....	35
Tabla 3. Purificación de la fracción C1F8 del extracto metanólico de raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> . .....	36
Tabla 4. Purificación de la fracción C1F15 del extracto metanólico de raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> . .....	37
Tabla 5. Cuantificación del feruloil glucósido (FG) en raíces transformada de <i>T. lophophoroides</i> .....	58
Tabla 6 Cuantificación del feruolil glucósido en raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> .....	63
Tabla 7 Cuantificación del feruloil glucósido en raíces transformada de <i>T. lophophoroides</i> expuestas a ácido absícico.....	68
Tabla 8. Cuantificación del feruloil glucósido en raíces transformada de <i>T. lophophoroides</i> sometidas a Quitosano.....	74
Tabla 9 Comparación de los datos de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C obtenidos para feruloil glucósido con datos ya reportados. Los patrones de fragmentación y las constantes de acoplamiento (J, en Hz) aparecen en paréntesis. ....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplares de <i>E. platyacanthus</i> en el jardín regional botánico de Cadereyta “Ing. Manuel González de Cosío”.....	17
Figura 2. Ejemplar adulto de <i>T. lophophoroides</i> Smith et al. (2017).....	19
Figura 3. Diagrama de flujo de la inducción de raíces transformadas y algunas de sus aplicaciones (Georgiev, Pavlov, & Bley, 2007).....	21
Figura 4. Espectro de absorción de distintas fuentes de luz utilizadas para radiación en cultivos <i>in vitro</i> de <i>L. alba</i> .....	27
Figura 5. Fraccionamiento del extracto metanólico de raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> y aislamiento del feruloil glucósido.....	36
Figura 6. Brotes cultivados en condiciones <i>in vitro</i> durante 8 meses. ....	41
Figura 7. Aspecto de las raíces transformada subcultivadas en medio MS semisólido. ....	41
Figura 8. Análisis histoquímico de GUS en raíces transformadas de <i>E. platyacanthus</i> subcultivadas en medio semisólido MS en condiciones de a) fotoperiodo (16/8 h) y de b) oscuridad .....	42
Figura 9. Análisis histoquímico de GUS en raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> subcultivadas en medio semisólido MS en condiciones de a) fotoperiodo (16/8 h) y de b) oscuridad. ....	42
Figura 10. Crecimiento de <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i> en medio líquido B5 bajo condiciones de luz y oscuridad con agitación (80 rpm).....	43
Figura 11. Aspecto de las raíces transformadas de <i>E. platyacanthus</i> y <i>T. lophophoroides</i> después de 28 días de crecimiento en B5 en agitación y condiciones de luz en fotoperiodo 16/8h y oscuridad. ....	44
Figura 12. Consumo de carbono (azúcares totales) durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas de <i>E. platyacanthus</i> en medio líquido MS en oscuridad. ....	45
Figura 13. Aspecto de las raíces transformadas de la cinética de crecimiento en medio líquido MS en agitación (80 rpm) de <i>E. platyacanthus</i> . ....	46
Figura 14. Consumo de carbono (azúcares totales) durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> en medio líquido MS en oscuridad.....	47
Figura 15. Aspecto de las raíces transformadas de la cinética de crecimiento en medio líquido MS de <i>T. lophophoroides</i> en oscuridad y en agitación constante (80 rpm).. ....	47
Figura 16. Consumo de carbono (azúcares totales) durante el crecimiento y cinética de crecimiento de raíces transformadas de <i>T. lophophoroides</i> en medio líquido B5 en oscuridad .....	48
Figura 17. Aspecto de las raíces transformadas de la cinética de crecimiento en medio líquido B5 en agitación (80 rpm) de <i>T. lophophoroides</i> . ....	49
Figura 18. Separación de compuestos fenólicos por CCF en el extracto metanólicos de raíces transformadas de <i>E. platyacanthus</i> .....	50

Figura 19. Determinación de compuestos fenólicos en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidos por ácido salicílico a concentraciones .....51

Figura 20. Determinación de flavonoides en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM. ....52

Figura 21. Determinación de actividad antioxidante en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM. ....52

Figura 22. Separación por CCF de compuestos fenólicos de raíces transformadas de *E. platyacanthus*. .....53

Figura 23. Determinación de compuestos fenólicos totales en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu$ M. ....54

Figura 24. Determinación de flavonoides en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu$ M. ....54

Figura 25. Determinación de capacidad antioxidante en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu$ M. ....55

Figura 26. Separación por CCF de compuestos fenólicos de raíces transformadas de *T. lophophoroides*. ....56

Figura 27. Cromatograma de CLAR (detección 325 nm) de extractos de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con ácido salicílico a 1 mM .....57

Figura 28. Determinación de compuestos fenólicos en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.01mM, 0.1 mM y 1.0 mM .....59

Figura 29. Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM. . ....60

Figura 30. Determinación de actividad antioxidante en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.01 mM, 0.1 mM y 1.0 mM. ....60

Figura 31. Aspecto de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas en medio en agitación B5 a 80 rpm y 25+ 2 ° C con distintas concentraciones de metil jasmonato. ....61

Figura 32. Separación de compuestos fenólicos por CCF de raíces transformadas de *T. lophophoroides*. ....62

Figura 33. Cromatograma de HPLC (detección 325 nm) del extracto de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con ácido metil jasmonato 200  $\mu$ M (200  $\mu$ M). ....63

Figura 34. Determinación de compuestos fenólicos totales en raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu$ M. ....64

Figura 35. Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu$ M. ....64

Figura 36. Determinación de capacidad antioxidante en raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu$ M. ....65

Figura 37. Aspecto de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas en medio en agitación B5 a 80 rpm y 25+2° C con distintas concentraciones de ácido abscísico. ....66

Figura 38. Separación por CCF de compuestos fenólicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides*). ...67

Figura 39. Cromatograma de CLAR (detección 325 nm) de extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con ácido abscísico 60  $\mu$ M (ABA 60  $\mu$ M). .....67

Figura 40. Determinación de compuestos fenólicos totales en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de ácido abscísico.....69

Figura 41. Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de ácido abscísico.....70

Figura 42. Determinación de actividad antioxidante en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de ácido abscísico.....70

Figura 43. Aspecto de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas en medio en agitación B5 a 80 rpm y 25+2° C con distintas concentraciones de Quitosano. ....71

Figura 44. Separación por CCF de compuestos fenólicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides* .....72

Figura 45. Cromatograma de HPLC (detección 325 nm) de muestras (4mg/mL) corridas en equipo Waters correspondientes al extracto de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con quitosano 400 mg/L. ....73

Figura 46. Determinación de compuestos fenólicos totales en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de Quitosano. ....75

Figura 47. Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de Quitosano. ....76

Figura 48. Determinación de actividad antioxidante en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de Quitosano. ....77

Figura 49. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides*.....78

Figura 50. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C1F8 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=29.99 minutos. ....78

Figura 51. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C1F13 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.777 minutos. ....79

Figura 52. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C1F14 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.851 minutos. ....79

Figura 53. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C2F10 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=28.508 minutos.....80

Figura 54. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C3F15 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.821 minutos. ....80

Figura 55. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C3F18 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.900 minutos. ....80

Figura 56. Cromatograma de UPLC de la fracción C1F13 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=6.77 minutos. ....81

Figura 57. Espectro de masas de la fracción C1F13 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* .....81

Figura 59. HMBC de correlaciones de RMN de 1H y 13C.....82

Figura 60. Feruloil glucósido.....83

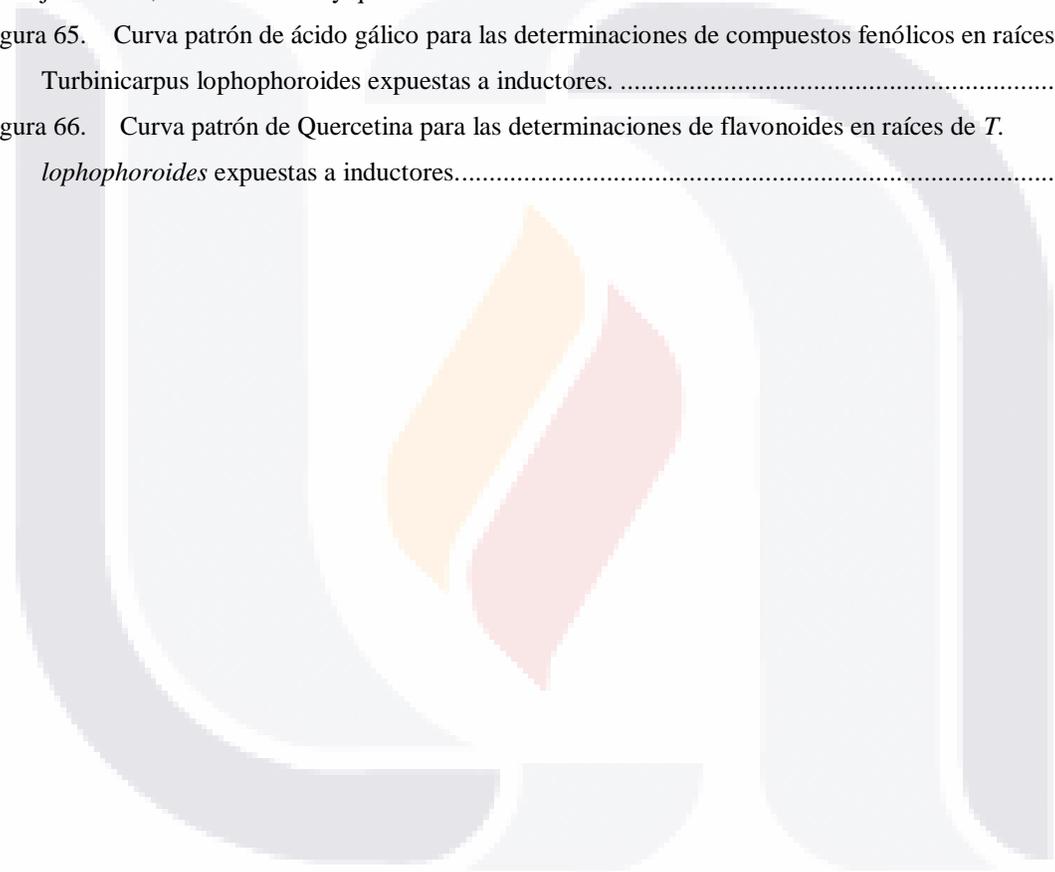
Figura 62. Curva patrón de ácido gálico para las determinaciones de compuestos fenólicos en raíces de *E. platyacanthus* expuestas a inductores. ....95

Figura 63. Curva patrón de Quercetina para las determinaciones de flavonoides en raíces de *E. platyacanthus* expuestas a inductores.....95

Figura 64 Curva patrón de feruloil glucósido para cuantificación en inducción por ácido salicílico, metil jasmonato, ácido abscísico y quitosano. ....96

Figura 65. Curva patrón de ácido gálico para las determinaciones de compuestos fenólicos en raíces de *Turbinicarpus lophophoroides* expuestas a inductores. ....96

Figura 66. Curva patrón de Quercetina para las determinaciones de flavonoides en raíces de *T. lophophoroides* expuestas a inductores.....97



## RESUMEN

Las especies de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto y *Turbinicarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. & Backeb pertenecen a la familia Cactaceae, son de importancia por su uso medicinal, ornamental y alimenticio. Estas especies están sujetas a protección especial por la NOM-059-SEMARNAT-2010. Las técnicas de cultivos de células y tejidos vegetales *in vitro* favorecen el crecimiento de especies libres de microorganismos, independiente de las condiciones ambientales y permiten contar continuamente con material vegetal para el análisis de compuestos de interés. El objetivo general fue evaluar la influencia de moléculas inductoras del estrés biótico y abiótico en la acumulación de compuestos fenólicos en cultivos de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*; como objetivos particulares, se analizó la producción de biomasa de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* en medio Murashige and skoog (MS) y Gamborg B5 (B5), así como se aisló, identificó y cuantificó el feruloil-glucosido por técnicas cromatográficas y espectroscópicas en los extractos metanólicos de brotes y raíces transformadas de las dos especies, cultivadas en condiciones *in vitro*. La mayor producción de biomasa de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* cultivadas en medio MS fue de  $13.67 \text{ g L}^{-1}$  en base seca a los 77 días de cultivo y en medio B5 fue  $8.10 \text{ g L}^{-1}$  a los 56 días de cultivo. Se aisló e identificó el feruloil-glucosido por resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría masas en los extractos metanólicos de raíces transformadas de *T. lophophoroides*. Se cuantificó el feruloil-glucosido (FG) en los brotes y raíces transformadas de *T. lophophoroides* por cromatografía líquida de alta resolución. El contenido de dicho compuesto en raíces transformadas en medio de cultivo MS fue de  $2.7267 \pm 0.041 \text{ mg/g}$  de biomasa seca/L y en medio de cultivo B5 fue de  $2.4372 \pm 0.026 \text{ mg/g}$  de biomasa seca/L y no se detectó presencia del FG en los brotes. Se determinó el contenido de FG en raíces transformadas de ambas especies expuestas a tres moléculas inductoras de estrés biótico: ácido salicílico (AS), metil jasmonato (MJ) y quitosano (Q) y una molécula de estrés abiótico: ácido abscísico (AA). En todos los tratamientos de estrés la acumulación de compuestos fenólicos fue menor en comparación con el testigo. Los cultivos de raíces transformadas son una alternativa para la obtención de metabolitos secundarios. El feruloil-glucósido es un agente con propiedades antidiabética y

hepatoprotectiva, así como de blanqueamiento y se ha identificado por primera vez en *T. lophophoroides*.

## ABSTRACT

*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto and *Turbinicarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. & Backeb belong to Cactaceae family, these species are important because of its medicinal, ornamental and nutritional uses. These species are subjected to special protection by NOM-059-SEMARNAT-2010. *In vitro* plant cell and tissue culture techniques improve microorganism-free growth, independent of environmental conditions and allow to count with enough material plant for the analysis of interesting compounds. The main objective was to evaluate the influence of biotic and abiotic stress inducing molecules in the accumulation of phenolic compounds in *E. platyacanthus* hairy roots and *T. lophophoroides* hairy roots; as particular objectives, it was analyzed biomass production of *Echinocactus platyacanthus* hairy roots and *Turbinicarpus lophophoroides* hairy roots in Murashige and Skoog (MS) and Gamborg B5 (B5) mediums, as well as feruloyl-glucoside was isolated, identified and quantified by chromatographic and spectroscopic techniques from methanolic extracts of hairy roots of both *in vitro* cultured species. The highest biomass production of *T. lophophoroides* hairy roots cultured in MS medium was 13.67 gL<sup>-1</sup> dry weight base at day 77 of culture, in other side, B5 medium was 8.10 g L<sup>-1</sup> at day 56 of culture. The feruloyl-glucoside was isolated and identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and mass spectrometry in methanolic extracts of *T. lophophoroides* hairy roots. Feruloyl glucoside (FG) was quantified in *T. lophophoroides* shoots and hairy roots by high performance liquid chromatography. The content of this compound in hairy roots in MS culture medium was 2.7267 ± 0.041 mg/ g of dry biomass/L and in B5 medium was 2.4372 ± 0.026 mg/ g of dry biomass/L and the presence of feruloyl-glucoside was not detected in the shoots. Content of FG was analyzed in hairy roots of both species exposed to three biotic stress inducing molecules: salicylic acid (AS), methyl jasmonate (MJ) and chitosan (Q) and an abiotic stress inducing molecule: abscisic acid (AA). In every stress treatment the accumulation of phenolic compounds was lower than control test. Hairy roots cultures are a source of secondary metabolites. Feruloyl glucoside is a compound with antidiabetic and

hepatoprotective activities, as well as a compound with whitening proprieties that has been identified for the first time in *T. lophophoroides*.



## INTRODUCCIÓN

El ser humano a lo largo de su evolución, ha desarrollado técnicas de sobrevivencia basadas en el uso de la naturaleza para proveerse de alimentos y materiales para su protección y beneficio, ha mejorado su alimentación y los hábitos, ha sabido explotar la naturaleza casi en su totalidad gracias a la exploración de la misma y el desarrollo del conocimiento empírico que ha dejado plasmado en su historia y a lo largo de su existencia en forma de teorías o leyes que han funcionado hasta nuestros tiempos. Así pues, las plantas y los animales son los principales proveedores para el hombre de casi la totalidad de sus requerimientos como lo son sus alimentos, sus materiales e incluso la cura a sus enfermedades. Esto es, las especies vegetales, animales, minerales entre otras fuentes, han contribuido a su salud. Como ejemplo, las cactáceas (Shetty, Rana, & Preetham, 2012).

La familia Cactaceae originaria de América, comprende tres subfamilias de plantas perennes (Pereskioideae, Cactoideae y Opuntioideae) (Anderson, 2001). Las estructuras anatómicas de adaptación altamente especializadas de las especies de Cactaceae les imparten una fisionomía particular, pues el medio árido y desértico en el cual se desarrollan, los tipos de polinización que experimentan, etc. propician sus características. En México, los estudios demográficos de las Cactaceae son particularmente importantes debido a que es el mayor centro de diversificación para esta familia, hay muchas especies endémicas y varias de ellas se encuentran en peligro de extinción (Castañeda-Romero et al., 2016; Salas de León, García Mendoza, Reyes Agüero, & Villar Morales, 1999).

Se han reportado una gran cantidad de componentes químicos en las especies de Cactaceae, entre ellos ácidos orgánicos, carbohidratos, aceites, látex, mucílago, terpenos, resinas, pigmentos, alcaloides, triterpenos, betalaínas y esteroides (Anderson, 2001; Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991). Sin embargo, estas plantas son de muy lento crecimiento tienen una distribución geográfica limitada (Salas de León et al., 1999), y además una gran cantidad de sus especies se encuentran en peligro de extinción según la NOM-059-SEMARTANT-2010, como es el caso de *Echinocactus platyacanthus* y *Turbincarpus lophophoroides*

(Semarnat, 2010a). El desarrollo de cultivos *in vitro* de estas especies, permite producir plantas en corto tiempo y en un espacio mínimo (Pérez-Molphe-Balch, Santos-Díaz, Ramírez-Malagón, & Ochoa-Alejo, 2015).

Se han empleado herramientas biotecnológicas con el objetivo de conservar las especies y a la vez aprovechar sus cualidades medicinales u obtener metabolitos secundarios de relevancia para el ser humano (Isah et al., 2017). Los cultivos de raíces peludas inducidas por *Agrobacterium rhizogenes*, han recibido una atención creciente como plataforma de producción para diversas clases de metabolitos secundarios, debido a que pueden reproducir la capacidad biosintética de la planta completa (Ono & Tian, 2011). Las raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* han sido estudiadas para la producción de alcaloides (Dávila-Figueroa, Lourdes de la Rosa-Carrillo, & Pérez-Molphe-Balch, 2005; Palomeque-Carlin, 2015; Palomeque-Carlin, Tafoya, Alpuche-Solís, & Pérez-Molphe-Balch, 2015).

Por otra parte, los compuestos fenólicos son fuente de antioxidantes naturales para el uso potencial en la industria alimenticia y cosmética (Sato et al., 2011). Mediante el uso de moléculas señal o inductores es posible estimular o incrementar la biosíntesis de éstos metabolitos secundarios (Nair, Panneerselvam, Gopi, & Hong-bo, 2013). Científicamente hay estudios limitados sobre *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* en cuanto a su composición química. El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la influencia de los inductores bióticos (ácido salicílico, metil jasmonato y quitosano) y abiótico (ácido abscísico) en la acumulación de compuestos fenólicos en cultivos de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*.

## 1. ANTECEDENTES

La familia Cactaceae es originaria de América y representa su máxima diversidad e importancia en el territorio mexicano (Anderson, 2001). Existen alrededor de 130 géneros y 2,000 especies de Cactaceae en el mundo, de las cuales 62 géneros y 677 especies se encuentran en México y 518 endémicas (Santos-Díaz, Pérez-Molphe, Ramírez-Malagón, Núñez-Palenius, & Ochoa-Alejo, 2010; Villaseñor, 2016a). Crecen bajo condiciones de escasas de humedad, aunque también se encuentran en lugares cálidos y húmedos. Se distribuyen en los desiertos de Chihuahua y Sonora, algunos valles de Hidalgo, Querétaro, Puebla y Oaxaca (la región de Tehuacán-Cuicatlán) (Miguel-Talonia, Téllez-Valdés, & Murguía-Romero, 2014; Villaseñor, 2016a).

La familia Cactaceae se divide en 3 subfamilias: Opuntioideae, Cactoideae y Pereskioideae. La subfamilia Opuntioideae son los nopales (del náhuatl nopalli, de noctli, tuna y palli, hoja) y el xoconostle (del náhuatl, xococ, agrio y noctli, tuna, “tuna agria”), de tallos aplanados como raquetas y con frutos como lo son las tunas. Se incluyen además las chollas y tencholotes, de tallos cilíndricos delgados cubiertos de espinas. La subfamilia Cactoideae son cactus alargados, chaparros y redondos en forma de barril y candeladros. Se conocen como órganos, cardonales, candelabros, biznagas, liendrillas, borregos, peyotes, chiotillas, jiotillas, quiotillas, garambullos o padrenuestros, pitayas, pitayo de abuelito, tetechos, cabezas de viejos, viejos y viejitos. Algunas de estas especies pueden vivir más de 500 años. La subfamilia Pereskioideae es el tercer grupo e incluye pocas especies conocidas como cactus con hojas o árbol del matrimonio, que se consideraban los cactus más primitivos (Anderson, 2001)

La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, cuyo objetivo es identificar las especies o poblaciones de flora y fauna silvestre en riesgo en la República Mexicana, se enlista 275 especies y subespecies de la familia de las Cactaceae, encontrando que 28 de ellas están clasificadas como peligro de extinción, 86 como amenazadas y 161 como sujetas a protección especial. En el caso particular de *Echinocactus platyacanthus* Link & Otto y

*Turbincarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. & Backeb, son dos especies que se encuentran dentro de la categoría “sujetas a protección especial” (Semarnat, 2010a).

### 1.1. GENERALIDADES DE *E. platyacanthus*

El género *Echinocactus* fue establecido por Link y Otto en 1905 ilustrando 14 especies, sin embargo, contiene 138 especies y han sido usados más de 1,025 nombres en este género. *Echinocactus* proviene del griego y significa “erizo o cactus” que se refiere a un armamento espinoso (Britton & Rose, 1963).

*E. platyacanthus* ha sido un componente cultural del centro de México desde la época prehispánica, junto con especies del género *Ferocactus*, se conocen como *comitl* lo que significa olla o vasija, por su parecido a estos recipientes, o *huitznahuac* (*huitzli*=espinas y *nahuac*=rodeado o rodeado por espinas) en lenguaje Nahuatl. En castellano, el nombre común para *E. platyacanthus* es biznaga caballona o biznaga de lana (Del Castillo & Trujillo, 1991).

*E. platyacanthus* es endémica del México, crece entre los 1100 y 2400 m.s.n.m., se han localizado en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán en Puebla y Oaxaca (Jiménez-Sierra, Mandujano, & Eguiarte, 2007), en la reserva de la biósfera “Barranca de Metztitlán”, Hidalgo (Castañeda-Romero et al., 2016) y en el desierto de Chihuahua en el altiplano potosino en San Luis Potosí (Aragón-Gastélum et al., 2017).

#### 1.1.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *E. platyacanthus*

Son de forma globular a poco oblongada (figura 1a), de 50 a 200 cm de altura, 60 a 80 cm de diámetro, tendiendo a color verde-azulado, algo violáceo muy lanudo en la parte superior (figura 1b); de 8 costillas obtusas; con areolas grandes distantes entre sí 2.5 cm con abundante lana amarilla; cada una con 8 espinas marrón, rectas, rígidas, de 2 a 3 cm de largo y 3 cm de ancho; flores dentro de la lana del ápice (figura 1c), diurnas de 5 a 7 cm de diámetro y 3 cm de largo. Nectarios en la periferia del estilo, formando una cavidad de cerca de 1 cm de

profundidad, estambres, entre 1 400 a 2 500 con filamentos amarillos, anteras de color cromo. El estilo grueso, de 3 a 3.5 cm de longitud, amarillento, estriado longitudinalmente, estigma presenta de 10 a 12 lóbulos; fruto ovoide de 3 cm de longitud copiosamente cubierto de la lana procedente de las axilas de las pequeñas escamas, los lóbulos del estigma color rojo ladrillo siendo aproximadamente 8; las semillas son grandes, negras, brillantes y en forma de riñón, cada fruto pueden contener en promedio  $171 \pm 11.03$  semillas. El establecimiento y la supervivencia de las plántulas son bajos y la fecundidad aumenta a medida que aumenta el diámetro de los individuos (Britton & Rose, 1963; Jiménez-Sierra et al., 2007).

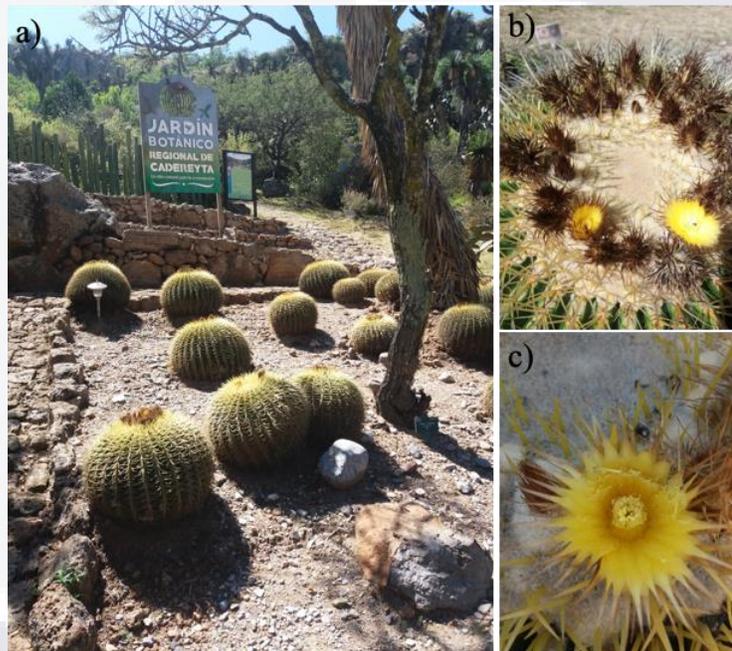


Figura 1. Ejemplares de *E. platyacanthus* en el jardín regional botánico de Cadereyta “Ing. Manuel González de Cosío”. a) Población adulta, b) ápice hundido con abundante lana amarilla y c) flor. (Fotografía tomada por Gómez-Aguirre Y.A. en 2017)

### 1.1.2. USOS DE *E. platyacanthus*

En tiempos precolombinos fue cactus sagrado que se usaban para sacrificios, como alimento y medicina. El indumento apical de plantas adultas de *E. platyacanthus* “lana de biznaga” tiene una consistencia similar a la del algodón con un color amarillo pálido, el cual se usaba como relleno y se hilaba. Se ha descrito que la pulpa de la biznaga era usada como un remedio para dolores menstruales, de cabeza y pecho; para la industria de la confitería como dulces

de acitron y queso de conserva, éste último se prepara con miel de maguey y *E. platyacanthus*; además es fuente de alimento y agua para cabras. La forma distintiva de las biznagas las convierte en una planta favorita para la jardinería en las ciudades, y por esta misma situación, se han exportado ilegalmente a Europa, Japón y Estados Unidos. También se usan como elementos decorativos en “nacimientos” en época de navidad (Del Castillo & Trujillo, 1991).

### **1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *E. platyacanthus***

En cuanto a la química de *E. platyacanthus*, la parte suculenta del tallo o parénquima contiene  $\beta$ -sitosterol, alcaloides, flavonoides y es rico en galactosa y ramnosa (Dominguez, Rojas, Gutiérrez, Armenta, y de Lara, 1969; Dominguez, Escarria, y Pérez, 1970). El parénquima de *E. platyacanthus* contiene numerosos oxalatos agregados, lo cual le confiere la textura dura (Del Castillo & Trujillo, 1991).

### **1.2. GENERALIDADES DE *Turbinicarpus lophophoroides* (Werderm.) Buxb. & Backeb**

El género *Turbinicarpus* incluye 24 especies y varias subespecies de cactus pequeños y globosos que habitan áreas con piedra caliza a lo largo del norte de México, desde Coahuila al sur de Guanajuato (Glass, 1998; Anderson, 2001). *T. lophophoroides* es una especie endémica de San Luis Potosí, México y se encuentra en la lista roja de especies amenazadas de la Unión internacional para la conservación de la naturaleza y recursos naturales (IUCN, por sus siglas en ingles International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) (Smith, Fitz Maurice, Fitz Muarice, & Sotomayor, 2017).



Figura 2. Ejemplar adulto de *T. lophophoroides* Smith et al. (2017).

### 1.2.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *T. lophophoroides*

Plantas con un solo tallo, de forma globosa hasta conoidea, de 2.5 a 3.5 cm de altura y 4 a 4.5 cm de diámetro, de color azul glauco grisáceo a verde azulado. Tubérculos tetragonal o hexagonal amplios y aplanados de 2 a 4 mm de altura, de color verde oscuro. Areolas oblongas, de 2 a 2.5 mm de longitud, 1 mm de diámetro. Espinas radiales 3 o 5, dispuestas en cruz, de 4 a 8 mm de longitud, subuladas y delgadas, rígidas, blanquecinas. Espina central 1, de 10 mm de longitud, forma curvada, rígida, curvada hacia arriba, lisa y negruzca o áspera y grisácea, sub-pungente a pungente y leñosas. Flores infundibuliforme (en forma de campana), de 25 mm de longitud y 35 mm de diámetro, de color blanco a rosado; estambres relativamente escasos. El fruto globoso de 4 mm de diámetro y 6 mm de longitud, de color verde oscuro a rojizo. Semillas tuberculada con la testa finamente rugosa, de cerca de 1 mm de longitud y 0.9 mm de diámetro, negras a castaño rojizas. Raíz con forma de nabo (Bravo-Hollis & Sánchez-Mejorada, 1991; Martínez-Ávalos, Martínez Gallegos, & Backer Kurt, 2011). A nivel microscópico, las células epidérmicas tienen paredes periclinales externas lisas con un diámetro de  $8 \pm 1.9 \mu\text{m}$ , espesor de la pared celular de  $2.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$  (Mosco, 2009).

### 1.2.2. USOS DE *T. lophophoroides*

Su popularidad radica en su alto valor ornamental (Glass, 1998; Anderson, 2001).

### 1.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *T. lophophoroides*

Se han identificado los alcaloides  $\beta$ -fenetil-amina ( $1.04 \pm 0.27 \%$ ), tiramina ( $1.82 \pm 0.17\%$ ), N-metil-tiramina ( $0.13 \pm 0.11\%$ ), hordenina ( $91.69 \pm 0.54\%$ ), mescalina (trazas), N-metil-mescalina ( $0.51 \pm 0.11\%$ ), O-metil-analidina ( $0.55 \pm 0.02\%$ ), analinina ( $0.15 \pm 0.08\%$ ), analonidina ( $2.37 \pm 0.12\%$ ) y pelletina ( $0.46 \pm 0.08\%$ ) en *T. lophophoroides* (Štarha, Chybidziurová, & Lacný, 1999).

### 1.3. CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS

La inducción de las raíces transformadas se logra a partir de la infección por *Agrobacterium rhizogenes* de plantas susceptibles (principalmente en gimnospermas y especies de dicotiledones). *Agrobacterium* es un género de bacterias que pertenece a la clase *Proteobacteria*, familia *Rhizobiaceae*. Incluye especies fitopatógenas como *A. rhizogenes*, que contienen un plásmido denominado Ri, el cual induce la proliferación de raíces adventicias (Alippi, López, & Balatti, 2011). Éste fenómeno resulta de un mecanismo molecular en el cual los genes *rol* de la bacteria transfieren ADN del plásmido Ri al genoma de la planta, el cual no ha sido comprendido completamente; sin embargo, el proceso de transformación genética puede dividirse en los siguientes pasos: (1) cuando las plantas susceptibles son heridas, producen sustancias fenólicas simples como acetosiringona que induce a los genes de virulencia localizados en el plásmido de *Agrobacterium*; (2) se procesa el ADN transferido (T-ADN) en células bacterianas y formación del complejo T (cadenas T y proteínas asociadas); (3) transferencia de los complejos T (a través del sistema de secreción de proteínas de tipo IV; T4SS) de las bacterias al genoma de la planta hospedera; (4) integración de T-ADN y expresión en el genoma de la planta; y (5) formación de raíces peludas (Georgiev, Agostini, Ludwig-Muller, & Xu, 2012).

El procedimiento de la transformación (figura 3), se realiza en plantas heridas o en explantes a través de la inoculación con una suspensión de *A. rhizogenes* en condiciones asépticas, después de una a cuatro semanas, cuando las raíces han emergido en el sitio de inoculación,

se cortan del explante y se transfieren en medio de cultivo libre de regulador de crecimiento, por ejemplo, Murashigue and Skoog (MS) o Gamborg B5 (B5) con antibiótico para eliminar a la bacteria (Sevón & Oksman-Caldentey, 2002).

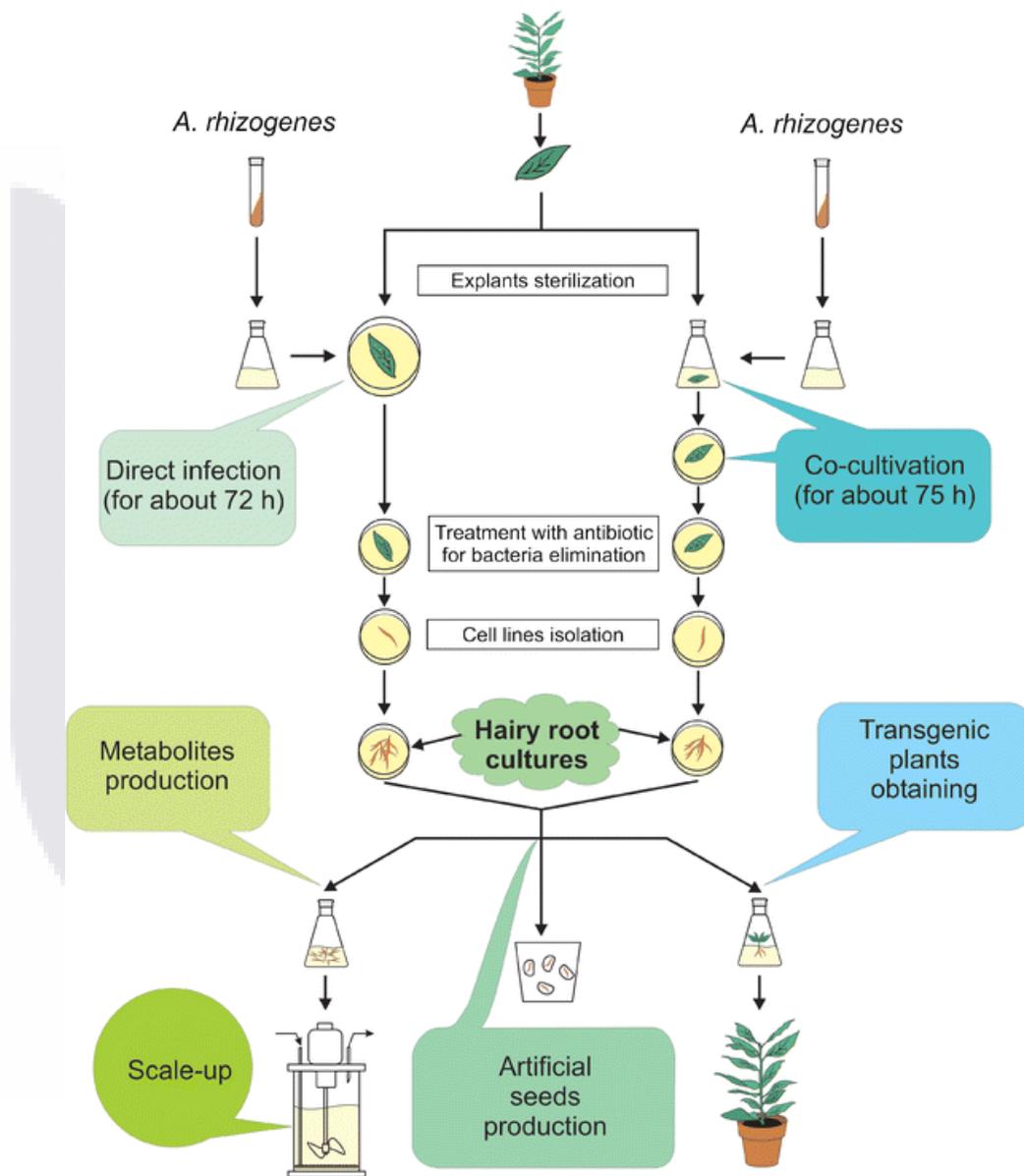


Figura 3. Diagrama de flujo de la inducción de raíces transformadas y algunas de sus aplicaciones (Georgiev, Pavlov, & Bley, 2007)

En las construcciones genéticas que se diseñan para la transformación de células vegetales, es común introducir además del gen de interés, otros dos tipos de genes, un gen de selección

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y un gen reportero. El gen de selección, codifica una enzima capaz de inactivar un antibiótico particular que se adiciona al medio de cultivo para la morfogénesis *in vitro*; cuya función es permitir solamente la regeneración de las células que adquirieron la información, generalmente se utiliza el gen NPT II (neomicina fosfotransferasa II) o el gen CAT (cloranfenicol acetiltransferasa) que confieren resistencia a kanamicina y a cloranfenicol, respectivamente. Los genes reporteros evidencian desde fases tempranas y de manera directa a las células transformadas. El gen más utilizado para este propósito es el gen GUS (proveniente de *Escherichia coli*). Este gen codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa ( $\beta$ -D-glucoronida glucanohidrolasa) y se caracteriza en primer lugar, porque la enzima se mantiene estable a altas temperaturas, resiste la fijación histoquímica y su expresión se detecta fácilmente en el tejido. Su expresión se hace evidente por el típico color azul que adquiere la célula transformada debido a la hidrólisis de sustratos colorigénicos, como el *p*-nitrofenilglucoronida (PNPG, X-gluc), el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucoronida (Xgluc); o fluorogénicos como el 4 metil-umbeliferilglucoronida (MUG), entre otros (Naleway, 1992). La importancia de utilizar el gen GUS como reportero radica en que la mayoría de los eucariontes, pero especialmente las plantas, tienen una baja o nula actividad endógena detectable de esta enzima; finalmente, su expresión transitoria se hace evidente a las pocas horas de realizada la transformación, lo que implica que la información introducida se encuentra en el núcleo y está siendo traducida (Stomp, 1992).

Las ventajas de las raíces transformadas son que tienen la habilidad de crecer sin necesidad de hormonas en el medio; se generan las raíces de manera rápida; son estables bioquímica y genéticamente; y tienen la capacidad de organogénesis asociada a la síntesis de metabolitos (Sevón & Oksman-Caldentey, 2002; Shanks & Morgan, 1999). Sumado a esto, la generación de raíces transformadas, así como el uso y desarrollo de biorreactores provee caminos para hacer posible el escalamiento de cultivo de raíces transformadas de pequeña escala a sistemas de procesos de escala industrial (Mehrotra, Srivastava, Ur Rahman, & Kukreja, 2015). Los cultivos de raíces transformadas ofrecen la posibilidad para aislar y sintetizar nuevos compuestos con potencial valor farmacéutico (Georgiev et al., 2007). Como ejemplos, en la tabla 1, se muestran algunos cultivos de raíces transformadas que sintetizan compuestos

fenólicos, como flavonoles, ácidos hidroxininamicos y ácidos hidroxibenzoicos en familias botánicas como Asteraceae y curcubitaceae. No se encontraron antecedentes de la identificación de compuestos fenólicos en raíces transformadas de especies de la familia Cactaceae.

**Tabla 1 Ejemplos de compuestos fenólicos producidos en cultivo de raíces transformadas**

Nombre científico/familia	Compuesto	Actividad Biológica	Referencias
<i>Rhaponticum carthamoides</i> (Willd.) Ilgin (Asteraceae)	Derivados de ácidos cafeícos	Antioxidantes	(Skala, Kicel, Olszewska, Kiss, & Wysokińska, 2015)
<i>Silybum marianum</i> L. (Asteraceae)	Silidianina y silibina A y B (flavonolignanos) p-Coumaric acid Cinnamic acid	Hepatoprotectores, antioxidantes	(Gabr, Ghareeb, El Shabrawi, Smetanska, & Bekheet, 2016)
<i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni (Asteraceae)	Ácido clorogénico y derivados	Antiinflamatorios, antioxidantes	(Fu et al., 2015; Shin et al., 2015)
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Campanulaceae)	Ácido clorogénico		(Tuan et al., 2014)
<i>Cucumis anguria</i> L. (Cucurbitaceae)	Flavonoles Ácidos hidroxininamicos Ácidos hidroxibenzoicos Otros fenólicos: Vanillina, Ácido veratrico, Hesperidina y Ácido homogentístico	Antioxidante Antimicrobial	(Yoon, Chung, & Thiruvengadam, 2015)
<i>Momordica charantia</i> L. (Cucurbitaceae)	Compuestos fenólicos, catequina, miricetina y quercetina	Actividad antimicrobiana y antioxidante	(Thiruvengadam et al., 2014).

Los protocolos de establecimientos para raíces transformadas de *E. platyachanthus* y *T. lophophoroides* han sido descritos por González-Díaz, Pérez-Reyes, and Pérez-Molphe-Balch (2006); Palomeque-Carlin et al. (2015). El mayor número de raíces por explante se presentó en medio de cultivo MS al 75% para *E. platyacanthus* y en el caso *T. lophophoroides* se logró la transformación en medio MS formulación completa. Se ha probado en *T. lophophoroides* el medio MS en reactores de inmersión temporal sin observarse diferencia significativa en el crecimiento o generación de biomasa en referencia con el medio semisólido MS (Palomeque et al., 2015).

#### **1.4. INDUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS DE TEJIDOS VEGETALES *in vitro***

En la naturaleza, las plantas se encuentran expuestas constantemente a diferentes condiciones adversas, como radiación UV, déficit hídrico, salinidad, patógenos/microorganismos, presencia de metales pesados, oxidantes atmosféricos, el hombre mismo, entre otros. Las plantas sobreviven a estas condiciones desfavorables mediante la activación de vías de traducción de señal involucradas en la respuesta al estrés. (Prasch & Sonnewald, 2015). El estrés se puede definir como “el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas (óptimo fisiológico), en las cuales el límite de estabilidad ha sido sobrepasado, y que un factor de estrés es cualquier agente que produce un menor crecimiento respecto al óptimo de la planta” (Varela, 2010).

“Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan

durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez y reducir su digestibilidad por insectos y vertebrados herbívoros. Así mismo, algunos alcaloides son neurotóxicos a insectos y vertebrados herbívoros. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por las plagas” (Sepúlveda Jiménez, Porta Ducoing, & Rocha Sosa, 2003). Se han tratado de reproducir algunos fenómenos de la naturaleza utilizando inductores, intentando generar estos metabolitos secundarios que muchas veces tienen gran interés para el hombre. La inducción puede ser una poderosa herramienta en la caracterización y desarrollo de muchas plantas medicinales potencialmente benéficas (Gorelick & Bernstein, 2014).

Otro factor abiótico, es la radiación a las diferentes longitudes de onda, que influye en el crecimiento y desarrollo de metabolitos secundarios. Batista y colaboradores en 2016, demostraron que el uso lámparas de diodo emisor de luz (LED, por sus siglas en inglés *light-emitting diode*) rojo-azul con irradiancia ( $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), incrementa el crecimiento en dos quimiotipos (BGEN-01 y BGEN-02) de *Lippia alba* cultivados *in vitro*, por otra parte, la producción de los aceites esenciales varía de acuerdo a la fuente de luz, por ejemplo, la mayor acumulación de eucaliptol y linalol se produjo en el quimiotipo BGEN-01, que creció bajo lámparas fluorescentes; los autores proponen que el genotipo parecía ser un factor más importante que la calidad de la luz para explicar los efectos de diferentes tratamientos en el perfil de aceites esenciales. Otros estudios, revelan que la diferencia de radiación entre visible y UV puede traer cambios morfológicos y fisiológicos en hojas de cebada, como disminución en el área foliar e incremento en el contenido de flavonoles (Klem et al., 2012). Así mismo, se ha demostrado como la productividad en los cultivos agrícolas como maíz y soya, es dependiente de la radiación absorbida (Gitelson, Peng, Arkebauer, & Suyker, 2015)

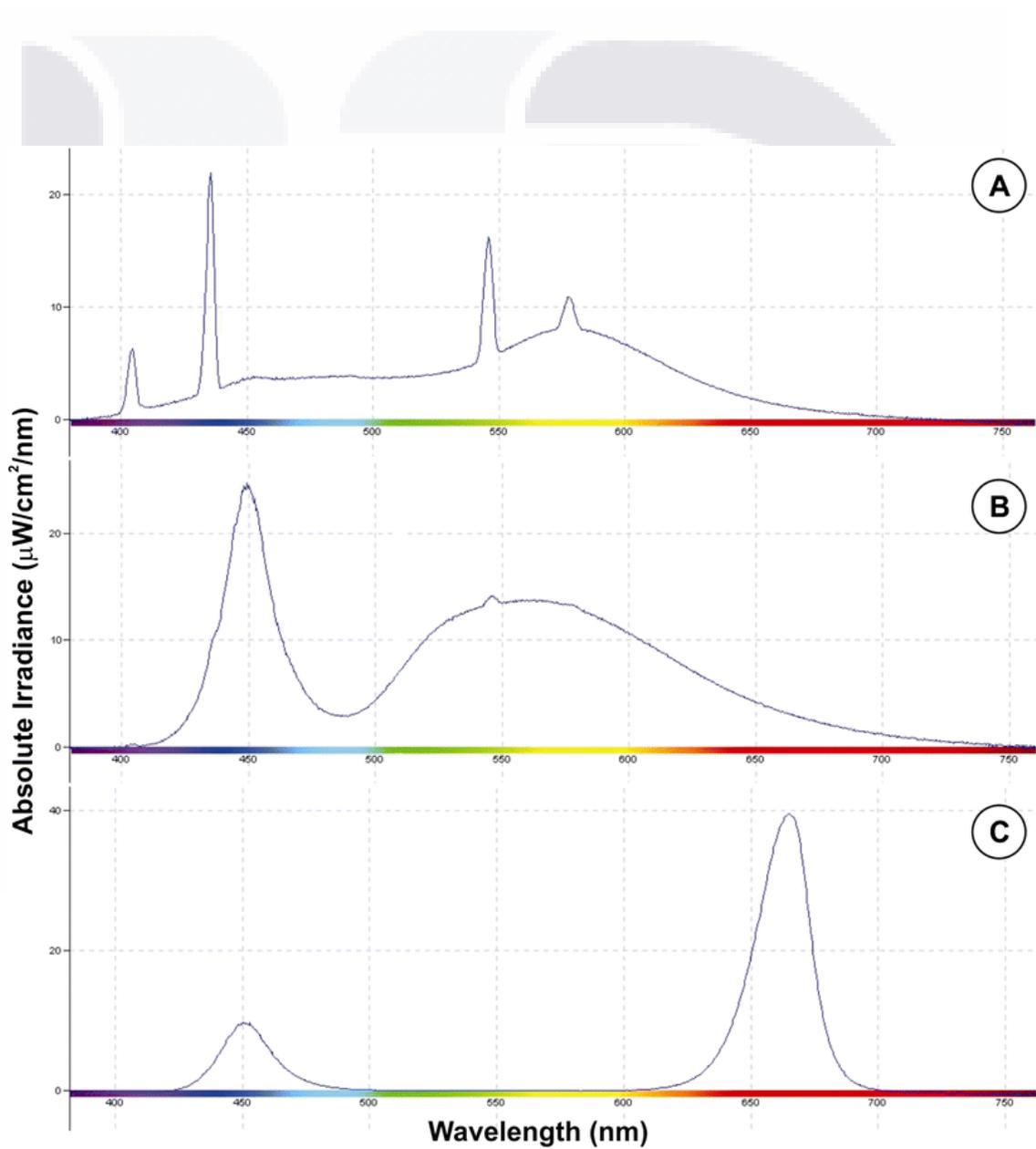


Figura 4. Espectro de absorción de distintas fuentes de luz utilizadas para radiación en cultivos *in vitro* de *L. alba*. (A) Lámparas fluorescentes, B) Lámparas LED blancas y C) Lámparas LED azul-rojas. Lámparas estandarizadas a  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (Batista et al., 2016).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las especies *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*, han sobrevivido a la explotación humana, sin embargo, la persistencia de estas plantas no está garantizada. Su incapacidad para propagarse rápidamente y su lento crecimiento disminuyen el tamaño de las poblaciones. Pueden tomarse varias acciones para impedir la extinción de las especies a través de la técnica de cultivos de tejidos *in vitro* (reproducción asexual) debido a que la propagación de algunas especies se logra de manera rápida y segura en un espacio mínimo. Los cultivos *in vitro* contribuyen a la generación de plántulas para creación de reservas, o bien, para la producción de metabolitos secundarios de interés.

Una alternativa biotecnológica para la obtención de metabolitos secundarios son las raíces transformadas, porque tienen la habilidad de crecer sin necesidad de hormonas en el medio, se generan las raíces de manera rápida, son estables bioquímica y genéticamente, y tienen la capacidad de organogénesis asociada a la síntesis de metabolitos. En estudios previos, se estableció la inducción de raíces transformadas de *T. lophophoroides* y *E. platyacanthus* mediante *Agrobacterium rhizogenes*. El estudio sobre la influencia de los inductores bióticos, tales como el ácido salicílico, metil jasmonato y quitosano, y un inductor abiótico como el ácido abscísico, sobre la acumulación de compuestos fenólicos en cultivos de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*, contribuye al conocimiento de las especies y permite ofrecer un uso potencial es el campo de cosmética y farmacéutica, en un tiempo reducido sin que se recurra al método destructivo de obtenerlos de la naturaleza a través de las especies silvestres.

### 3. HIPÓTESIS

Los inductores bióticos (ácido salicílico, metil jasmonato y quitosano) y abiótico (ácido abscísico) generan cambios en la acumulación de compuestos fenólicos en cultivos *in vitro* de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de los inductores bióticos (ácido salicílico, metil jasmonato y quitosano) y abiótico (ácido abscísico) en la acumulación de compuestos fenólicos en cultivos de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*.

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el cultivo de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* en matraz.
- Evaluar el efecto de diferentes tipos de luz sobre el crecimiento de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*, así como la acumulación de compuestos fenólicos.
- Evaluar el efecto de inductores en la acumulación de compuestos fenólicos en cultivos de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*.
- Realizar el análisis fitoquímico de extractos orgánicos de brotes y raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. CULTIVOS DE TEJIDOS *in vitro* DE *E. platyacanthus* Y *T. lophophoroides*

#### 5.1.1. Multiplicación de brotes

Los brotes *in vitro* de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* obtenidos previamente por Pérez-Molphe-Balch et al. (2015) en la Unidad de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, se utilizaron como testigos. Los brotes de las dos especies se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) (Murashige and Skoog Basal, Sigma) suplementado con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 gL<sup>-1</sup> de agar en cajas magenta, bajo lámparas de luz fluorescente MAGG F21TS/4100K (60V/75W) de 40 μMol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> en fotoperiodo 16 h luz /8 h oscuridad a una temperatura de 24±2°C. Se llevó a cabo el subcultivo cada mes.

#### 5.1.2. Mantenimiento de cultivos de raíces transformadas

Las raíces de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* fueron previamente transformadas (Palomeque-Carlin, 2015; Palomeque-Carlin et al., 2015). Se cultivaron en medio MS suplementado con 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 gL<sup>-1</sup> de agar en condiciones de oscuridad a una temperatura de 24±2°C. Se llevó a cabo el subcultivo cada mes para la especie de *E. platyacanthus* y cada 15 días para la especie *T. lophophoroides*.

#### 5.1.3. Análisis histoquímico de GUS ( $\beta$ -glucoronidasa)

Para corroborar la transformación genética de las raíces de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* se siguió la metodología modificada descrita por Stomp (1992). De 5 a 10 de las raíces transformadas de 1 cm de longitud fueron colocadas en un tubo de centrifuga y fueron cubiertas con la solución de reacción (1 mL) constituida por buffer de fosfatos 1M pH 7 (100 μL), EDTA 0.25 M (40 μL), ferrocianuro de potasio 5 mM (100 μL), ferricianuro de potasio 5 mM (100 μL), tritón 10% (10 μL), X-gluc 40 mM (50 μL) y agua destilada (600 μL). Una vez cubiertas con la solución, se incubaron a 37°C hasta la aparición de un precipitado azul y posteriormente fueron lavadas para su fijación con etanol 70% varias veces para conservarlas y poder evaluar su transformación (adquisición de la coloración azul-

índigo). Las raíces se observaron en el estereoscopio utilizando el software LAZ EZ de Leica Systems Versión 3.3.0 2016.

## **5.2. ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS EN AGITACIÓN DE *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides***

### **5.2.1. Efecto de la luz y el medio de cultivo en el crecimiento de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides***

Para evaluar el efecto de la luz en el crecimiento, se colocaron 10.1 g de material vegetal respectivamente en cada matraz Erlenmeyer de boca ancha (200 mL de capacidad, Scotch Duran) que contenía 70 mL de medio MS o B5, suplementado con 30 o 20 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, respectivamente. El pH se ajustó a 5.7 y se esterilizó a 121°C a 15 lb pie pulg<sup>-2</sup>. Se mantuvieron en agitación orbital constante (agitador orbital AGO-6090, Prendo) a 80 rpm, a una temperatura de 24±2°C en oscuridad o fotoperiodo (16 h luz/ 8 h oscuridad). Se recolectó muestra a los 28 días. Se liofilizó y se registro el peso de biomasa seca.

Para llevar a cabo la cinética de crecimiento de las raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* se colocaron 1.0 g o 0.3 de material vegetal respectivamente y se realizó en la misma condiciones descritas anteriormente bajo la condición de oscuridad. Se recolectó muestra a los 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 y 91 días. Se liofilizó y el medio líquido se almacenó para posteriores pruebas de azúcares reductores, determinación de pH y conductividad.

Se graficó la cinética de crecimiento en base a la biomasa seca obtenida y se calcularon los siguientes parámetros cinéticos: índice de crecimiento, velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación.

Para el cálculo de índice de crecimiento (IC) (Wu, Dewir, Hahn, & Paek, 2006), se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{Biomasa seca final (g)}}{\text{Biomasa seca inicial (g)}}$$

Para el cálculo de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) expresada en  $d^{-1}$  se tomó la pendiente (m) de la línea recta que abarca la fase exponencial de crecimiento de la cinética:  $y= mx+b$ .

Para el cálculo del tiempo de duplicación ( $t_d$ ) en días:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde:  $\ln(2)$  es una constante y  $\mu$  es la velocidad de crecimiento.

Se realizó el cálculo de azúcares reductores remanentes en el medio MS y B5 de las cinéticas de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* de las muestras que se fueron colectando semanalmente. El método utilizado con modificaciones fue el desarrollado por Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, and Smith (1956). Se preparó 1 mL de solución de medio remanente conteniendo menos de 70  $\mu\text{g/ml}$  de sacarosa a la cual se le agregó 0.5 mL de una solución acuosa 5% (v/v) de fenol (RA al 73%, Sigma Aldrich) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (J. T Baker) dentro de un tubo de ensaye (15 mL de capacidad perfectamente lavado). Se dejó reposar la reacción por 30 min después de agitar en el vórtex. Se llevaron a cabo lecturas espectrofotométricas a 490 nm en el equipo Genova, Jenway

### 5.3. EFECTO DE INDUCTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS

Con la finalidad de inducir la producción de los compuestos mayoritarios en las raíces transformadas de ambas especies de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*, se evaluaron tres moléculas inductoras de estrés biótico: ácido salicílico (AS), metil jasmonato (MJ) y quitosano (Q) y una molécula de estrés abiótico: ácido abscísico (AA), de acuerdo a Pitta-Alvarez, Spollansky, and Giulietti (2000) con algunas modificaciones. Previamente, se colocaron 0.3 g de biomasa fresca de raíces en cada matraz Erlenmeyer de boca ancha de 200 mL que contenía 70 mL de medio B5, suplementado con 20  $\text{gL}^{-1}$  de sacarosa, se mantuvo en oscuridad y en agitación constante (80 rpm). Al día 35 de cultivo donde alcanzó la fase exponencial intermedia de crecimiento, se agregó la molecula inductora de estrés biótico o abiótico. Las soluciones stock se prepararon con etanol (96% v/v). Las soluciones fueron

esterilizadas con con filtro (acrodiscos plásticos de 45  $\mu\text{m}$  de nylon de 2.5 cm de diámetro, PALL). A continuación se describen las concentraciones evaluadas de los tres inductores bióticos: a) AS (0.01, 0.1 y 1.0 mM), b) MJ (25, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) (Putalun, Luealon, De-Eknamkul, Tanaka, & Shoyama, 2007), c) Q (10, 40 y 400  $\text{mg L}^{-1}$ ) en ácido acético glacial al 6% de acuerdo a la metodología propuesta por Gabr (2016). Y la molécula inductora de estrés abiótico fue el AA a 0, 20, 60 y 120  $\mu\text{M}$  de acuerdo a la metodología propuesta por Hao (2012) con algunas modificaciones. Todos los inductores se aforaron a 70 mL de medio de cultivo B5. Se evaluaron diferentes tiempos exposición: a) 24h para AS y MJ, b) 24 h y 7 d para Q y c) 24 h y 12 d para AA. Como testigo se utilizó el solvente de dilución de la molécula inductor, según corresponda. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

Se recolectó el material vegetal en todos los tratamientos, se liofilizó (Labconco, Freezone 4.5) y se pulverizó en mortero. Cada muestra se maceró con metanol en baño maria a 60°C durante 10 minutos (Wagner & Bladt, 1996), éste procedimiento se realizó tres veces, adicionando solvente nuevo en cada repetición, se filtraron y se colocaron en frascos de color ámbar. El metanol se volatilizó a temperatura ambiente en campana de extracción o se concentró en rotaevaporador (Heidolph), según la cantidad de extracto obtenido.

Se realizó CCF en los extractos metanólicos de raíces transformadas de *E. platyachanthus* y *T. lophophoroides* obtenidos de los tratamientos de evaluación de medios de cultivo e inductores bióticos y abióticos. Alicuotas (5-10  $\mu\text{L}$ ) de cada fracción se aplicaron en placas de aluminio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) fase normal o sílica gel 60 RP18 F<sub>254S</sub> fase reversa (Merck). Se utilizó una fase móvil conformada de etil acetato:ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26) una fase apta para un monitoreo general de flavonoides glucosídicos. Las placas se analizaron bajo luz UV a 254 nm, los flavonoides generan desvanecimiento de la fluorescencia (oscurecimiento) y bajo luz UV a 365 nm dependiendo del tipo estructural, los flavonoides muestras bandas amarillas, naranjas o verdes fluorescentes. La fluorescencia azul puede ocurrir por la presencia de ácidos fenol carboxílicos (ácido cafeico y clorogénico). Se emplearon apigenina, kampferol, quercetina y ácido clorogénico como estándares. El revelador químico utilizado para flavonoides fue

NP/PEG, además se usaron los reveladores de 4-hidroxibenzaldehído y sulfato cérico (Wagner & Blatt, 1996). Se llevan a cabo cromatografías en capa fina tanto en fase reversa (FR) como en fase normal (FN) de las fracciones obtenidas en la separación por CCA.

Además se determinó el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales, actividad antioxidante y análisis por cromatografía líquida de alta resolución.

#### **5.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES TOTALES EN *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides***

Para la determinación de compuestos fenólicos totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Dewanto, Wu, Adom, and Liu (2002), con algunas modificaciones. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (Sigma Aldrich) en intervalos de 0 a 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y posteriormente a cada muestra (n=3) se le añadieron 2.5 mL de agua desionizada y 0.1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma Aldrich). El ensayo de reacción se dejó reposar por 6 minutos y posteriormente se añadieron 0.25 mL de una solución acuosa (10 % p/v) de carbonato de sodio (Baker). La absorbancia de cada muestra fue monitoreada a 760 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway, Genova) y con los datos obtenidos se construyó la ecuación de la recta ( $y=0.0669x$ ).

Para la determinación de flavonoides totales, se siguió la metodología descrita por Liu et al. (2002) con algunas modificaciones. Para ello, se preparó una curva patrón con quercetina (Sigma Aldrich) en intervalos de 0 a 140  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A cada muestra (n=3) se le añadieron 1.25 mL más de agua desionizada y 0.075 mL de una solución acuosa de nitrito de sodio (5% p/v, Sigma Aldrich). esta mezcla se mantuvo en reposo durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 0.150 mL de una solución acuosa preparada con cloruro de aluminio (10% p/v, Sigma) y se mantuvo en reposo por 5 minutos mas para posteriormente añadir 0.5 mL de NaOH 1 N y 2.5 mL de agua desionizada. La absorbancia de cada muestra

fue monitoreada a 510 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway, Genova) y con los datos obtenidos se construyó la ecuación de la recta ( $y=0.0012x$ ).

### **5.5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides***

Para la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras se utilizó el método propuesto por Brand-Williams, Cuvelier, and Berset (1995) con algunas modificaciones. Para ello se preparó una solución metanólica con 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•, por sus siglas en inglés 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 60  $\mu$ M. Posteriormente se colocaron 3.9 mL de la solución con DPPH• en tubos de ensaye y se añadieron 0.1 mL de cada una de las muestras a analizar. El ensayo de reacción se mantuvo en reposo durante 30 minutos en condiciones de oscuridad y posteriormente se monitoreó la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm utilizando un espectrofotómetro (Jenway, Genova). La actividad antioxidante de cada muestra se expresó como porcentaje de inhibición del radical DPPH•, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_i - A_f}{A_i} * 100$$

Donde:

% de inhibición= porcentaje de inhibición de la muestra.

$A_i$ = Absorbancia inicial de la muestra.

$A_f$ =Absorbancia final de la muestra.

### **5.6. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL FERULOIL GLUCÓSIDO EN CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *T. lophophoroides***

#### **5.6.1. Obtención de extractos**

Para la separación del feruloil glucósido se colectaron 45.25 g de biomasa seca de raíces transformadas de *T. lophophoroides* (condiciones de cultivo: medio MS, 80 rpm, oscuridad; etapa del cultivo: 56 d, fase exponencial). El material vegetal seco y pulverizado se maceró con metanol a baño maria a 60°C durante 10 minutos (Wagner & Blatt, 1996), éste procedimiento se realizó tres veces, adicionando solvente nuevo en cada repetición, se filtró

y posteriormente se concentró en rotaevaporador (Heidolph) a presión reducida a 45°C. Se obtuvo 11.2 g de extracto metanólico.

**5.6.2. Fraccionamiento del extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides***

La separación del feruloil glucósido por cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó a partir del extracto metanólico (11.2 g) de raíces transformadas de *T. lophophoroides*. Se utilizó sílica gel 60 fase normal (Merck) y la fase móvil consistió en un sistema de gradiente de diclorometano:metanol (tabla 2). Se recolectaron 15 ml de cada fracción. Las fracciones colectadas se concentraron en un rotavapor (Heidolph). Se registraron con la clave C1Fn, donde *n* es el número de fracción. En la tabla 2, se presentan las fracciones colectadas en cada sistema de elución y la reunión según la similitud de las bandas reveladas en la cromatografía en capa fina (CCF).

**Tabla 2. Fraccionamiento del extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides*.**

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave
Diclorometano 100%	1-5	1	C1F1
Diclorometano: metanol 95-5%	6-11	2-5	C1F2
Diclorometano: metanol 90-10%	12-15	6-7	C1F3
Diclorometano: metanol 85-15%	16-19	8	C1F4
Diclorometano: metanol 80-20%	20-25	9	C1F5
Diclorometano: metanol 70-30%	26-31	10-11	C1F6
Diclorometano: metanol 60-40%	32-38	12	C1F7
Diclorometano: metanol 50-50%	39-42	13-14	<b>C1F8</b>
Metanol 100%	43	15	C1F9
		16-19	C1F10
		20	C1F11
		21	C1F12
		22	<b>C1F13</b>
		23	C1F14
		24-27	<b>C1F15</b>
		28	C1F16
		29	C1F17
		30-34	C1F18

35-38	C1F19
39-42	C1F20
43	

En la figura 5, se muestra un resumen de la separación por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides*, para el aislamiento del feruloil glucósido y otros compuestos fenólicos. Las fracciones C1F8 y C1F15 se purificaron por cromatografía en columna abierta y el compuesto aislado de la fracción C1F13 se identificó por las técnicas de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

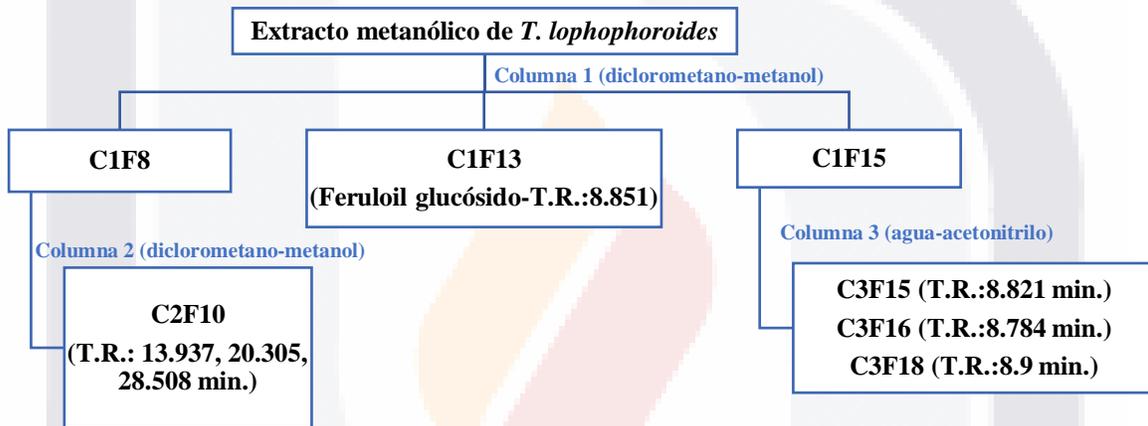


Figura 5. Fraccionamiento del extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides* y aislamiento del feruloil glucósido

### 5.6.3. Purificación de la fracción C1F8

La fracción C1F8 (269.7 mg) se purificó a través de la cromatografía en columna abierta. Se utilizó sílica gel 60 fase normal y la fase móvil consistió en un sistema de gradiente de diclorometano-metanol (tabla 3). Se obtuvieron 82 fracciones, de las cuales se reunieron según la similitud de las bandas reveladas en CCF

Tabla 3. Purificación de la fracción C1F8 del extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides*.

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave
--------------------	-----------------------	---------------------	-------

Diclorometano 100%	1-8	1-2	C2F1
Diclorometano: metanol 98-2 %	9-52	3-8	C2F2
Diclorometano: metanol 95-5%	53-61	9-14	C2F3
Diclorometano: metanol 90-10%	62-66	15	C2F4
Diclorometano: metanol 85:15%	67-71	16	C2F5
Diclorometano: metanol 80-20%	72-75	17	C2F6
Metanol 100%	76-82	18	C2F7
		19-21	C2F8
		22	C2F9
		23-24	<b>C2F10</b>
		26-30	C2F11
		31-33	C2F12
		34-35	C2F13
		36-38	C2F14
		39-41	C2F15
		42-48	C2F16
		49-53	C2F17
		54-55	C2F18
		56-60	C2F19
		61-65	C2F21
		66-70	C2F22
		71-80	C2F23
		81-82	C2F24

**5.6.4. Purificación de la fracción C1F15**

La fracción C1F15 (417.6 mg), se purificó por cromatografía en columna abierta. Se utilizó Polyogpred® 60-50 C<sub>18</sub> (Merck) fase reversa y la fase móvil consistió en un sistema de gradiente de agua-acetonitrilo (tabla 4). Se obtuvieron 86 fracciones, de las cuales se reunieron según la similitud de las bandas reveladas en CCF

**Tabla 4. Purificación de la fracción C1F15 del extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides*.**

Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Clave
Agua 100%	1-9	1	C3F1
Agua: Acetonitrilo 95:5 %	10-15	2	C3F2

Agua: Acetonitrilo 90-10%	16-21	3	C3F3
Agua: Acetonitrilo 85-15%	22-28	4	C3F4
Agua: Acetonitrilo 80-20%	29-35	5	C3F5
Agua: Acetonitrilo 75-25%	36-40	6-11	C3F6
Agua: Acetonitrilo 70-30%	41-46	12	C3F7
Agua: Acetonitrilo 65-35%	47-53	13	C3F9
Agua: Acetonitrilo 60-40%	54-58	14-15	C3F10
Agua: Acetonitrilo 55-45 %	59-67	16	C3F11
Agua: Acetonitrilo 50-50 %	68-73	17	C3F12
Acetonitrilo 100%	73-86	18-19	C3F13
		20-22	C3F14
		23	<b>C3F15</b>
		24	<b>C3F16</b>
		25	C3F17
		26-28	<b>C3F18</b>
		29-42	C3F19
		43-49	C3F20
		50-56	C3F21
		57-72	C3F22
		73-75	C3F23
		76-86	C3F24

#### 5.6.5. Análisis por cromatografía en capa fina (CCF)

Alicuotas (5-10  $\mu$ L) de cada fracción se aplicaron en placas de aluminio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) fase normal o sílica gel 60 RP18 F<sub>254s</sub> fase reversa (Merck) y se utilizaron las fases móviles de diclorometano:metanol (9:1) y agua:acetonitrilo (7:3), respectivamente. Las placas se analizaron bajo luz fluorescente UV 365 nm. La fluorescencia azul puede ocurrir por la presencia de ácidos fenol carboxílicos (ácido cafeico y clorogénico). Se emplearon apigenina, kampferol, quercetina y ácido clorogénico como estándares. El revelador químico utilizado fue NP/PEG y sulfato cérico. Se calienta la placa a 105°C por 1-2 min (Wagner & Bladt, 1996).

#### 5.6.6. Elucidación química-estructural por técnicas de espectrometría y espectroscopía

El compuesto aislado (C1F13) en la CCA, se identificó mediante análisis de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN). El análisis de espectrometría de masas se realizó empleando una cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas de ionización por electronebulización (UPLC-ESI-MS, por sus siglas en inglés: Ultra Performance Liquid Chromatography- electrospray ionization-mass spectrometry) en un equipo UPLC ACQUITY-Z-spray ESI-APCI-ESCI (Waters), con una columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 mm x 50 mm, 17  $\mu$ m, Waters) y el software MassLynx. La fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético 0.05% (v/v) (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El sistema de gradientes fue el siguiente: 0-4 min, 0% B; 4-5 min, 30% B; 5-6 min, 50% B; 6-8 min, 100% B. La velocidad de flujo se mantuvo en 0.3 mL/min y volumen de inyección 15  $\mu$ L. El tiempo de corrida fue de 15 min. El análisis de UPLC-ESI-MS fue realizado en modo de ion negativo. Por último, el compuesto mayoritario fue identificado por análisis de RMN.

La elucidación estructural del compuesto detectado, se realizó mediante el análisis de RMN de protón ( $^1\text{H}$ ; 400MHz) y carbono ( $^{13}\text{C}$ ; 100MHz), así como el experimento en 2 dimensiones de la correlación de enlaces múltiples heteronucleares (HMBC, por las siglas en inglés: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) a 400MHz, usando un espectrómetro Varian Mercury Plus 400 MHz - ID3. La muestra se diluyó en acetona deuterada:dimetilsulfóxido (95:05). Se utilizó el tetrametilsilano como estándar interno para la calibración de los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), éstos valores se expresan en partes por millón (ppm). El compuesto de la fracción C1F10 se identificó por comparación de espectros de RMN con datos consultados en la literatura.

#### **5.7. CUANTIFICACIÓN DEL FERULOIL GLUCÓSIDO EN *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

La cuantificación del feruloil glucósido en extractos metanólicos de raíces transformadas y tejidos no transformados (brote y raíz) de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* se realizó

utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) (Waters 2695), equipado con una columna Supelcosil LC-F (4.6 mm × 250 mm, 5- $\mu$ m) (Sigma-Aldrich) y un detector de arreglo de diodos (Waters 996). El software empleado fue Empower Pro (Waters). La fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético 0.5% (v/v) (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El sistema de gradientes fue el siguiente: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B; 4-20 min, 30% B; 21-23 min, 50% B; 24-25min, 80% B; 26-27 100% B; 28-30min, 0% B. La velocidad de flujo se mantuvo en 0.9 mL/min y el volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L. La absorbancia se midió a 330 nm. El tiempo de retención para el pico más abundante (pico 1) fue de 8.968 min ( $\lambda_{\text{máx}}= 242$  y 323 nm) y la concentración del compuesto fenólico se estimó utilizando una curva de calibración (n=3) preparada con feruloil glucósido (31.25 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y=35944x-278037$ ,  $R^2=0.9971$ ) aislado en el presente trabajo. El feruloil glucósido se identificó comparando el tiempo de retención y espectro UV con cada muestra. Los valores se expresaron en miligramos por gramo de biomasa seca de la muestra.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. CULTIVOS DE TEJIDOS *in vitro* DE *E. platyacanthus* Y *T. lophophoroides*

#### 6.1.1. Multiplicación de brotes

El subcultivo de 18 brotes en condiciones *in vitro* de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*, se llevo a cabo cada mes. A los 8 meses de subcultivo se cosecharon brotes, los cuales se usaron como testigo (Figura 6).

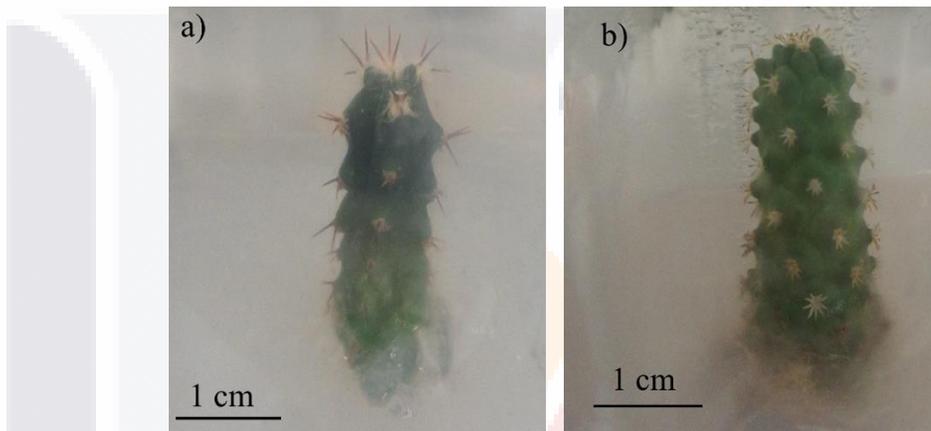


Figura 6. Brotes cultivados en condiciones *in vitro* durante 8 meses. a) *E. platyacanthus* y b) *T. lophophoroides*

#### 6.1.2. Mantenimiento de cultivos de raíces transformadas

Las raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* se subcultivaron durante 18 meses. En la Figura 7, se observa el aspecto de las raíces transformadas de ambas especies creciendo bajo fotoperiodo u oscuridad.

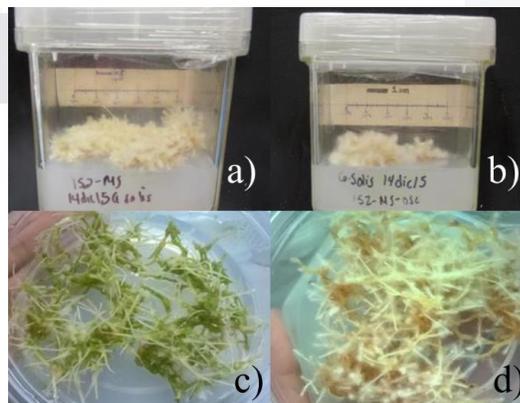


Figura 7. Aspecto de las raíces transformada subcultivadas en medio MS semisólido. a) *E. platyacanthus* creciendo en fotoperiodo, b) *E. platyacanthus* creciendo en oscuridad (24h), c) *T. lophophoroides* creciendo en fotoperiodo y d) *T. lophophoroides* creciendo en oscuridad (24 h).

### 6.1.3. Análisis histoquímico de GUS ( $\beta$ -glucoronidasa)

La estabilidad genética de las raíces de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* se comprobó evaluando la transformación a través de la reacción entre una enzima intencionalmente expresada en el material vegetal ( $\beta$ -glucoronidasa) y el sustrato incoloro X-gluc, generándose así un producto insoluble en agua y que tiende a precipitar en forma de una coloración azul intensa (azul-índigo) (Stomp, 1992), como se observa en las figura 8 y 9.

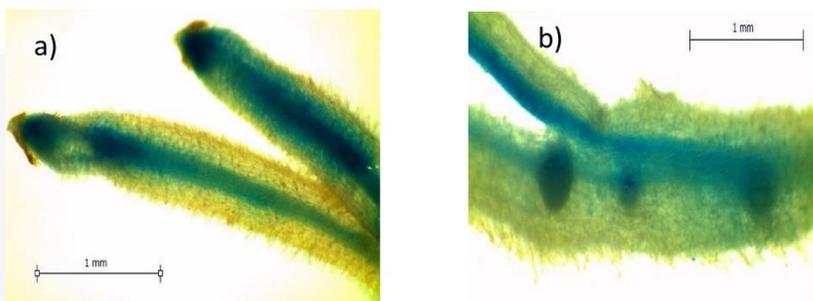


Figura 8. Análisis histoquímico de GUS en raíces transformadas de *E. platyacanthus* subcultivadas en medio semisólido MS en condiciones de a) fotoperiodo (16/8 h) y de b) oscuridad

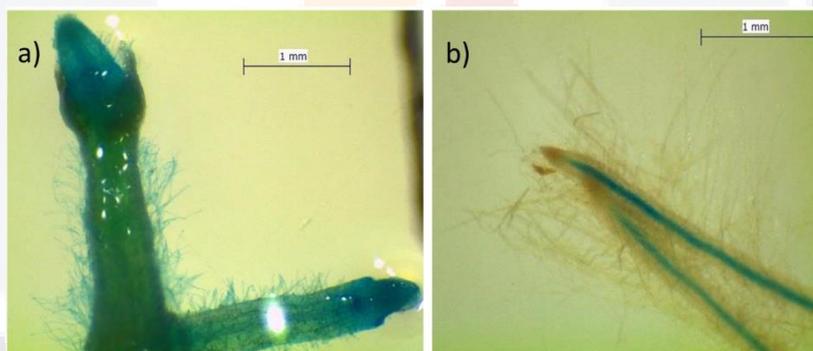


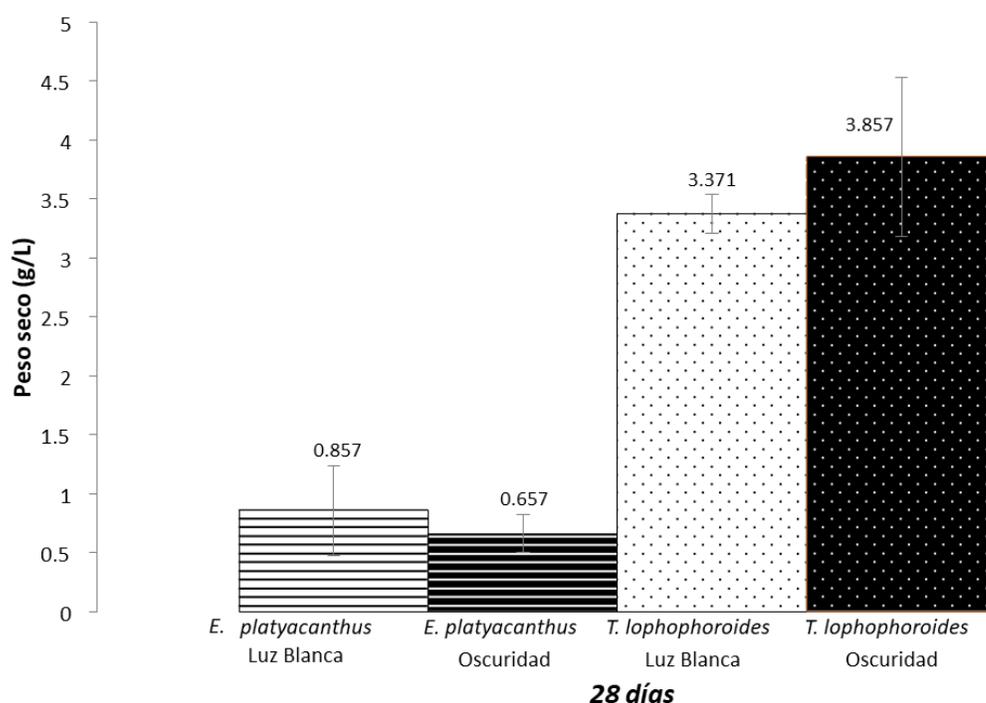
Figura 9. Análisis histoquímico de GUS en raíces transformadas de *T. lophophoroides* subcultivadas en medio semisólido MS en condiciones de a) fotoperiodo (16/8 h) y de b) oscuridad.

## 6.2. EFECTO DE LA LUZ Y EL MEDIO DE CULTIVO EN EL CRECIMIENTO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *E. platyacanthus* Y *T. lophophoroides*

### 6.2.1. Evaluación del crecimiento de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* en medio B5 en agitación en condiciones de luz en fotoperiodo y oscuridad.

Se comenzó a comparar el crecimiento en medio MS semisólido y MS en agitación a un periodo de 28 días de ambas especies bajo condiciones de luz fotosintéticamente activa, luz

fluorescente y ausencia de iluminación u oscuridad, observando que el crecimiento era mayor en medio en agitación MS que en semisólido (dato no mostrado). A partir de estos datos, se comenzó a comparar el crecimiento en medio en agitación B5 y MS para ambas especies a las mismas condiciones de cultivo, observando que para *E. platyacanthus* no hay diferencia en su crecimiento entre los medios en agitación MS y B5. Sin embargo, para *T. lophophoroides* si se observa diferencia en el crecimiento (producción de biomasa) entre el medio en agitación B5y MS. En la figura 10, se observa el peso de biomasa seca al finalizar el tiempo de evaluación del crecimiento de ambas especies en agitación en medio B5.



**Figura 10.** Crecimiento de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* en medio líquido B5 bajo condiciones de luz y oscuridad con agitación (80 rpm). Luz blanca= fotoperiodo en luz blanca/oscuridad a 16/8 h, Oscuridad= oscuridad. Las barras indican la desviación estándar de cada serie de datos, n=3.

El crecimiento de las raíces transformadas de ambas especies se ve favorecido en condiciones de agitación en medio B5 en comparación con su crecimiento bajo las mismas condiciones en medio en agitación MS. Es decir, *E. platyacanthus* crece 0.04 más bajo en medio B5 en luz en fotoperiodo 16/8 h que en medio MS; en condiciones de oscuridad creciendo en agitación en B5 crece 0.25 veces más que en condiciones de similares en MS, sin diferencia significativa (datos de crecimiento en medio MS no mostrados). Por otro lado, *T. lophophoroides* crece 2.94 veces más en B5 en agitación en fotoperiodo que en MS en

agitación; mientras que en condiciones de oscuridad crece 2.16 veces más que en condiciones de MS en agitación (datos de crecimiento en medio MS no mostrados). A continuación, se muestra el aspecto de las raíces transformadas de ambas especies después de crecer por 28 días en B5 en agitación y bajo luz en fotoperiodo 16/8h y bajo oscuridad (Figura 11).

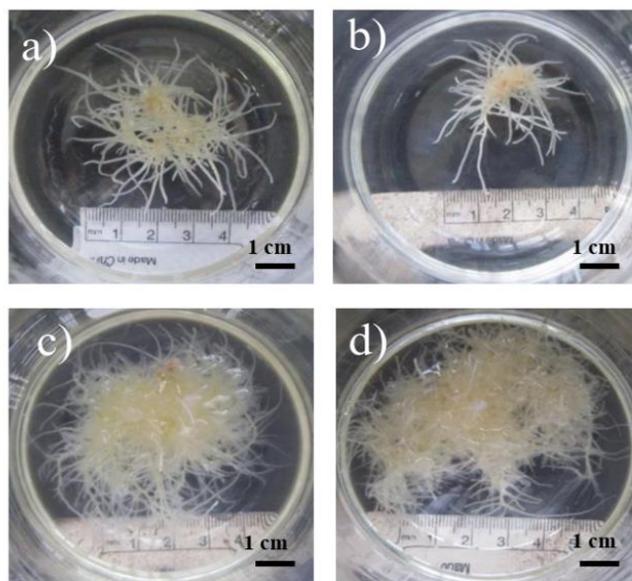


Figura 11. Aspecto de las raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* después de 28 días de crecimiento en B5 en agitación y condiciones de luz en fotoperiodo 16/8h y oscuridad, a) *E. platyacanthus* bajo luz blanca en fotoperiodo 16/8h, b) *E. platyacanthus* bajo oscuridad, c) *T. lophophoroides* bajo luz blanca en fotoperiodo 16/8h y d) *T. lophophoroides*

Cuadro 1  
bajo oscuridad.

### 6.2.2. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio MS líquido en la oscuridad de *E. platyacanthus*

Con los datos de biomasa seca de las raíces transformadas de *E. platyacanthus* crecidas en medio líquido en agitación (80 rpm) en oscuridad por 3 meses (91 días) se obtuvo la cinética de crecimiento que a continuación se muestra (figura 12). El tiempo de evaluación permitió observar las fases de adaptación, exponencial y estacionaria de crecimiento de la cinética, por lo que los parámetros cinéticos se determinaron:  $IC=16.54$ ,  $\mu=0.0295\text{ d}^{-1}$  y  $t_d=23.50\text{ d}$ .

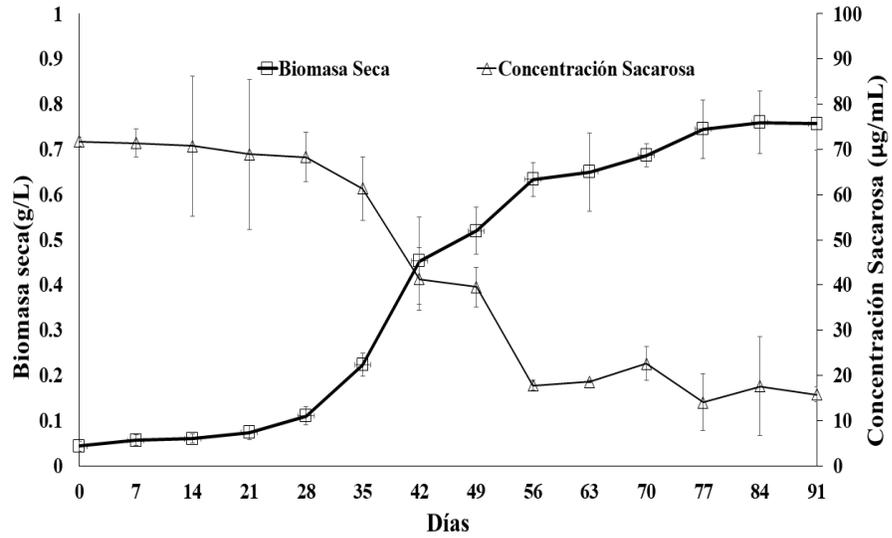
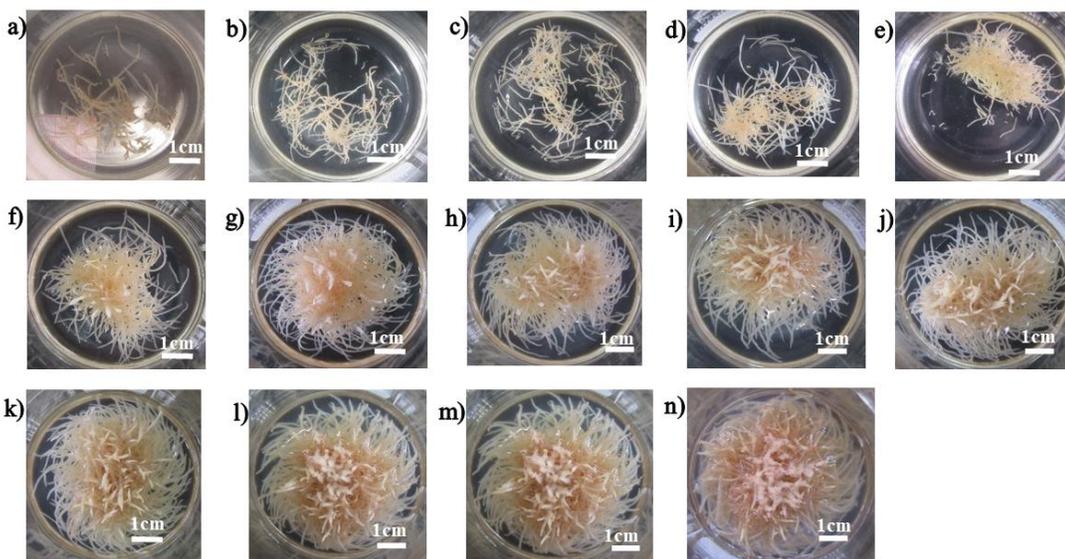


Figura 12. Consumo de carbono (azúcares totales) durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas de *E. platyacanthus* en medio líquido MS en oscuridad. Las barras representan la desviación estándar (n=3).

Analizando el crecimiento de las raíces transformadas en medio líquido MS durante 91 días su fase de crecimiento lag es prolongada con una duración aproximada de 28 días, su fase exponencial de crecimiento se alcanza en promedio hasta el día 56 en tanto que la fase estacionaria comienza a observarse hasta los 77 días. Su evolución semanal se muestra en la figura 13.



**Figura 13.** Aspecto de las raíces transformadas de la cinética de crecimiento en medio líquido MS en agitación (80 rpm) de *E. platyacanthus* a los a) 0 días, b) 7 días, c) 14 días, d) 21 días, e) 28 días, f) 25 días, g) 42 días, h) 49 días, i) 56 días, j) 63 días, h) 70 días, i) 77 días, j) 84 días y k) 91 días.

### **6.2.3. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio MS líquido en la oscuridad de *T. lophophoroides***

Se calcularon los parámetros cinéticos como el índice de crecimiento  $IC= 317.8888$ , el tiempo de duplicación  $td=9.614$  d y la velocidad de crecimiento  $\mu=0.0721d^{-1}$ . La fase de crecimiento de adaptación es prolongada durando hasta 35 días, la fase de crecimiento exponencial en promedio se alcanza en el día 56 en tanto la fase estacionaria se manifiesta a partir del día 77 (figura 14). El cálculo del contenido de azúcares totales sugiere que se acerca la fase estacionaria de crecimiento. El aspecto de las raíces (figura 15) se muestra a continuación.

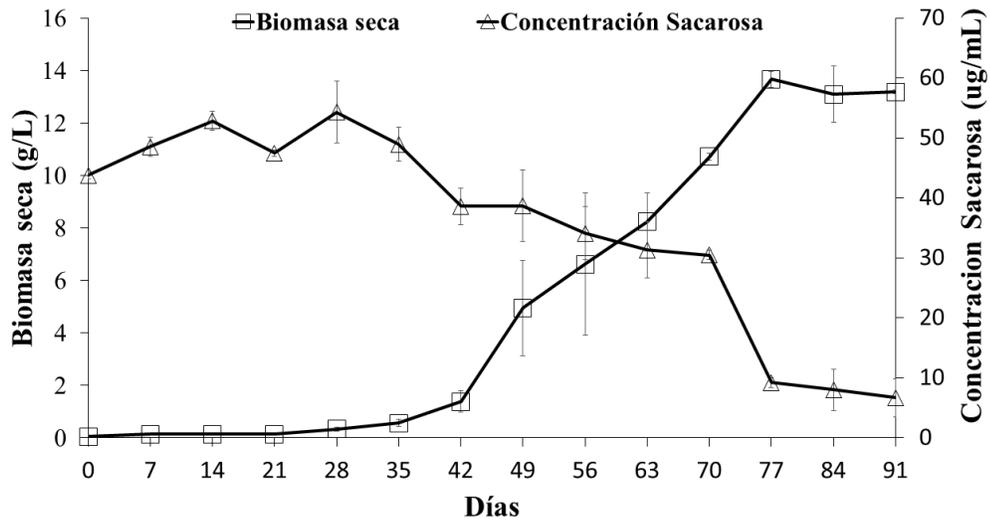


Figura 14. Consumo de carbono (azúcares totales) durante la cinética de crecimiento de raíces transformadas de *T. lophophoroides* en medio líquido MS en oscuridad. Se calcula la desviación estándar (n=3).

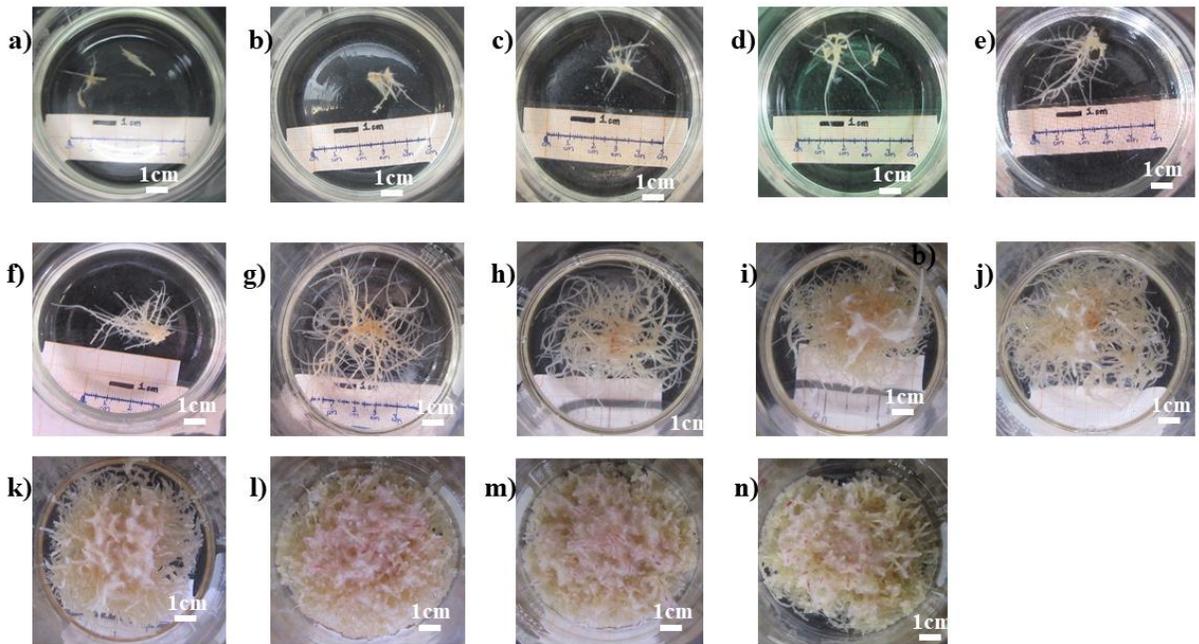
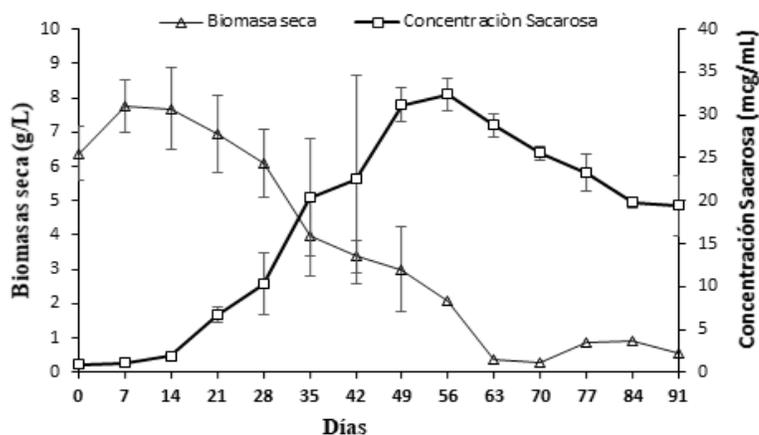


Figura 15. Aspecto de las raíces transformadas de la cinética de crecimiento en medio líquido MS de *T. lophophoroides* en oscuridad y en agitación constante (80 rpm). a) al día 0, b) al día 7, c) al día 14, d) al día 21, e) al día 28, f) al día 35, g) al día 42, h) al día 49, i) al día 56, j) al día 63, k) al día 70, l) al día 77, m) al día 84 y n) al día 91 de iniciada la cinética de crecimiento.

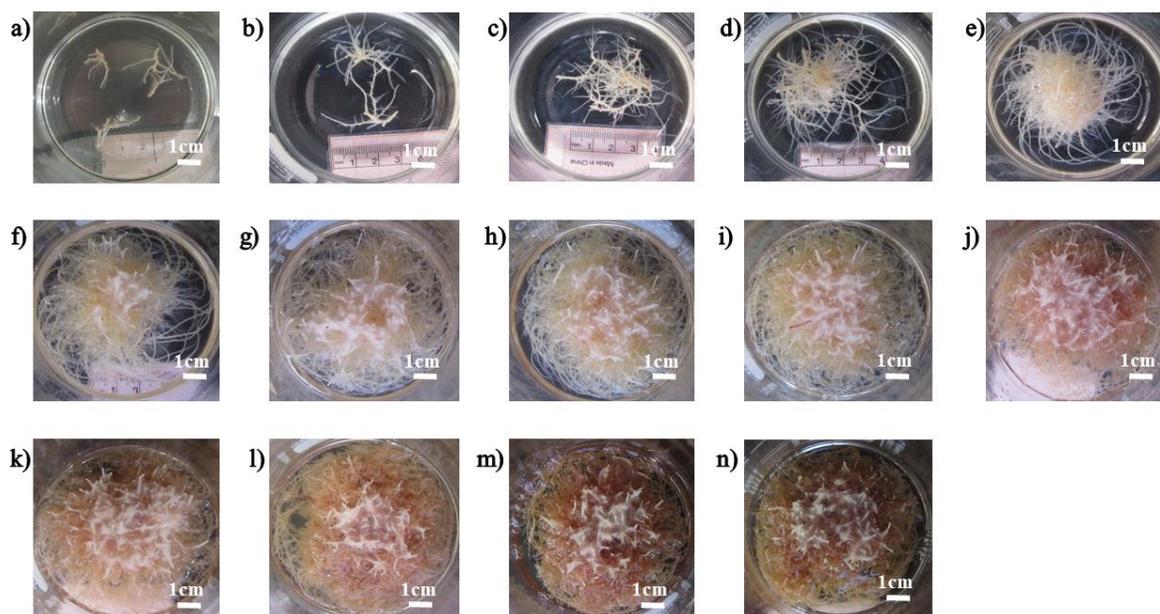
**6.2.4. Cinética de crecimiento de raíces transformadas en medio B5 líquido en la oscuridad de *T. lophophoroides***

Conforme a la biomasa seca obtenida a lo largo de la cinética de crecimiento de *T. lophophoroides* en agitación (80 rpm) y condiciones de oscuridad creciendo por 91 días se pudo obtener la información que se muestra en la figura 16.



**Figura 16. Consumo de carbono (azúcares totales) durante el crecimiento y cinética de crecimiento de raíces transformadas de *T. lophophoroides* en medio líquido B5 en oscuridad y agitación rotatoria a 80 rpm por 13 semanas (91 días). Se calcula la desviación estándar de cada serie de datos, n=3.**

Se pudieron calcular los parámetros cinéticos tales como el índice de crecimiento (IC=33), la velocidad de crecimiento ( $\mu=0.0631 \text{ d}^{-1}$ ) y el tiempo de duplicación de 10.985 d. La fase de crecimiento de adaptación se observa durante de los primeros 14 días, en tanto que la fase exponencial de crecimiento en promedio se observa en el día 35 para finalmente localizar la fase estacionaria de crecimiento en el día 49 y posteriormente la fase de decline o muerte. Con el cálculo de los azúcares reductores se observa que las raíces llegaron a su fase de crecimiento estacionaria pese a la presencia de azúcares. En la figura 17, se aprecia el aspecto de las raíces durante la cinética de crecimiento.



**Figura 17.** Aspecto de las raíces transformadas de la cinética de crecimiento en medio líquido B5 en agitación (80 rpm) de *T. lophophoroides* a los a) 0 días, b) 7 días, c) 14 días, d) 21 días, e) 28 días, f) 35 días, g) 42 días, h) 49 días, i) 56 días, j) 63 días, k) 70 días, l) 77 días, m) 84 días y n) 91 días.

De esta manera el aspecto a partir del día 77 comienza a tornarse rojizo como resultado de que el crecimiento de la raíz entra en la fase estacionaria (síntesis de distintos de metabolitos secundarios).

Al evaluar los dos medios MS y B5 en la cinética de crecimiento de *T. lophophoroides*, las fases de crecimiento se pueden observar en un periodo de tiempo más corto en medio B5 que en MS aun cuando la biomasa obtenida es menor. El cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento nos permite conocer el comportamiento de crecimiento de las raíces en un determinado periodo de tiempo y poder proseguir con los siguientes experimentos que para el caso y las futuras aplicaciones un periodo de tiempo corto para alcanzar una fase de crecimiento exponencial es deseable dadas la producción en biomasa y posiblemente mejores rendimientos en compuestos de interés que no siempre, cabe mencionarlo, van de la mano. El crecimiento, por lo tanto, al comparar ambas especies en sus mejores condiciones de crecimiento, es rápido para el caso de *T. lophophoroides* en condiciones de agitación en

medio B5 en oscuridad. *E. platyacanthus* crece lento en comparación con *T. lophophoroides*, y no hace diferencia en crecimiento entre en medio B5 y MS.

### 6.3. EFECTO DE INDUCTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS EN *E. platyacanthus*

#### 6.3.1. Ácido salicílico

Se probaron dos concentraciones de AS (0.1 mM y 1.0 mM) por 24 h sobre raíces transformadas de *E. platyacanthus* al día 56 de su cinética de crecimiento. En la figura 18, se observa la separación por CCF de compuestos fenólicos en raíces transformadas de *E. platyacanthus*, expuestas a la molécula inductora y como testigos el brote y raíz sin transformar, raíz transformada libre de inductor y raíces transformadas con metanol. Sólo en el día inicial se presentan fluorescencia azul algunas bandas. Se uso como estandar quercetina y ácido clorogénico.

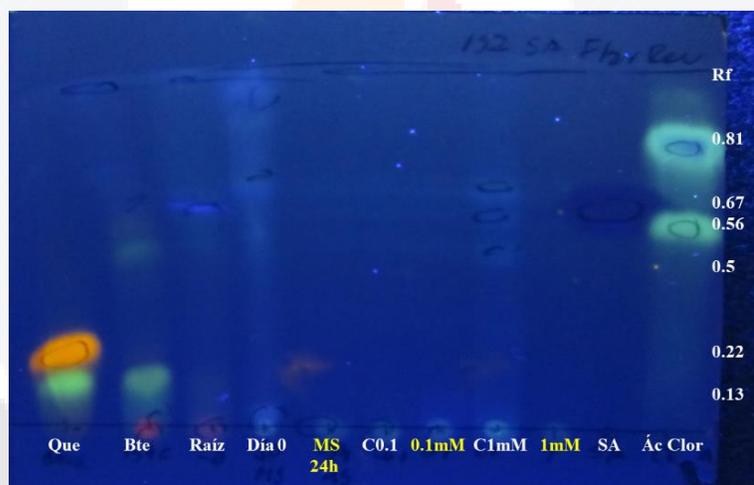
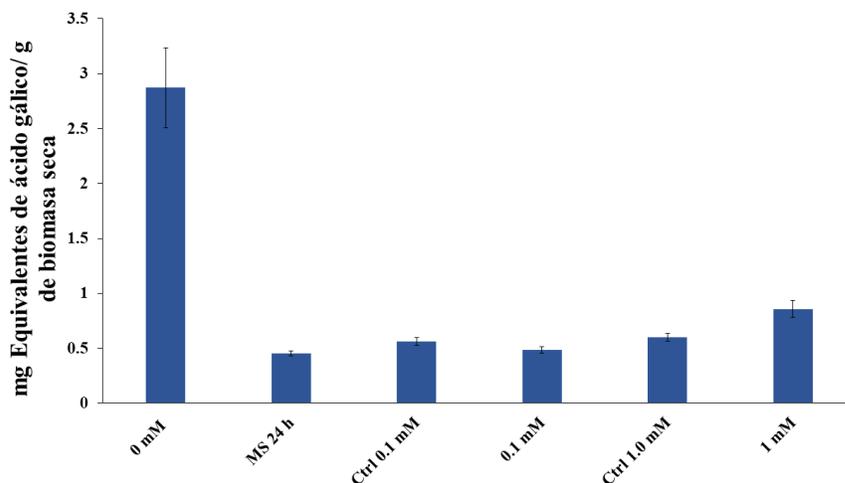


Figura 18. Separación de compuestos fenólicos por CCF en el extracto metanólicos de raíces transformadas de *E. platyacanthus*. Abreviaciones: Quercetina (Que), Brote con raíz (Bte), Raíz sin transformar (Raíz), raíces sin inductor después de 24h solo con nuevo medio MS (MS 24h), raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración (0.1 mM) (C 0.1), raíces expuestas a inductor después de 24 h de ácido salicílico a la concentración 0.1 mM (C 0.1), raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración (1.0 mM) (C1mM), raíces expuestas a inductor después de 24 h de ácido salicílico a la concentración 1.0 mM (1 mM), ácido salicílico (SA), Ácido clorogénico (Ác Clor). Revelado: NP/PEG y luz UV 365 nm. Fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3).

Se analizó el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y la actividad antioxidante después de la inducción por AS, indicando que no favorece la producción de compuestos fenólicos, flavonoides en comparación con el tratamiento libre de inductor en el tiempo 0

(0 $\mu$ M), sin embargo, a las 24 h solo la concentración 1.0  $\mu$ M logró presentar un incremento en la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides (figura 19 y 20). Lo cual, se relaciona con la actividad antioxidante (figura 21), que resulta ser mayor en el testigo (metanol) que para el resto de los tratamientos. Posiblemente otro tipo de compuestos o rutas metabólicas estén activándose debido las respuestas obtenidas en las 3 determinaciones.



**Figura 19.** Determinación de compuestos fenólicos en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidos por ácido salicílico a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM. Abreviaciones: Día inicial de la inducción (0  $\mu$ M) , raíces expuestas por 24 h a nuevo medio MS (MS 24 h), raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.1 mM) (Ctrl 0.1 mM), raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.1 mM (0.1 mM), raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (1.0 mM) (Ctrl 1.0 mM), raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 1.0 mM (1 mM). Los resultados representan el promedio (n=3) y las barras representan el error estándar.

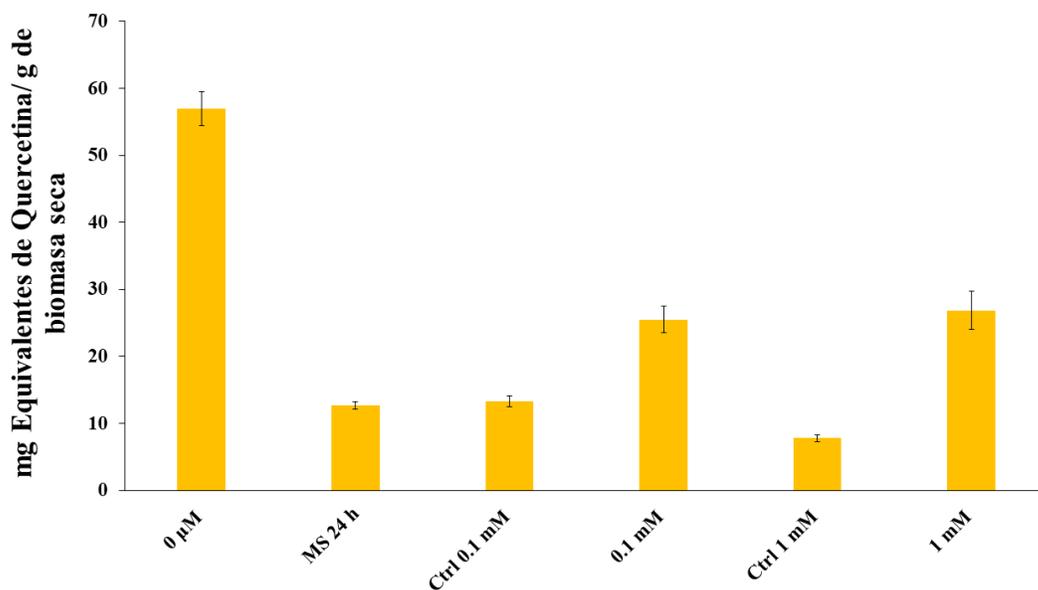


Figura 20. Determinación de flavonoides en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM. Abreviaciones: Día inicial de la inducción (0 μM) , raíces expuestas por 24 h a nuevo medio MS (MS 24 h), raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.1 mM) (Ctrl 0.1 mM), raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.1 mM (0.1 mM), raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (1.0 mM) (Ctrl 1.0 mM), raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 1.0 mM (1 mM). Los resultados representan el promedio (n=3) y las barras representan el error estándar.

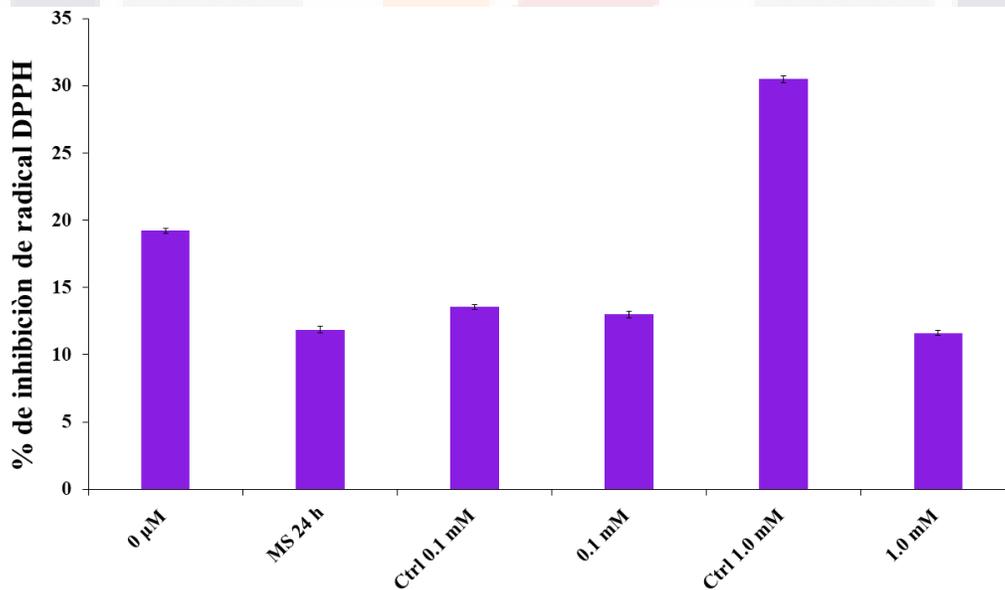
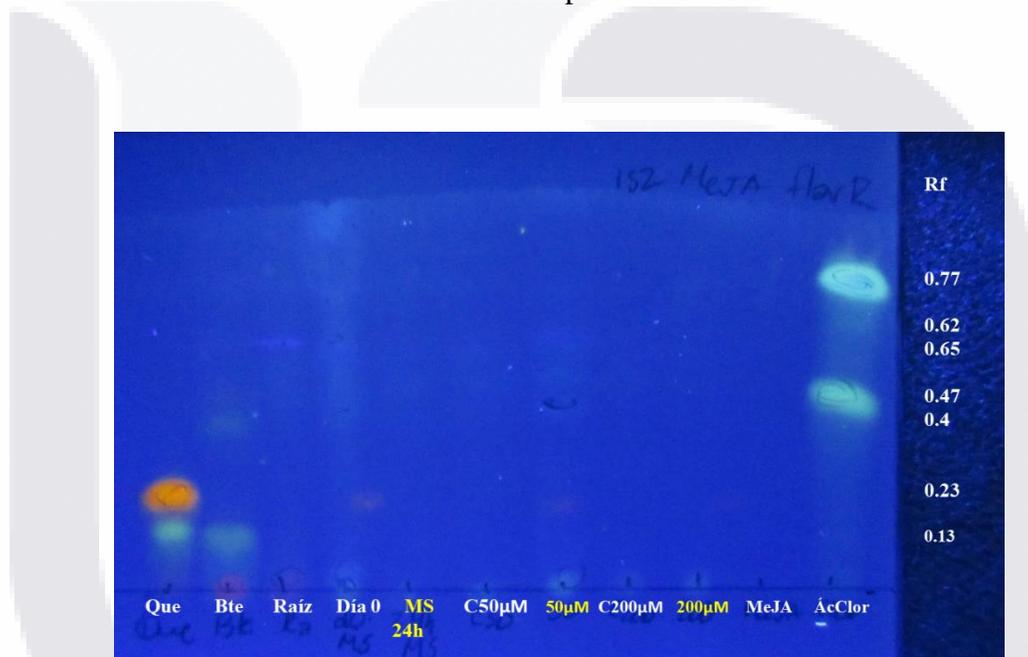


Figura 21. Determinación de actividad antioxidante en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM. Abreviaciones: Día inicial de la inducción (0 μM) , raíces expuestas por 24 h a nuevo medio MS (MS 24 h), raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.1 mM) (Ctrl 0.1 mM), raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.1 mM (0.1 mM), raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (1.0 mM) (Ctrl 1.0 mM), raíces expuestas a ácido salicílico a

concentración de 1.0 mM (1 mM). Los resultados representan el promedio (n=3) y las barras representan el error estandar

### 6.3.2. Metil jasmonato

Se evaluaron distintas concentraciones de MJ (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) por 24 h sobre raíces transformadas de *E. platyacanthus* al día 56 de su cinética de crecimiento. En la figura 22, no se observa cambio en los perfiles químicos en los tratamientos de las raíces transformadas para dicha especie. La de determinación de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante también se realizaron para estas muestras.



**Figura 22.** Separación por CCF de compuestos fenólicos de raíces transformadas de *E. platyacanthus*. Abreviaciones: quercetina (Que), brote con raíz (Bte), raíces colectadas en la fase exponencial de la cinética de crecimiento (día 56) (Día 0), raíces sin inductor después de 24h solo con nuevo medio MS (MS 24h), raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución para lograr esa concentración (50  $\mu$ M) (C 50  $\mu$ M), raíces expuestas por 24 h a metil jasmonato a 50  $\mu$ M (50  $\mu$ M), raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución para lograr esa concentración (200  $\mu$ M) (C 200  $\mu$ M), raíces expuestas por 24 h a metil jasmonato a la concentración 200  $\mu$ M (200  $\mu$ M), metil jasmonato (MeJA), ácido clorogénico (ÁcClor). Revelador NP/PEG y UV a 365 nm. Fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3).

En el caso del inductor metil jasmonato, las concentraciones que fueron probadas no resultan influir en la producción de compuestos fenólicos, flavonoides o la actividad antioxidante en comparación con el control en el día 0 (0 $\mu$ M). Como tal, la actividad antioxidante resulta ser mayor en el control para la concentración 50  $\mu$ M que para el resto de los tratamientos (figura 23, 24 y 25).

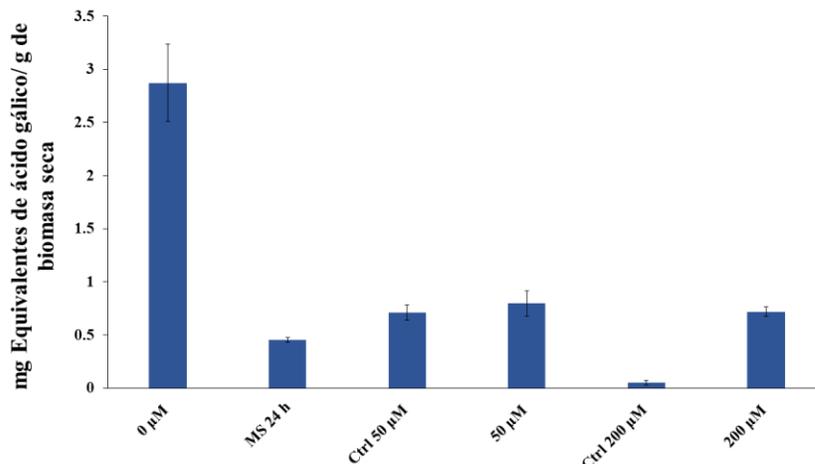


Figura 23. Determinación de compuestos fenólicos totales en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu\text{M}$ . “0  $\mu\text{M}$ ” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con metil jasmonato, “MS 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio MS, “Ctrl 50  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (50  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 50  $\mu\text{M}$ , “Ctrl 200  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (200  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados representan el promedio de medición (n=3) y las barras representan el error estándar.

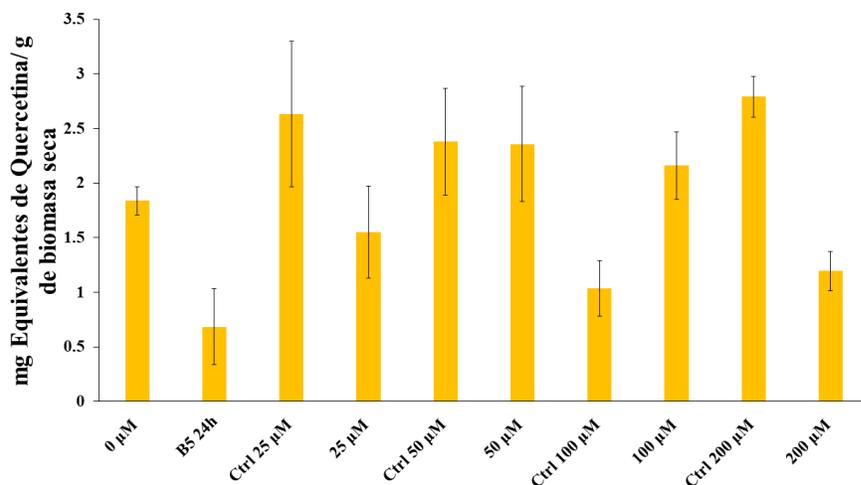
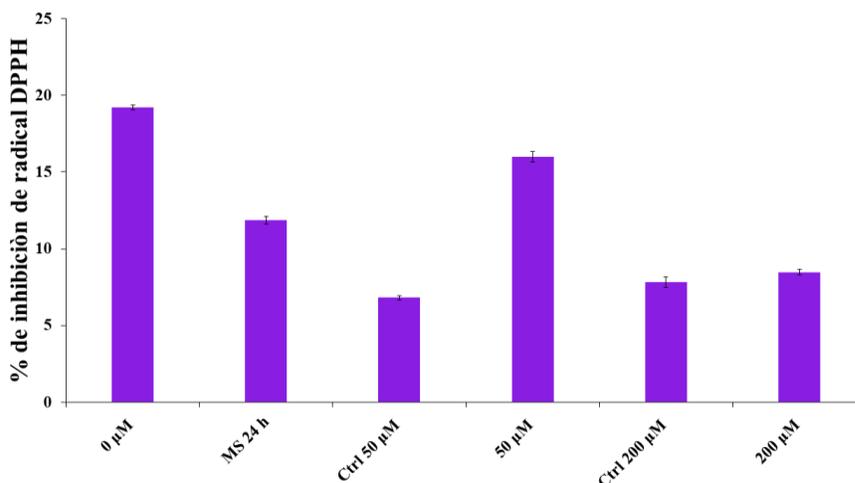


Figura 24. Determinación de flavonoides en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu\text{M}$ . “0  $\mu\text{M}$ ” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con metil jasmonato, “MS 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio MS, “Ctrl 50  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (50  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 50  $\mu\text{M}$ , “Ctrl 200  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (200  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados representan el promedio de medición (n=3) y las barras representan el error estándar.



**Figura 25.** Determinación de capacidad antioxidante en raíces transformadas de *E. platyacanthus* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu\text{M}$ . “0  $\mu\text{M}$ ” raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con metil jasmonato, “MS 24 h” raíces expuestas por 24 h a nuevo medio MS, “Ctrl 50  $\mu\text{M}$ ” raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (50  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{M}$  raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 50  $\mu\text{M}$ , “Ctrl 200  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (200  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados representan el promedio de medición (n=3) y las barras representan el error estándar.

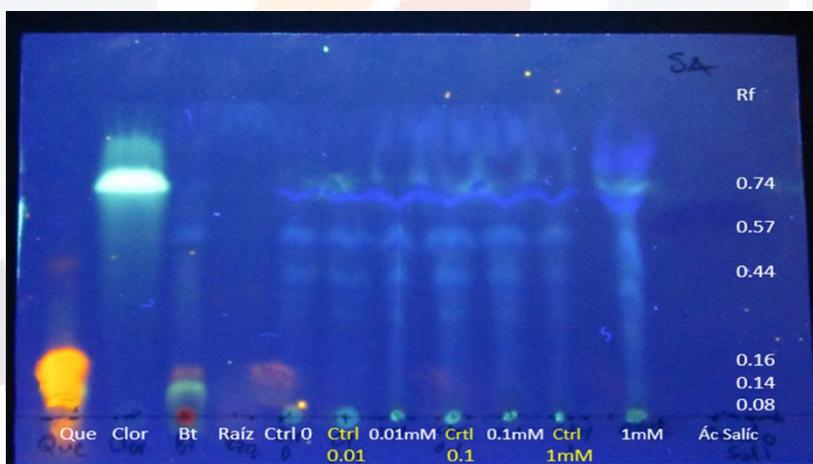
Con lo anterior, al analizar los inductores y su efecto sobre la producción de compuestos fenólicos, las concentraciones y los inductores no incrementan la concentración de los mismos. Acorde a la literatura, las concentraciones utilizadas para nuestros experimentos han funcionado con ciertas especies probadas, sin embargo, este cultivo de raíces de *E. platyacanthus* es uno de los primeros para Cactaceae y su comportamiento empieza a conocerse. Probablemente, si puntualizamos que en promedio el rendimiento de biomasa seca a partir de biomasa fresca es de apenas el 5% se puede pensar en una inhibición de las rutas metabólicas por exceso de inductor a la hora de exponerlo con la biomasa fresca en análisis, aunque no debe descartarse que el uso de los solventes de dilución de las moléculas inductoras pueda estar generando influencia también en las raíces inducidas por cambios en el pH del medio de crecimiento y factores relacionados. Son necesarios estudios sobre otras concentraciones para los inductores en los experimentos y el uso de la menor cantidad de disolvente de inductor a la hora de preparar las soluciones stock y que su adición no modifique condiciones de cultivo que pudieran estar siendo alteradas.

## 6.4. EFECTO DE INDUCTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS EN *T. lophophoroides*

### 6.4.1. Ácido salicílico

Las muestras inducidas con AS (0.01 mM, 0.1 mM y 1.0 mM) al día 35 de su cinética de crecimiento y colectadas a las 24 h después de inducción, fueron liofilizadas y pulverizadas para posteriormente llevar a cabo extracciones metanólicas para análisis por cromatografía en capa delgada (Wagner y Bladt, 1996).

Al revelar la placa (figura 26) se observan fluorescencias azuladas en el Rf 0.74 similares a la del estándar de ácido clorogénico. No se observa en las muestras evaluadas de raíces transformadas otras fluorescencias naranjas o amarillas características del grupo de los flavonoides, a excepción del brote, que presenta una fluorescencia amarilla en el Rf 0.08. La raíz control transformada presenta el mismo patrón de fluorescencia que aquellas inducidas por el ácido salicílico, por lo que se vuelve interesante cuantificar la presencia de compuestos de este tipo flavonoides y determinar si la inducción produjo algún cambio cuantitativo en el perfil químico.



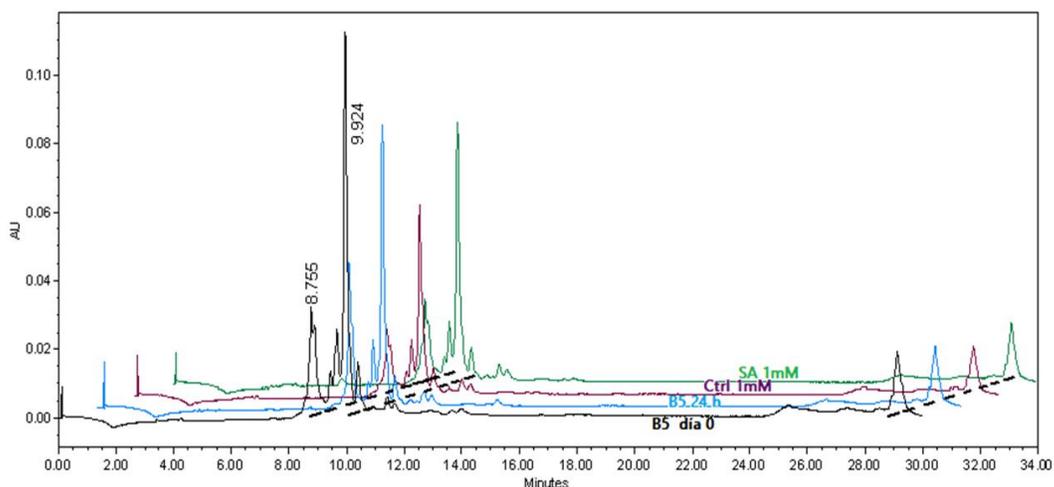
**Figura 26.** Separación por CCF de compuestos fenólicos de raíces transformadas de *T. lophophoroides*. Abreviaciones: Quercetina (Que), ácido clorogénico (Clor), Brote con raíz (Bt), raíz sin transformar (raíz), raíces sin inductor después de 24h solo con nuevo medio B5 (Ctrl 0), raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración (Ctrl 0.01), raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración (Ctrl 0.1), raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración (Ctrl 1mM), ácido salicílico (Ác Salíc). Revelador NP/PEG y luz UV365 nm. Fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3).

Dados los resultados en CCF y las posibilidades de análisis se seleccionó de ácido salicílico solo una concentración de las 3 evaluadas sobre las raíces transformadas y esa fue 1 mM por

su aparente diferencia en cuanto a perfil químico de bandas en comparación con las demás concentraciones evaluadas y su mismo control.

Para establecer la influencia del ácido salicílico sobre la producción de compuestos del tipo ácido clorogénico se cuantificó en el tratamiento seleccionado de ácido salicílico 1 mM el contenido de los picos a tiempo de retención 8.8 min y 10.1 min aproximado con el método de elución de CLAR. Se determinó como paso inicial la curva patrón de feruloil glicósido a las concentraciones de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A partir de estos datos se pudo observar diferencias en cuanto al contenido de compuestos del tipo ácido clorogénico a tiempos de retención aproximado 8.8 min y 10.1 min, obteniendo los siguientes resultados:



**Figura 27.** Cromatograma de CLAR (detección 325 nm) de extractos de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con ácido salicílico a 1 mM (SA 1mM) en comparación con el control negativo (Ctrl 1 mM), las raíces transformadas sin inductor (B5 día 0) y con un cambio en el medio B5 por 24 h (B5 24h). Las raíces transformadas bajo condiciones de agitación (80 rpm) y de oscuridad en B5 que contienen los dos picos mayoritarios (pico 1 RT prom= 8.945 min y pico 2 prom=10.162).

**Tabla 5. Cuantificación del feruloil glucósido (FG) en raíces transformada de *T. lophophoroides*.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Pico 1 (8.8 min.) (mg de FG/ g BS)</b>
B5 día 0	2.7361
B5 24 h	1.5264
SA Control 1mM (Solvente)	0.8424
SA 1mM	2.1653

Las raíces transformadas en el día 0 y 24 h de evaluación con solo cambio de medio nutritivo B5 y sin inducción por alguna molécula contienen a los compuestos mayoritarios. Al adicionar por 24 h el tratamiento control que contiene solo el solvente de dilución (etanol) para conseguir concentración 1 mM se reduce aparentemente el contenido de los picos mayoritarios. Sin embargo, se observa un efecto positivo cuando se agrega el ácido salicílico a concentración 1 mM y el contenido de los picos mayoritarios en relación con el control no se ve reducida drásticamente, por el contrario, la concentración de 1 mM amortigua perfectamente el posible efecto del etanol sobre la disminución de los picos mayoritarios puesto que esta aparente reducción en el control se deba al etanol (solvente de dilución). Al comparar este incremento en el tratamiento de ácido salicílico 1 mM con los tratamientos en los que únicamente se cambió el medio nutritivo B5 por uno nuevo durante las mismas 24 h se observa un aumento sobre todo en los picos RT 8.8 y RT 10.1 min. Podría pensarse que algún precursor de alguna de estas dos señales (RT 8.8 min y RT 10.1 min) está contribuyendo a la formación de compuestos en el RT 29.1 o entre ellos. Al comparar con los contenidos en el medio basal (día 0 sin tratamiento o día 35 de la fase exponencial de crecimiento de nuestro modelo de estudio) observamos cantidades muy similares en cuanto a las cuantificaciones de los picos mayoritarios, a lo que puede atribuirse el cambio de fuente de carbono lo que produzca un estado de latencia o adaptación a las nuevas condiciones, siendo el control de cambio B5 y exposición a 24 h nuestro monitor. Por lo tanto, existe un cambio en la concentración de los picos mayoritarios en 24 h al adicionar ácido salicílico 1 mM y además se nota un incremento notable a la par del pico a RT 29.1 min que podría ser un derivado de los picos RT 8.8 min o RT 10.1 min.

La determinación de compuestos fenólicos para los distintos tratamientos muestra que en comparación con el tratamiento sin inductor en el día 0 no hay incremento de dichos compuestos, sin embargo, a evaluar el contenido de flavonoides se observa un ligero incremento en el contenido de estos al someterlos al tratamiento sobre todo en la concentración de 1.0 mM (figura 28).

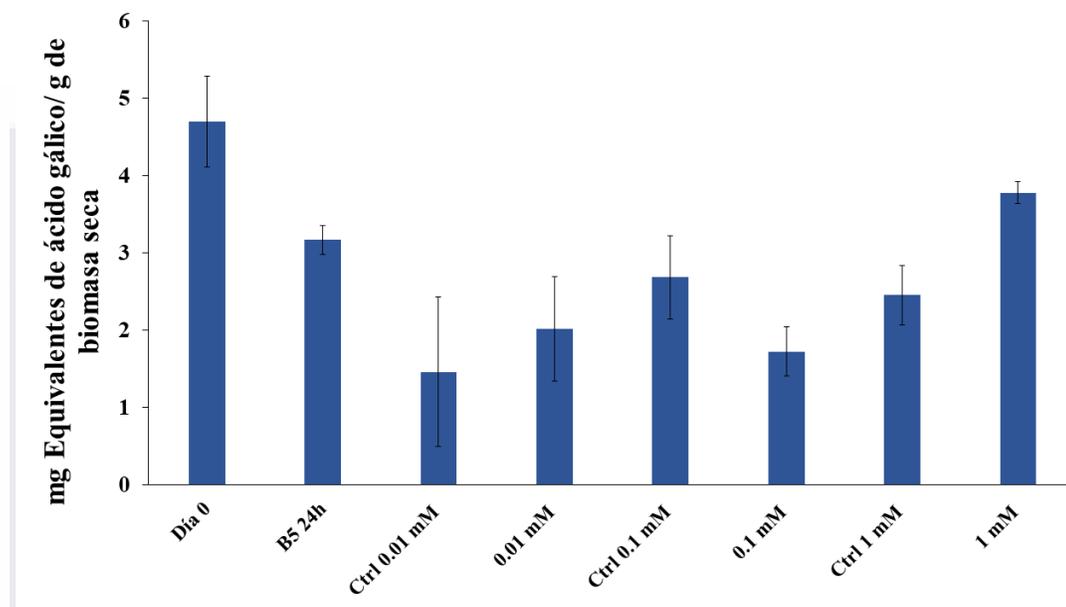


Figura 28. Determinación de compuestos fenólicos en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.01mM, 0.1 mM y 1.0 mM. “Día 0” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con ácido salicílico, “B5 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio B5, “Ctrl 0.01 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.01 mM), “0.01 mM” son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.01 mM, “Ctrl 0.1 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.1 mM), “0.1 mM” son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.1 mM, “Ctrl 1 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (1.0 mM), “1 mM” son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 1.0 mM. Los resultados representan el promedio de medición de 3 muestras distintas (n=3) y las barras representan el error estándar.

Al parecer, la inducción con ácido salicílico contribuye al incremento de compuestos del tipo flavonoide, aunque no propiamente con actividad antioxidante importante.

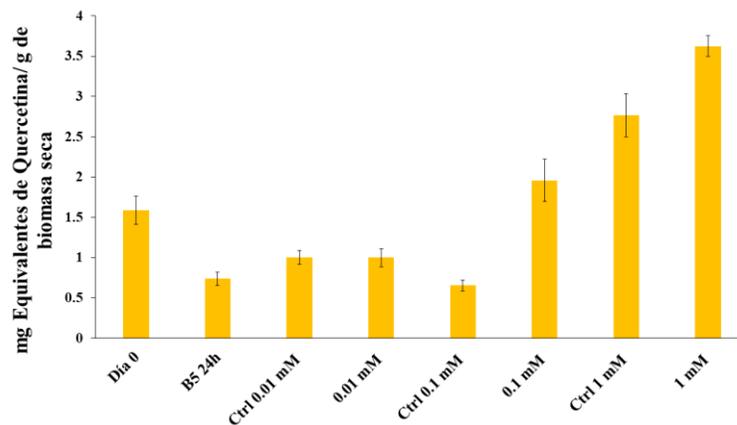


Figura 29. Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.1 mM y 1.0 mM. “Día 0” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con ácido salicílico, “B5 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio B5, “Ctrl 0.01 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.01 mM), “0.01 mM” son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.01 mM, “Ctrl 0.1 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.1 mM), “0.1 mM” son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.1 mM, “Ctrl 1.0 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (1.0 mM), 1.0 mM son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 1.0 mM. Los resultados representan el promedio de medición (n=3) y las barras representan el error estándar.

La actividad antioxidante no muestra una diferencia significativa entre los tratamientos en el día 0 y los inducidos (figura 30).

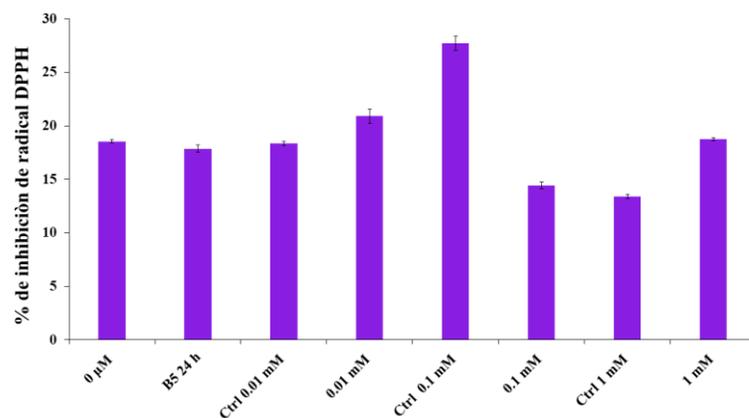
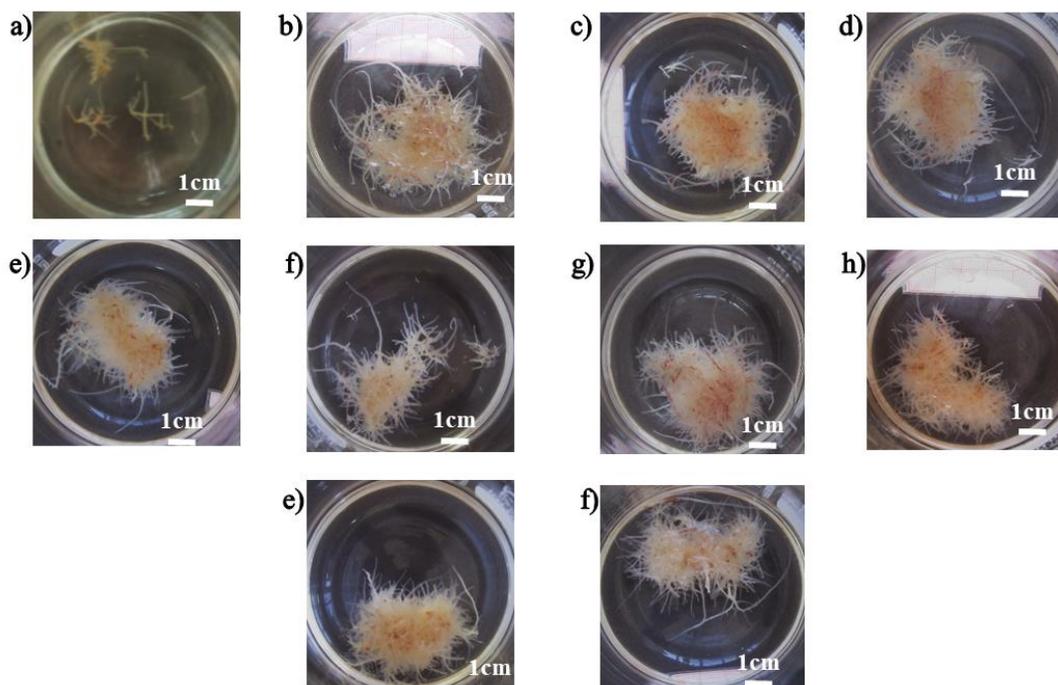


Figura 30. Determinación de actividad antioxidante en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por ácido salicílico a concentraciones de 0.01 mM, 0.1 mM y 1.0 mM. “0 μM” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con ácido salicílico, “B5 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio B5, “Ctrl 0.01 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.01 mM), “0.01 mM” son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.01 mM, “Ctrl 0.1 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (0.1 mM), “0.1 mM” son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 0.1 mM, “Ctrl 1.0 mM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (1.0 mM), 1.0 mM son raíces expuestas a ácido salicílico a concentración de 1.0 mM. Los resultados representan el promedio de medición (n=3) y las barras representan el error estándar.

### 6.4.2. Metil jasmonato

En la figura 31, se observan las raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por MJ (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 200  $\mu$ M) al día 35 de su cinética de crecimiento.

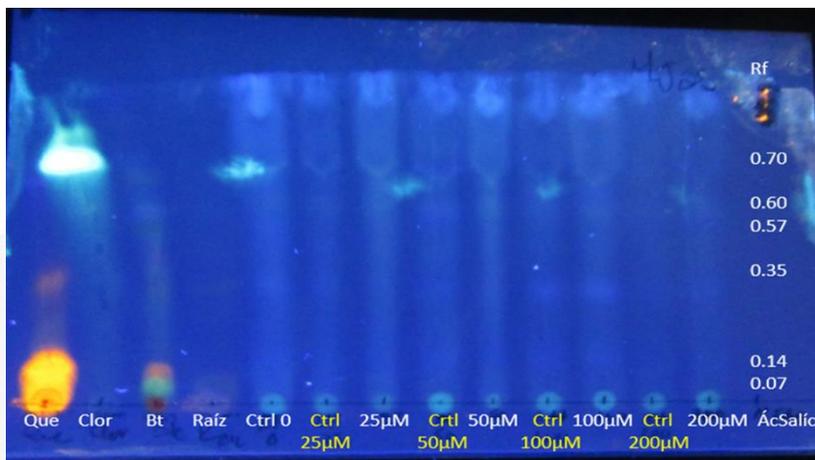


**Figura 31.** Aspecto de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas en medio en agitación B5 a 80 rpm y 25+ 2 ° C con distintas concentraciones de metil jasmonato. a) control en el día 0 de inoculación, b) Control colectado el día 35, c) Control con solvente para la concentración 25  $\mu$ M, d) Control con solvente para la concentración 50  $\mu$ M, e) Control con solvente para la concentración 100  $\mu$ M, f) Control con solvente para la concentración 200  $\mu$ M, g) Concentración de metil jasmonato de 25  $\mu$ M, h) de 50  $\mu$ M, I) de 100  $\mu$ M y j) de 200  $\mu$ M, de c-j colectadas a las 24 h de tratamiento.

Las muestras inducidas y colectadas a las 24 h después de estar expuestas al metil jasmonato fueron liofilizadas y pulverizadas para posteriormente llevar a cabo extracciones metanólicas para análisis por cromatografía en capa delgada (Wagner y Bladt, 1996).

En la Figura 32, se observa la separación por cromatografía del extracto metanólico de las raíces transformadas de *T. lophophoroides*, las fluorescencias azuladas en el Rf 0.70 similares a la del estándar de ácido clorogénico. No se observa en las muestras de raíces transformadas otras fluorescencias naranjas o amarillas, a excepción del brote, que presenta una florescencia amarilla en el Rf 0.07 aproximadamente y otra en el Rf 0.14 color naranja. La raíz control transformada aparentemente presenta el mismo patrón de florescencia que aquellas inducidas

por el metil jasmonato, por lo que solo la cuantificación de los compuestos tipo flavonoides pueden determinar alguna diferencia en el perfil químico tras la inducción por metil jasmonato.



**Figura 32.** Separación de compuestos fenólicos por CCF de raíces transformadas de *T. lophophoroides*  
 Abreviaciones: “Que” quercetina, “Clor” ácido clorogénico, “Bt” brote con raíz; “Raíz” raíz sin transformar, “Ctrl 0” raíces sin inductor después de 24h solo con nuevo medio B5, “Ctrl 25µM” raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración, “25 µM” raíces con inductor expuestas después de 24 h a 25 µM de metil jasmonato, “Ctrl 50 µM” raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración, “50 µM” raíces con inductor expuestas después de 24 h a µM de metil jasmonato, “Ctrl 100 µM” raíces sin inductor expuestas después de 24 h al solvente de dilución de esa concentración, “100 µM” raíces con inductor expuestas después de 24 h a 100 µM de metil jasmonato. “MeJa” es el inductor como tal metil jasmonato estándar. Revelado con NP/PEG y luz UV 365 nm. Fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3).

Tanto las raíces transformadas sin cambio de medio (B5 día 0) y aquellas con cambio de medio por 24 h (B5 24 h) contienen a los picos mayoritarios. Se observa una aparente disminución en la presencia de los picos mayoritarios para las muestras con cambio de medio en las primeras 24 h. Dentro de las evaluaciones además se incluye un control (MeJa Control 200 mM) que contiene solo al solvente (etanol) de dilución del inductor. Al comparar éste contra los controles sin inductor la disminución de los picos mayoritarios se hace más evidente, sin embargo una vez que se agrega el inductor bajo las mismas condiciones con la diferencia de la presencia de metil jasmonato a concentración 200 mM se observa un incremento en las concentraciones de los picos RT 8.8, RT 10.1 min y Pic 29.1 con respecto al control (solvente) y una vez comparando el tratamiento de metil jasmonato 200 mM contra los demás controles se observa un incremento de los picos RT 8.8 min y pic 29.1 min, disminuyendo a la par el RT 10.1, lo que nos podría indicar la movilidad de un compuesto derivado de RT 10.1 min al RT 29.1 en respuesta al estímulo por metil jasmonato.

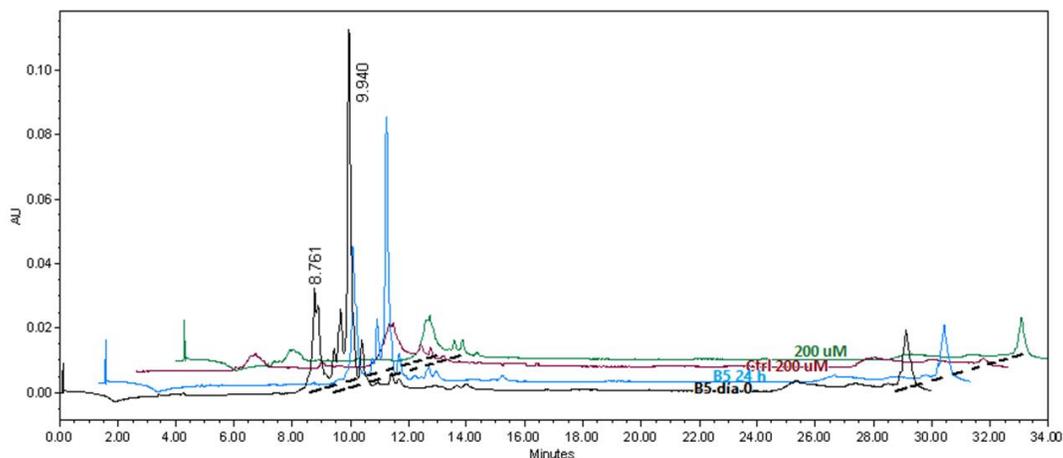


Figura 33. Cromatograma de HPLC (detección 325 nm) del extracto de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con ácido metil jasmonato 200  $\mu$ M (200  $\mu$ M). Comparación del efecto de metil jasmonato 200  $\mu$ M con un control (Ctrl 200  $\mu$ M) conteniendo solo el solvente de dilución del inductor en estudio, las raíces a las cuales se les cambió solo el medio de cultivo (B5 24h), y las raíces a las cuales no se les sometió a ningún tratamiento (B5 día 0).

Tabla 6 Cuantificación del feruolil glucósido en raíces transformadas de *T. lophophoroides*.

Tratamiento	Pico 1 (8.8 min apróx) mg FG/ g BS
B5 día 0	2.7361
B5 24 h	1.5264
Me Ja Control 200 $\mu$ M (Solvente dilución) 24 h	0.4658
Me Ja 200 $\mu$ M 24 h	2.2717

Las determinaciones de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante se llevaron a cabo para evaluar el efecto de la inducción sobre la producción de este tipo de compuestos (figura 34, 35 y 36).

En el caso de las determinaciones de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante no se observa una diferencia significativa entre el contenido calculado para los tratamientos con metil jasmonato y los controles. El inductor como tal no influye para esta especie a estas concentraciones en la acumulación de los compuestos determinados.

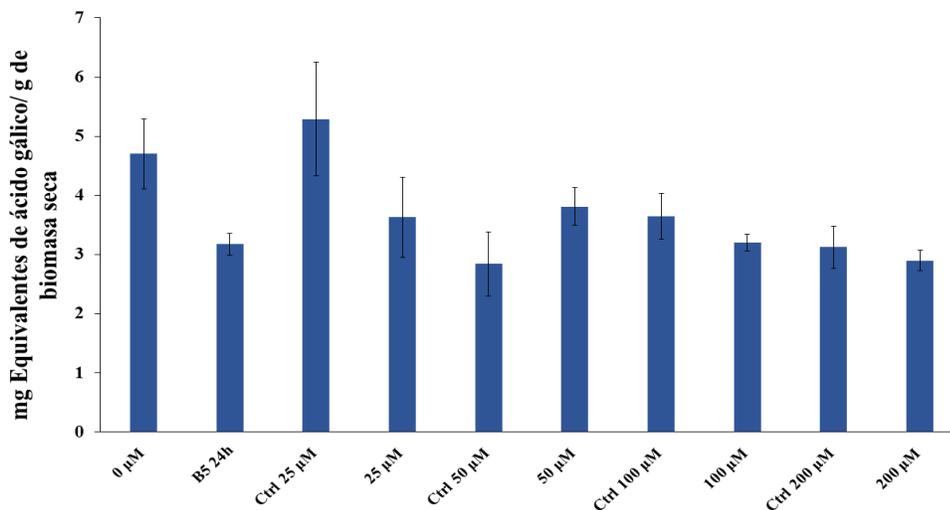


Figura 34. Determinación de compuestos fenólicos totales en raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200 µM. “0 µM” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con metil jasmonato, “B5 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio B5, “Ctrl 25 µM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (25 µM), 25 µM son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 25 µM, “Ctrl 50 µM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (50 µM), 50 µM son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 50 µM, “Ctrl 200 µM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (200 µM), 200 µM son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 200 µM. Los resultados representan el promedio de medición (n=3) y las barras representan el error estándar.

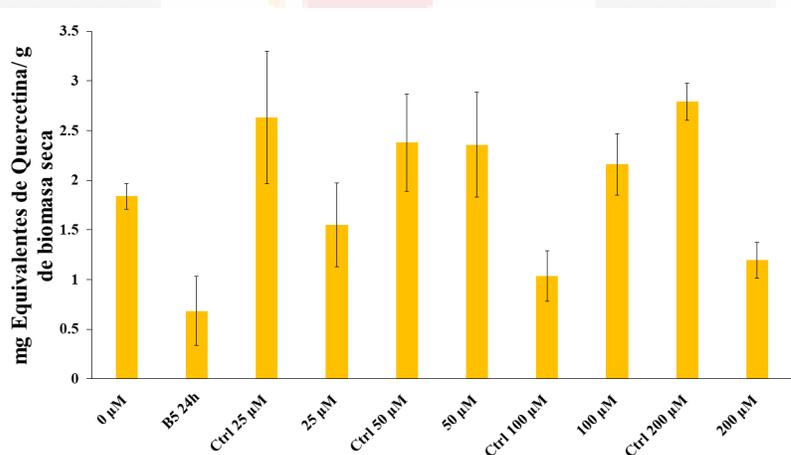


Figura 35. Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200 µM. “0 µM” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con metil jasmonato, “B5 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio B5, “Ctrl 25 µM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (25 µM), 25 µM son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 25 µM, “Ctrl 50 µM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (50 µM), 50 µM son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 50 µM, “Ctrl 200 µM” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa

concentración (200  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados representan el promedio de medición ( $n=3$ ) y las barras representan el error estándar.

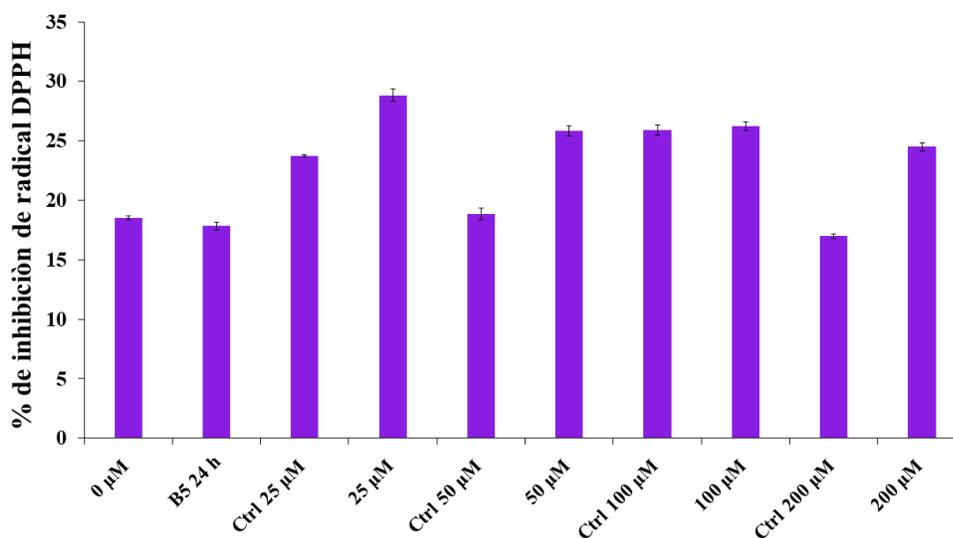
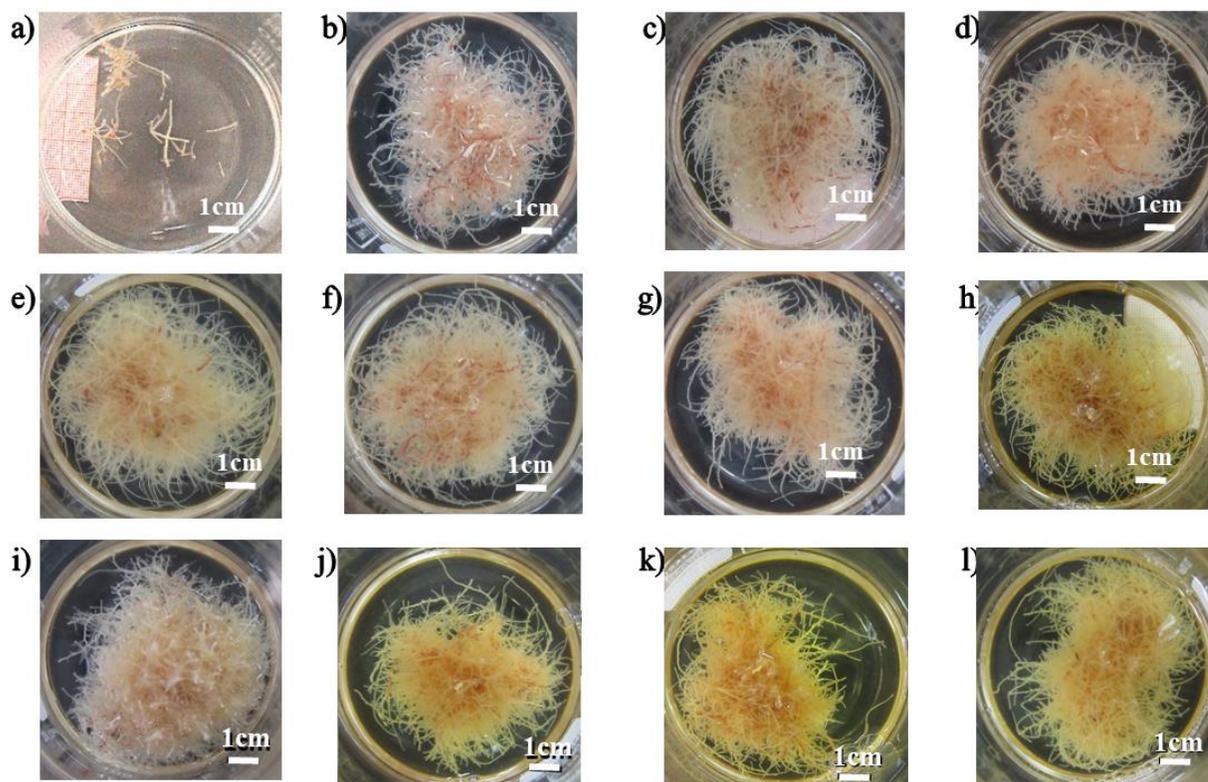


Figura 36. Determinación de capacidad antioxidante en raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas por metil jasmonato a concentraciones de 50 y 200  $\mu\text{M}$ . “0  $\mu\text{M}$ ” representa las raíces al día 35 de la cinética de crecimiento colectadas antes de iniciar la inducción con metil jasmonato, “B5 24 h” son las raíces expuestas por 24 h a nuevo medio B5, “Ctrl 25  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (25  $\mu\text{M}$ ), 25  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 25  $\mu\text{M}$ , “Ctrl 50  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (50  $\mu\text{M}$ ), 50  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 50  $\mu\text{M}$ , “Ctrl 200  $\mu\text{M}$ ” son las raíces expuestas a solvente de dilución para esa concentración (200  $\mu\text{M}$ ), 200  $\mu\text{M}$  son raíces expuestas a metil jasmonato a concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados representan el promedio de medición ( $n=3$ ) y las barras representan el error estándar.

### 6.4.3. Ácido abscísico

Los resultados de las muestras inducidas por ácido abscísico (20  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  120  $\mu\text{M}$ ) por 24 h y 12 días en el día 35 de crecimiento se presentan a continuación. En la figura 37, se observan las raíces transformadas de *T. lophophoroides*.

Las muestras inducidas fueron colectadas a las 24 horas y 12 días luego de su contacto con el ácido abscísico a las distintas concentraciones, fueron enjuagadas, liofilizadas y extraídas según la metodología propuesta por Wagner (1996) para posteriormente realizar análisis de las mismas por CCF y cuantificar los picos mayoritarios (8.8 min y 10.9 min) a través de un análisis por HPLC.



**Figura 37.** Aspecto de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas en medio en agitación B5 a 80 rpm y  $25\pm 2^\circ$  C con distintas concentraciones de ácido abscísico. a) control en el día 0 de inoculación, b) Control colectado el día 35, c) Control con medio B5, d) Control con solvente, e) Concentración de ácido abscísico de 20  $\mu$ M, f) de 60  $\mu$ M y g) de 120  $\mu$ M, de colectadas a las 24 h (c-g) de tratamiento; h) Control con medio B5, i) Control con solvente, j) Concentración de ácido abscísico de 20  $\mu$ M, k) de 60  $\mu$ M y l) de 120  $\mu$ M, de colectadas a los 12 días (h-l) de tratamiento.

La figura 38 presenta fluorescencia azuladas en el Rf 0.73 similar a la que presenta la banda de ácido clorogénico. En las muestras no se observan otras fluorescencias amarillas o naranjas, más si la presencia de otras bandas que no se presentan en las raíces sin transformar ni el brote de *T. lophophoroides* a los RF 0.33, 0.5, 0.56 y 0.66; observando una aparente disminución en la intensidad de las bandas para los tratamientos 20 y 60  $\mu$ M a los 7 días en comparación con 24 h y sus controles de 24 h, a excepción de la concentración de 120 M donde se mantiene la intensidad de las bandas a las 24 h y 12 días después de la exposición al ABA en comparación con el control tanto a las 24 h como a los 12 días y B5 también a ambos periodos de tiempo. Es necesaria la cuantificación de los resultados de análisis por HPLC para determinar un cambio en el perfil químico o ausencia del mismo.

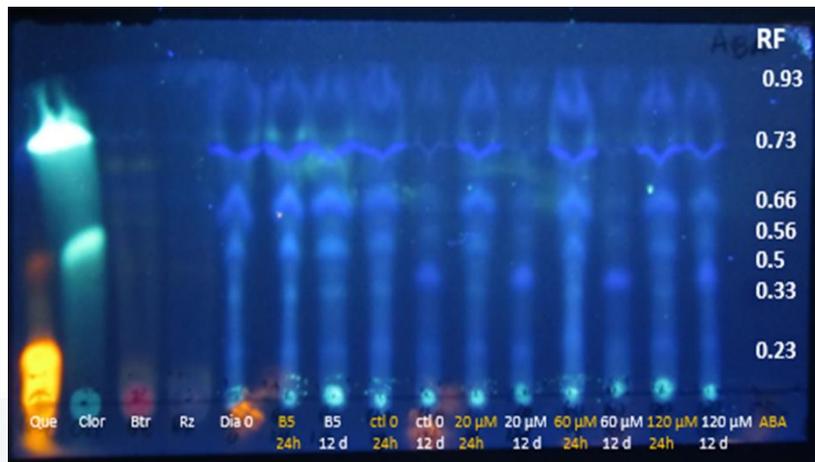


Figura 38. Separación por CCF de compuestos fenólicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides*. “Que” quercetina, “Clor” ácido clorogénico, “Btr” brote y raíz, “Raíz” raíz sin transformar, “B5 24 h” raíces sin inductor después de 24h solo con nuevo medio B5; “B5 12 d” raíces sin inductor después de 12días solo con nuevo medio B5; “Ctrl 0  $\mu\text{M}$  24h” y “Ctrl 0  $\mu\text{M}$  12 días” raíces sin inductor expuestas después de 24 h y 12 días respectivamente al solvente de dilución de las distintas concentraciones, “20  $\mu\text{M}$  24 h” y “20  $\mu\text{M}$  12 días” raíces con inductor expuestas después de 24 h y 12 días a esa concentración 20  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico, “60  $\mu\text{M}$  24 h” y “60  $\mu\text{M}$  12 días” son las raíces con inductor expuestas después de 24 h y 12 días a 60  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico y finalmente “120  $\mu\text{M}$  24 h” y “120  $\mu\text{M}$  12 días” raíces con inductor expuestas después de 24 h y 12 días a 120  $\mu\text{M}$  de ácido abscísico. “ABA” es el inductor ácido abscísico. Revelado con NP/PEG y luz UV 365 nm. Fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3)

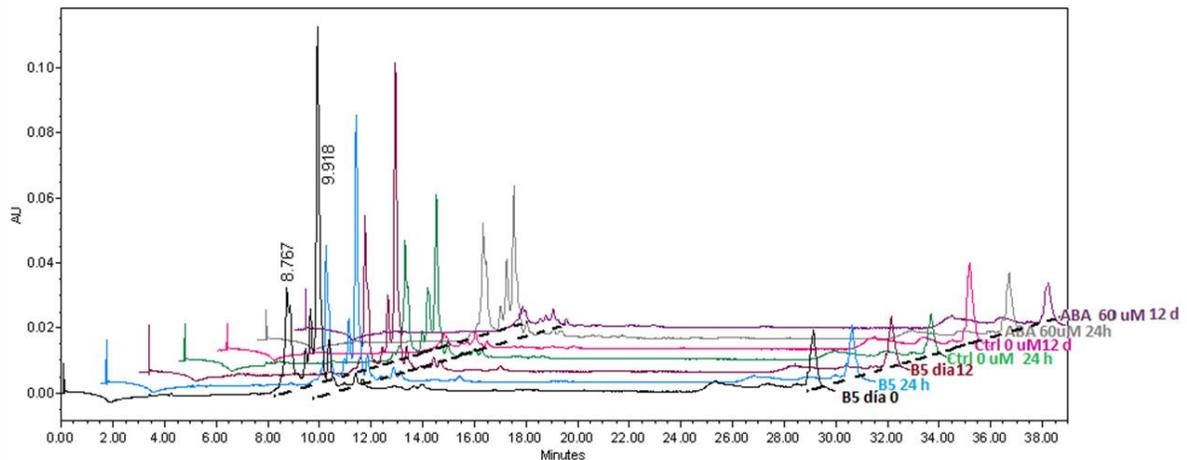


Figura 39. Cromatograma de CLAR (detección 325 nm) de extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con ácido abscísico 60  $\mu\text{M}$  (ABA 60  $\mu\text{M}$ ). Día 0 (B5 día 0), raíces transformadas con cambio de medio de cultivo B5 por 24 h (B5 24h) y 12 días (B5 día 12), Testigo de solvente de dilución para inductor por 24 h (Ctrl 0  $\mu\text{M}$  24h) y por 12 días (Ctrl 0  $\mu\text{M}$  12 d), inductor de ácido abscísico 60  $\mu\text{M}$  a 24 h (ABA 60  $\mu\text{M}$  24h) y 12 días (ABA 60  $\mu\text{M}$  12 d) de exposición. (pico 1 RT prom= 8.945 min y pico 2 prom=10.162).

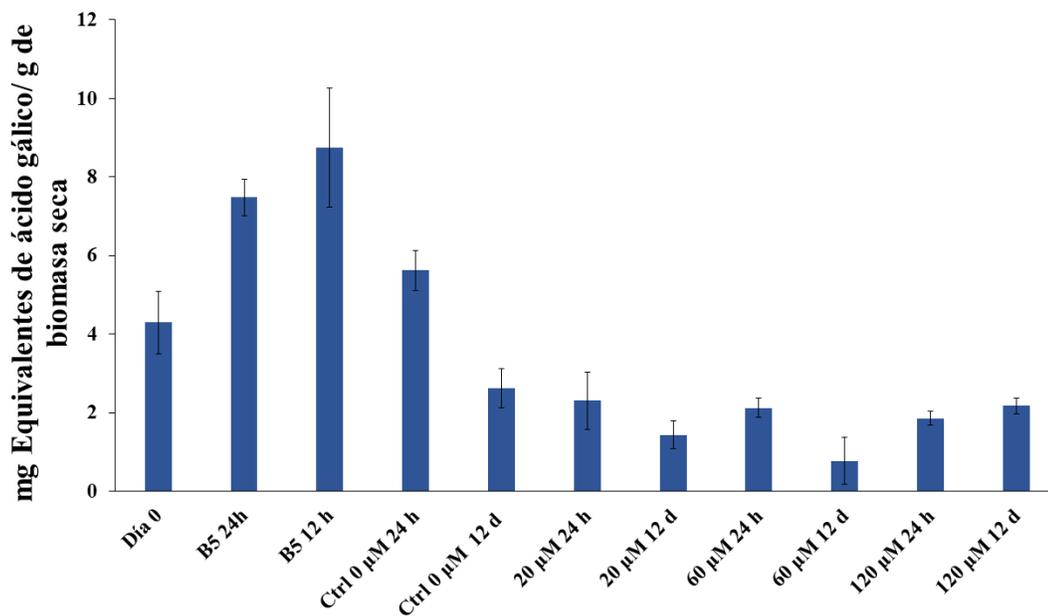
**Tabla 7 Cuantificación del feruloil glucósido en raíces transformada de *T. lophophoroides* expuestas a ácido absísico**

<b>Tratamiento</b>	<b>Pico 1 (8.8 min apróx) mg FG/ g BS</b>
B5 día 0	2.7361
B5 24 h	1.5264
B5 12 días	1.8625
Control 60 $\mu$ M (Solvente dilución) 24 h	2.0900
Control 60 $\mu$ M (Solvente dilución) día 12	0.1606
ABA 60 $\mu$ M 24 h	1.2464
ABA 60 $\mu$ M día 12	0.2509

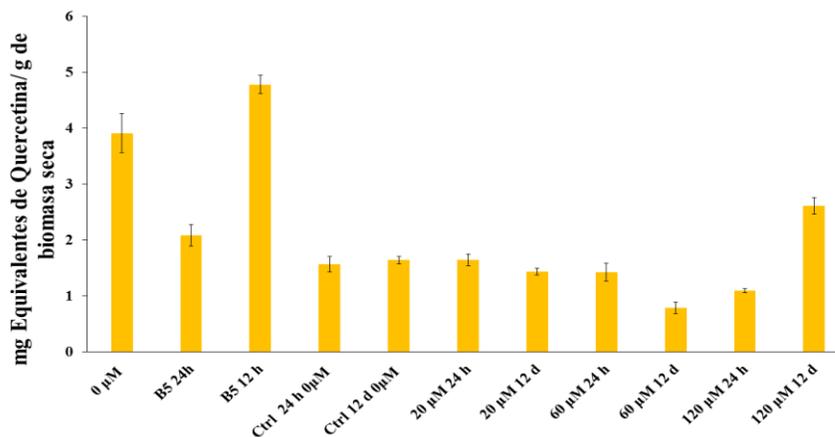
De igual manera que en los anteriores tratamientos el solvente de dilución tiene efecto sobre la expresión de los picos mayoritarios, sin embargo para este caso el ácido absísico no tuvo un efecto estimulante sobre la expresión de los mismos tanto a 60  $\mu$ M por 24 h ni a los mismo 60  $\mu$ M por 12 días, por el contrario, el incremento de la exposición al inductor en el tiempo pareciera reducir la presencia de estos compuestos mayoritarios, similar al patrón que se reproduce al analizar el efecto del solvente de dilución a estos dos tiempos también de 24 h y 12 días sobre las raíces transformadas, por lo que se puede pensar que el efecto de reducción de la expresión de estos compuestos lo presenta el solvente de dilución y no el inductor, así el ácido absísico no tuvo un efecto visiblemente favorable para la mayor expresión de los compuestos mayoritarios encontrados en las raíces transformadas creciendo de manera basal en medio B5 sin inductores.

Para el caso de las determinaciones de los compuestos fenólicos las raíces inducidas presentan descenso en cuanto al contenido de este tipo de compuestos en comparación con las raíces sin inducir en el día 0 (figura 40). Lo mismo sucede para el caso de la determinación de flavonoides a excepción de la inducción a concentración de 120  $\mu$ M donde se observa un incremento en la cuantificación de flavonoides en comparación con los tratamientos control.

Posiblemente el inductor inhiba la producción de compuestos tipos flavonoide en las primeras horas a bajas concentraciones y la producción se comience a restablecer a las máximas concentraciones evaluadas en este estudio a mayor tiempo de exposición (12 días) (figura 41). La actividad antioxidante no muestra diferencia entre los tratamientos control y los de inducción con ácido abscísico (figura 42).

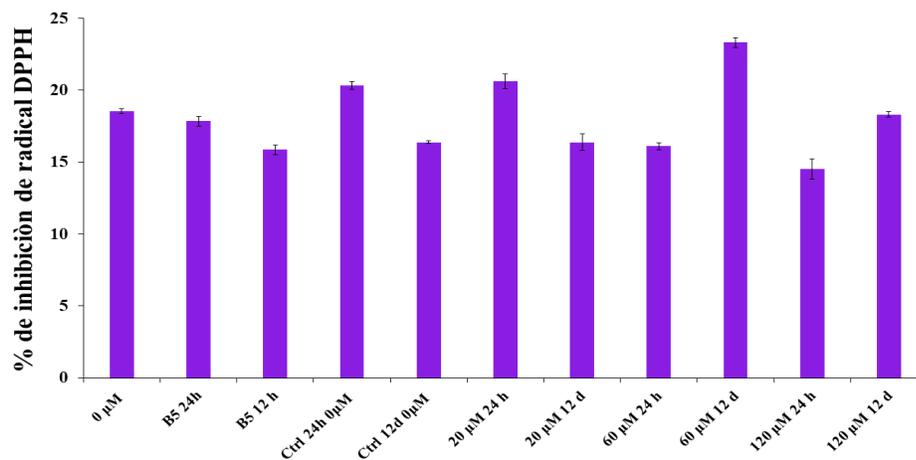


**Figura 40.** Determinación de compuestos fenólicos totales en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de ácido abscísico. “Día 0” denota el día de inoculación de los matracas para crecimiento de las raíces hasta la fase exponencial de crecimiento, “B5 24h” refiere las raíces colectadas durante la fase exponencial de crecimiento después de 24 h en contacto con medio B5, “B5 12 d” refiere las raíces colectadas después de 12 d en contacto con medio B5, “Ctrl 0 µM 24 h” y “Ctrl 0 µM 12 d” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 12 días respectivamente, “20 µM 24 h” y “20 µM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 20 µM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días, “60 µM 24 h” y “60 µM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 60 µM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días, “120 µM 24 h” y “120 µM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 120 µM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días.



**Figura 41.** Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de ácido abscísico. “0 μM” denota el día de inoculación de los matraces para crecimiento de las raíces hasta la fase exponencial de crecimiento, “B5 24h” refiere las raíces colectadas durante la fase exponencial de crecimiento después de 24 h en contacto con medio B5, “B5 12 d” refiere las raíces colectadas después de 12 d en contacto con medio B5, “Ctrl 0 μM 24 h” y “Ctrl 0 μM 12 d” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 12 días respectivamente, “20 μM 24 h” y “20 μM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 20 μM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días, “60 μM 24 h” y “60 μM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 60 μM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días, “120 μM 24 h” y “120 μM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 120 μM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días.

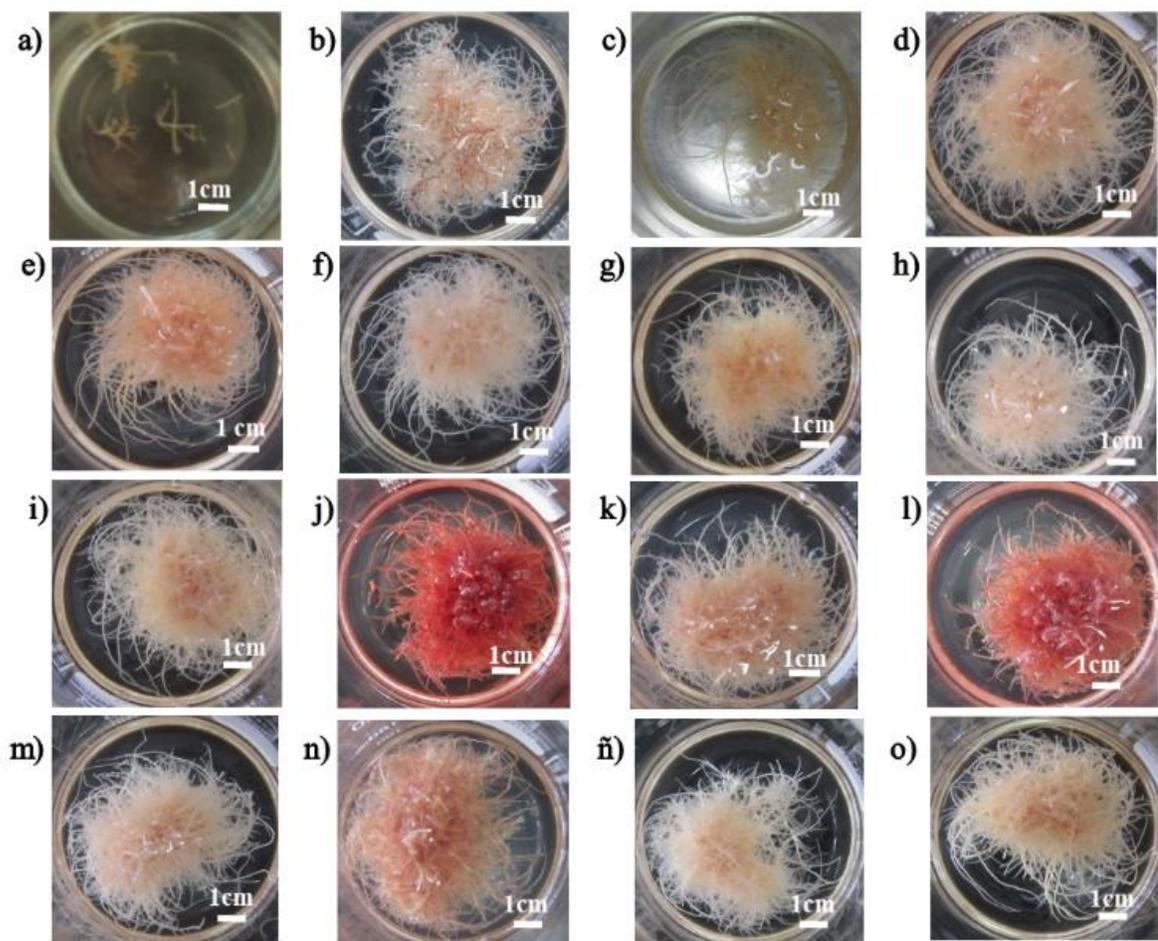
Determinación de actividad antioxidante:



**Figura 42.** Determinación de actividad antioxidante en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de ácido abscísico. “0 μM” denota el día de inoculación de los matraces para crecimiento de las raíces hasta la fase exponencial de crecimiento, “B5 24h” refiere las raíces colectadas durante la fase exponencial de crecimiento después de 24 h en contacto con medio B5, “B5 12 d” refiere las raíces colectadas después de 12 d en contacto con medio B5, “Ctrl 0 μM 24 h” y “Ctrl 0 μM 12 d” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 12 días respectivamente, “20 μM 24 h” y “20 μM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 20 μM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días, “60 μM 24 h” y “60 μM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 60 μM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días, “120 μM 24 h” y “120 μM 12 d” son raíces en contacto con la concentración 120 μM de ácido abscísico después de 24 horas y 12 días.

#### 6.4.4. Quitosano

Los resultados de la inducción con Q ( $10 \text{ mgL}^{-1}$ ,  $40 \text{ mgL}^{-1}$  y  $400 \text{ mgL}^{-1}$ ) por 24 h y 7 días en el día 35 de crecimiento se muestran en la figura 43.



**Figura 43.** Aspecto de las raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas en medio en agitación B5 a 80 rpm y  $25 \pm 2^\circ \text{ C}$  con distintas concentraciones de Quitosano. A) Día 0; b) día 35; c) medio B5 24h, d) solvente equivalente a la concentración  $10 \text{ mg/L}$ , e)  $10 \text{ mg/L}$ , f) solvente equivalente a la concentración  $40 \text{ mg/L}$ , g)  $40 \text{ mg/L}$ , h) solvente equivalente a la concentración  $400 \text{ mg/L}$ , i)  $400 \text{ mg/L}$  todos los anteriores (c-i) a tratamiento de 24h; j) medio B5 por 7 días, k) solvente equivalente a la concentración  $10 \text{ mg/L}$ ; l)  $10 \text{ mg/L}$ ; m) solvente equivalente a la concentración  $40 \text{ mg/L}$ ; n)  $40 \text{ mg/L}$ ; ñ) solvente equivalente a la concentración  $400 \text{ mg/L}$ ; o)  $400 \text{ mg/L}$  todos los anteriores (j-o) a 7 días de duración de los tratamientos.

B

andas de fluorescencia azuladas se observan en la cromatografía en capa delgada que eluyen a  $R_f$  similares a los del estándar de referencia ácido clorogénico. Además, las raíces transformadas inducidas por los distintos tratamientos presentan bandas fluorescentes azules que no se observan en las muestras de brote y raíz sin transformar. Esto demuestra

nuevamente la capacidad de las raíces transformadas de generar metabolitos en mayor proporción u otros en general que la propia raíz sin transformar o el brote ya que se observan fluorescencias a Rf de 0.2, 0.33, 0.71 y 0.8. Sin embargo, entre los tratamientos evaluados para cada concentración de inductor a distintos periodos de tiempo no se observa aparente diferencia en cuanto a la intensidad de las bandas que se pueden observar, solo las bandas de concentraciones 400 mg/L son las que reducen su intensidad tanto en las pruebas control como en las concentraciones a 24 h y 7 días de exposición al inductor quitosano (figura 44). Para poder determinar si existe diferencia en la expresión de compuestos del tipo ácido clorogénico estimulados por el quitosano es necesario establecer la cuantificación por HPLC (figura 45).

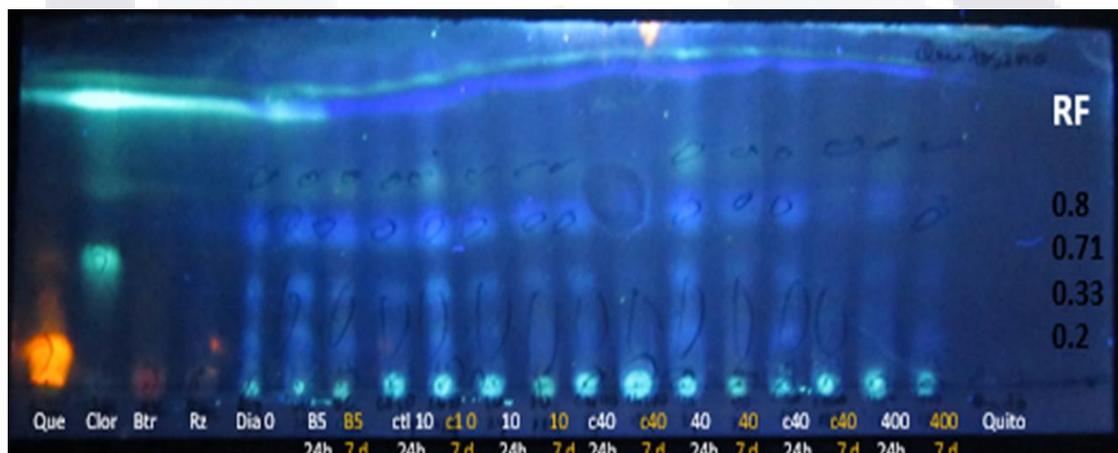
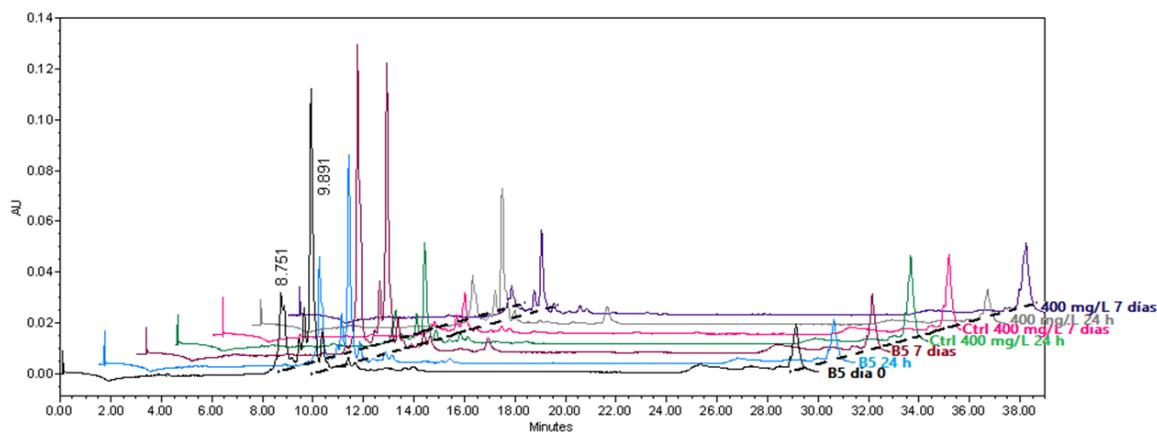


Figura 44. Separación por CCF de compuestos fenólicos en raíces transformadas de *T. lophophoroides*. “Que” quercetina, “Clor” ácido clorogénico, “Bt” brote y raíz; “Raíz” raíz sin transformar, “B5 24 h” raíces sin inductor después de 24 h solo con nuevo medio B5; “B5 7 d” raíces sin inductor después de 7 días solo con nuevo medio B5; “Ctrl 10 24h” y “C10 7 días” raíces sin inductor expuestas después de 24 h y 7 días respectivamente al solvente de dilución de la concentración de 10 mg/L, “10 24 h” y “10 7 d” raíces con inductor expuestas después de 24 h y 7 días a esa concentración 10 mg/L  $\mu$ M de quitosano, “C40 24h” y “C40 7 días” son las raíces sin inductor expuestas después de 24 h y 7 días respectivamente al solvente de dilución de la concentración de 40 mg/L “40 24 h” y “40 7 días” raíces con inductor expuestas después de 24 h y 7 días a 40 mg/L de quitosano; “C400 24h” y “C400 7 días” raíces sin inductor expuestas después de 24 h y 7 días respectivamente al solvente de dilución de la concentración de 00 mg/L y finalmente “400 24 h” y “400 10 mg/L 7” raíces con inductor expuestas después de 24 h y 7 días a 400 mg/L de quitosano. “Quito” Quitosano. Revelado con NP/PEG y luz UV 365 nm. fase móvil de agua: acetonitrilo (7:3).

Las muestras con cambio de medio B5 tanto a 24 h como a los 7 días mostraron disminución en cuanto a la concentración de los picos mayoritarios RT 8.8 y RT 10.9 min lo que se atenúa en el tiempo, observándose que al día 7 hay un incremento en el contenido del pico

RT 29.1 min, lo que probablemente esté relacionado con la modificación de los picos mayoritarios al pico RT 29.1 min. Comparando esto con los resultados del control de solvente (ácido acético 6%) del inductor, el control reduce el contenido de los picos mayoritarios desde las primeras 24 h de exposición y se sigue reduciendo hasta el día 7, a excepción del pico RT 29.1 min ya que este se incrementa en el día 7 coincidentemente junto con la reducción del contenido de los picos mayoritarios RT 8.8 min y RT 10.1 min, posiblemente el medio ligeramente ácido favorezca una ruta metabólica que dé como resultado un incremento en el contenido de RT 29.1 min. En relación con los tratamientos con quitosano se favorece la producción de los picos mayoritarios dentro de las primeras 24 h, amortiguando el efecto del solvente de dilución, dentro de los próximo 7 días se reduce el contenido, pero incrementa el contenido de RT 29.1 min a medida de se reduce el de RT 8.8 min y RT 10.1 min. El quitosano tiene efecto sobre el metabolismo basal de los cultivos de raíces transformadas sobre todo al incremento de los compuestos mayoritarios y un tercero a RT 29.1 min y quizá otros.



**Figura 45. Cromatograma de HPLC (detección 325 nm) de muestras (4mg/mL) de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas con quitosano 400 mg/L. Comparación de los tratamientos de raíz trasformada sin inductor al día 0 (B5 día 0), raíces transformadas con cambio de medio de cultivo B5 por 24 h (B5 24h) y 7 días (B5 7 días), control de solvente de dilución para inductor por 24 h (Ctrl 400 mg/L 24h) y por 7 días (Ctrl 400 mg/L 7 días d), quitosano 400 mg/L a 24 h (400 mg/L 24h) y 7 días (400 mg/L 7 d) de exposición. Raíces transformadas de *T. lophophoroides* bajo condiciones de agitación (80 rpm) y de oscuridad en B5 que contienen los dos picos mayoritarios (pico 1 RT prom= 8.945 min y pico 2 prom=10.162). Se corrieron las muestras con el mismo método de análisis por HPLC que se utilizó para correr el estándar de ácido clorogénico.**

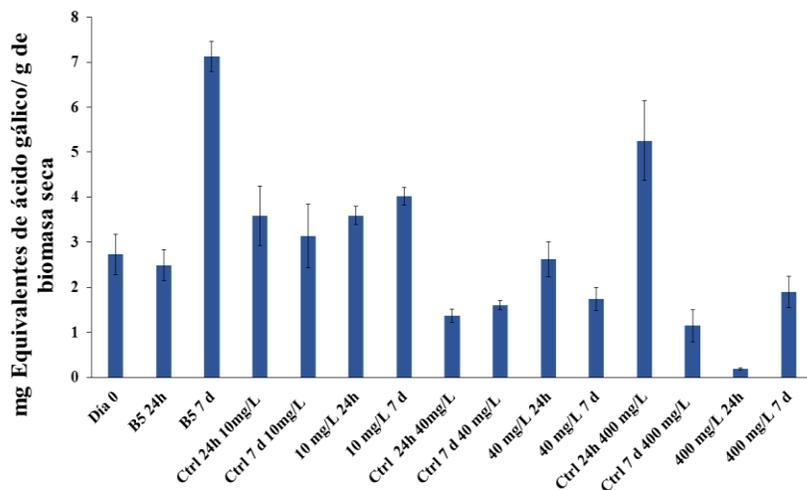
**Tabla 8. Cuantificación del feruloil glucósido en raíces transformada de *T. lophophoroides* sometidas a Quitosano.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Pico 1 (8.8 min apróx) mg FG/ g BS</b>
B5 día 0	2.7361
B5 24 h	1.5264
B5 7 día	0.6549
Control 400 mg/L(Solvente dilución) 24 h	0.2373
Control 400 mg/L(Solvente dilución) día 7	0.1598
Quitosano 400 mg/L 24 h	1.0847
Quitosano 400 mg/L día 7	0.2994

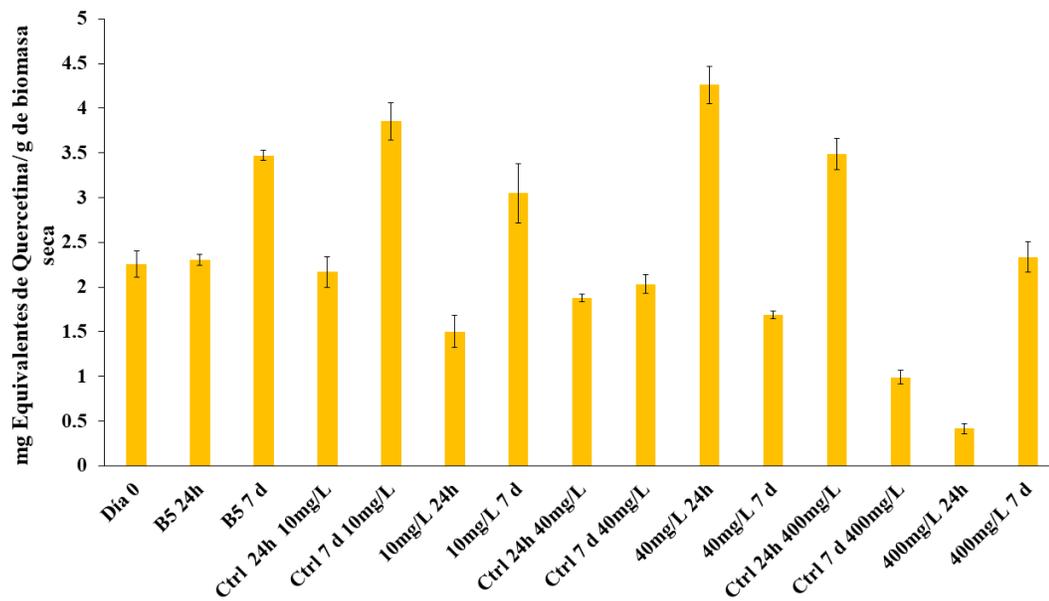
La inducción por quitosano en la producción de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante influye en el incremento de estos compuestos a las concentraciones 40 mgL<sup>-1</sup> a 24 h y 400 mgL<sup>-1</sup> a 7 días sobre todo para flavonoides, la concentración de 40 mgL<sup>-1</sup> a 24 h tanto para compuestos fenólicos como para flavonoides coincide en el incremento de los mismos con respecto a los controles, por lo que esta concentración parece influir en la producción de estos compuestos una vez transcurridas 24 h.

Analizando el conjunto de datos el tratamiento de 1.0 mM de ácido salicílico por 24 h y 40 mgL<sup>-1</sup> también por 24 h resultan ser de los mejores tratamientos en el incremento sobre todo de los flavonoides , sin embargo, también se precisa de estudios más finos para determinar verdaderamente el efecto de los inductores a las concentraciones adecuadas sobre las raíces transformadas de *T. lophophoroides* ya que su rendimiento de producción de biomasa seca a partir de biomasa seca se reduce a aproximadamente un 5%, por lo que puede pensarse en una inhibición de las rutas metabólicas por exceso de inductor de contacto en medio de cultivo. De igual manera deben analizarse si los solventes de dilución de los inductores se

pueden reducir a cantidades mínimas y que no tengan un efecto coadyuvante al que puedan tener los inductores sobre las rutas metabólicas de las raíces transformadas de esta especie



**Figura 46.** Determinación de compuestos fenólicos totales en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de Quitosano. “Día 0” denota el día de inoculación de los matraces para crecimiento de las raíces hasta la fase exponencial de crecimiento, “B5 24h” refiere las raíces colectadas durante la fase exponencial de crecimiento después de 24 h en contacto con medio B5, “B5 7 d” refiere las raíces colectadas después de 7 días en contacto con medio B5, “Ctrl 24 h 10 mg/L” y “Ctrl 7 d 10 mg/L” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “10 mg/L 24 h” y “10 mg/L 7 d” son raíces en contacto con la concentración 10 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días, “Ctrl 24 h 40 mg/L” y “Ctrl 7 d 40 mg/L” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “40 mg/L 24 h” y “40 mg/L 7 d” son raíces en contacto con la concentración 40 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días, “Ctrl 24 h 400 mg/L” y “Ctrl 7 d 400 mg/L” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “400 mg/L 24 h” y “400 mg/L 7 d” son raíces en contacto con la concentración 400 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días.



**Figura 47. Determinación de flavonoides en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de Quitosano. “Día 0” denota el día de inoculación de los matraces para crecimiento de las raíces hasta la fase exponencial de crecimiento, “B5 24h” raíces colectadas durante la fase exponencial de crecimiento después de 24 h en contacto con medio B5, “B5 7 d” raíces colectadas después de 7 días en contacto con medio B5, “Ctrl 24 h 10 mg/L” y “Ctrl 7 d 10 mg/L” raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “10 mg/L 24 h” y “10 mg/L 7 d” raíces en contacto con la concentración 10 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días, “Ctrl 24 h 40 mg/L” y “Ctrl 7 d 40 mg/L” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “40 mg/L 24 h” y “40 mg/L 7 d” raíces en contacto con la concentración 40 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días, “Ctrl 24 h 400 mg/L” y “Ctrl 7 d 400 mg/L” raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “400 mg/L 24 h” y “400 mg/L 7 d” raíces en contacto con la concentración 400 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días.**

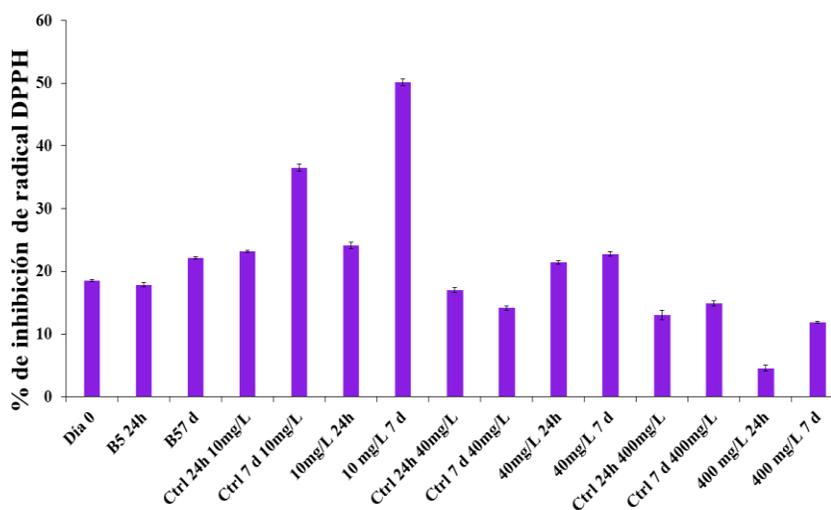


Figura 48. Determinación de actividad antioxidante en las muestras de raíces transformadas de *T. lophophoroides* inducidas bajo distintas concentraciones de Quitosano. “Día 0” denota el día de inoculación de los matraces para crecimiento de las raíces hasta la fase exponencial de crecimiento, “B5 24h” refiere las raíces colectadas durante la fase exponencial de crecimiento después de 24 h en contacto con medio B5, “B5 7 d” refiere las raíces colectadas después de 7 días en contacto con medio B5, “Ctrl 24 h 10 mg/L” y “Ctrl 7 d 10 mg/L” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “10 mg/L 24 h” y “10 mg/L 7 d” son raíces en contacto con la concentración 10 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días, “Ctrl 24 h 40 mg/L” y “Ctrl 7 d 40 mg/L” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “40 mg/L 24 h” y “40 mg/L 7 d” son raíces en contacto con la concentración 40 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días, “Ctrl 24 h 400 mg/L” y “Ctrl 7 d 400 mg/L” son las raíces expuestas al solvente de dilución del inductor después de 24 horas y 7 días respectivamente, “400 mg/L 24 h” y “400 mg/L 7 d” son raíces en contacto con la concentración 400 mg/L de quitosano después de 24 horas y 7 días.

### 6.5. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS MAYORITARIOS.

A través de las técnicas de cromatografía de columna abierta inicialmente se pretendía llevar a cabo el fraccionamiento de una cantidad suficiente de extracto de raíces transformadas tanto de *E. platyacanthus* como de *T. lophophoroides* crecidas a las mejores condiciones de crecimiento en biomasa (medio MS día 56 y medio B5 día 35, respectivamente); sin embargo, solo se logró obtener una cantidad suficientemente adecuada para el fraccionamiento de la especie *T. lophophoroides* (11.2 g de extracto). A partir del fraccionamiento polar y apolar de varias columnas de elución de fracciones mayoritarias del extracto, se analizaron por CLAR las fracciones mayoritarias rastreadas previamente por cromatografía en capa delgada. Los cromatogramas obtenidos de las eluciones fueron los siguientes:

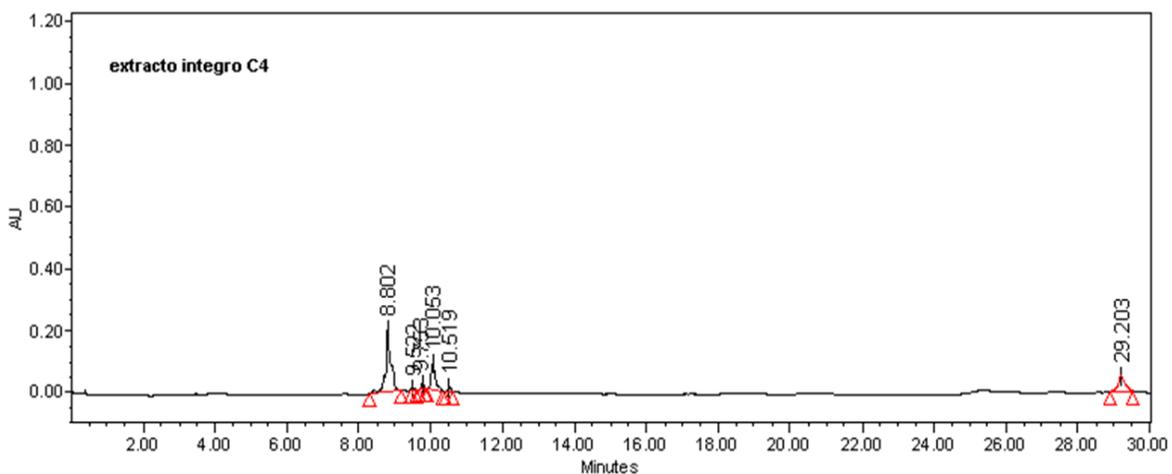


Figura 49. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides*

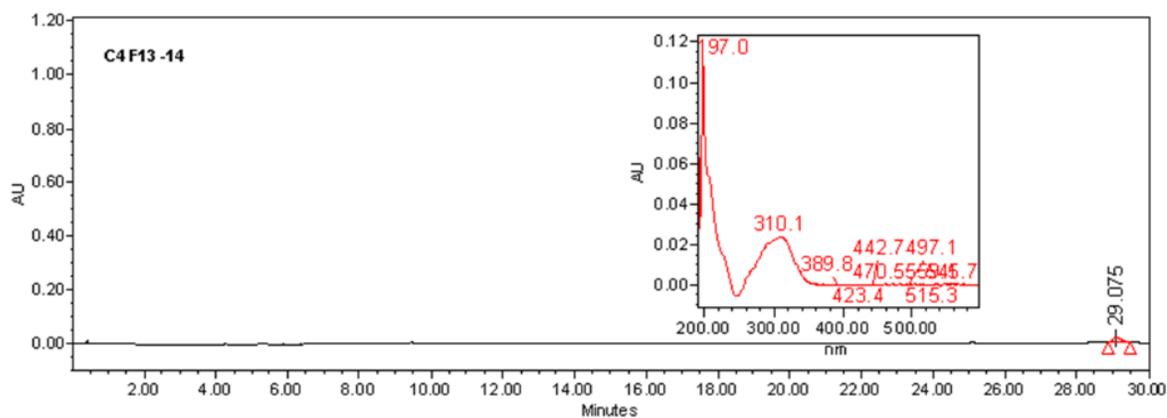


Figura 50. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C1F8 de extracto metanólico de *T. lophophoroides*. Pico mayoritario al  $R_t=29.99$  minutos.

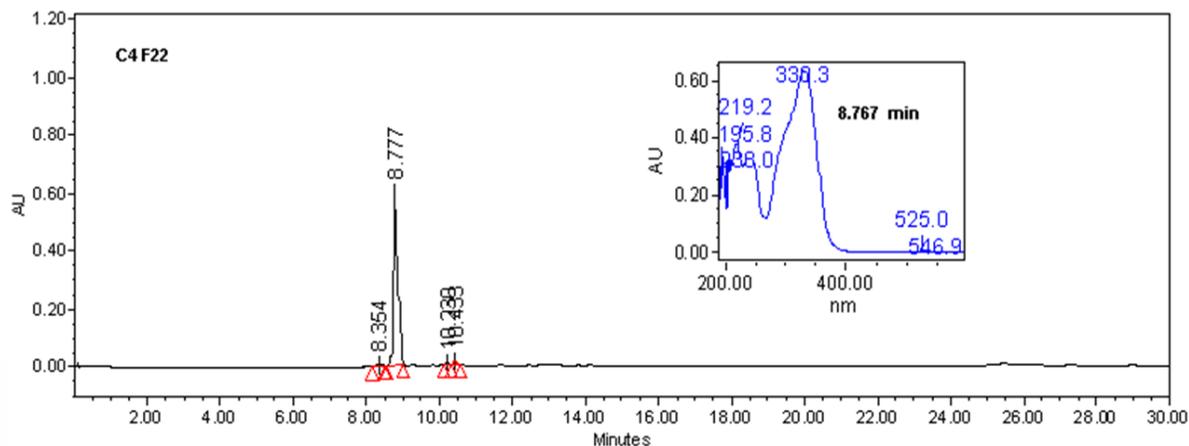


Figura 51. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C1F13 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.777 minutos.

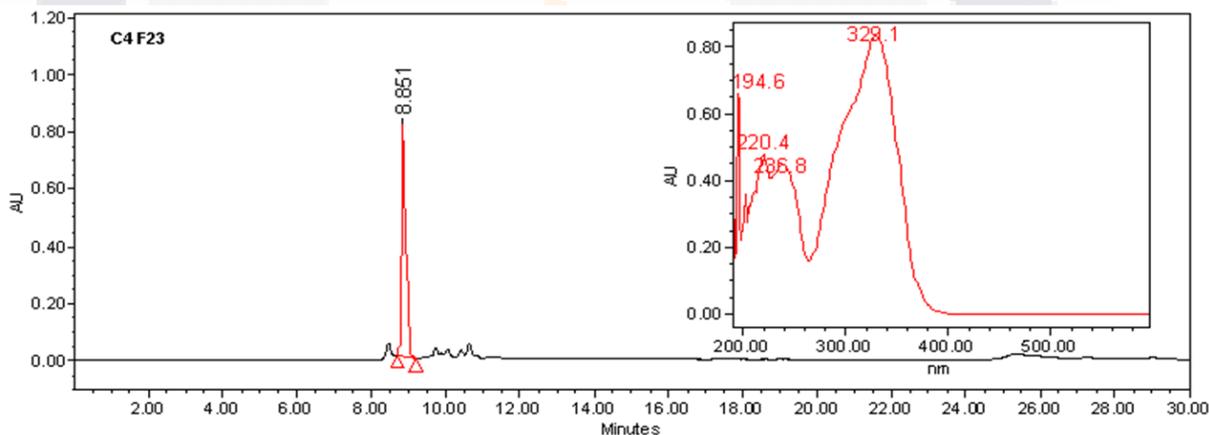


Figura 52. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C1F14 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.851 minutos.

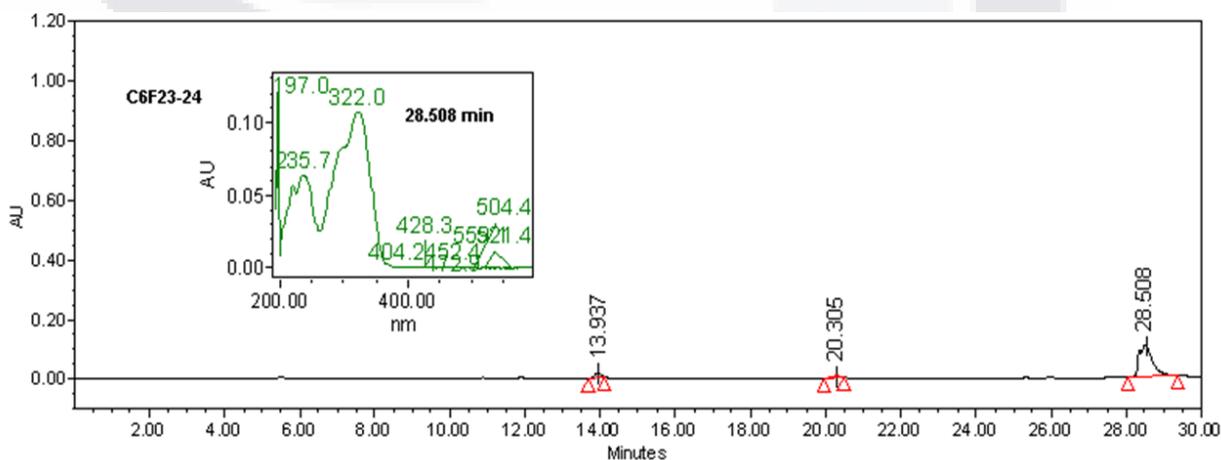


Figura 53. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C2F10 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=28.508 minutos.

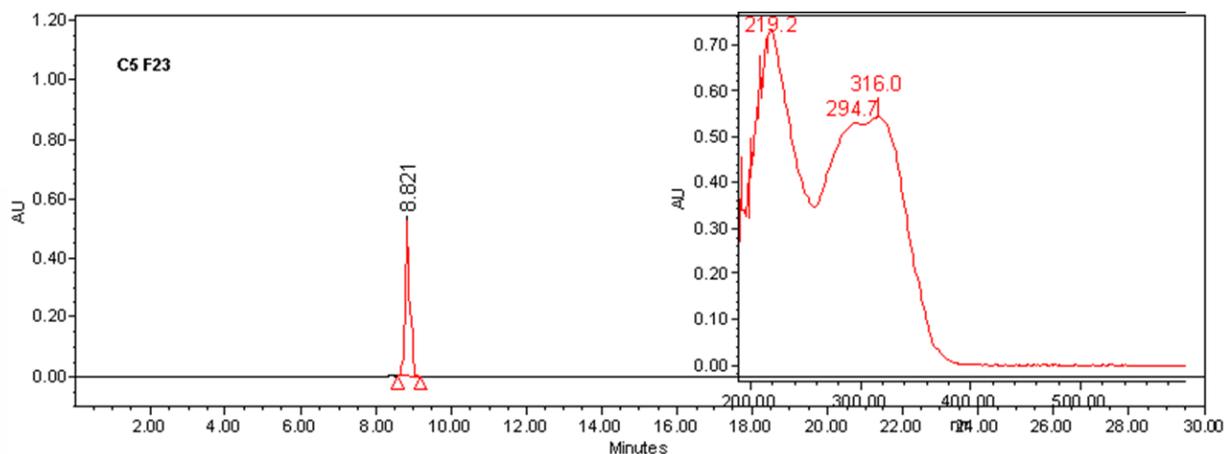


Figura 54. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C3F15 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.821 minutos.

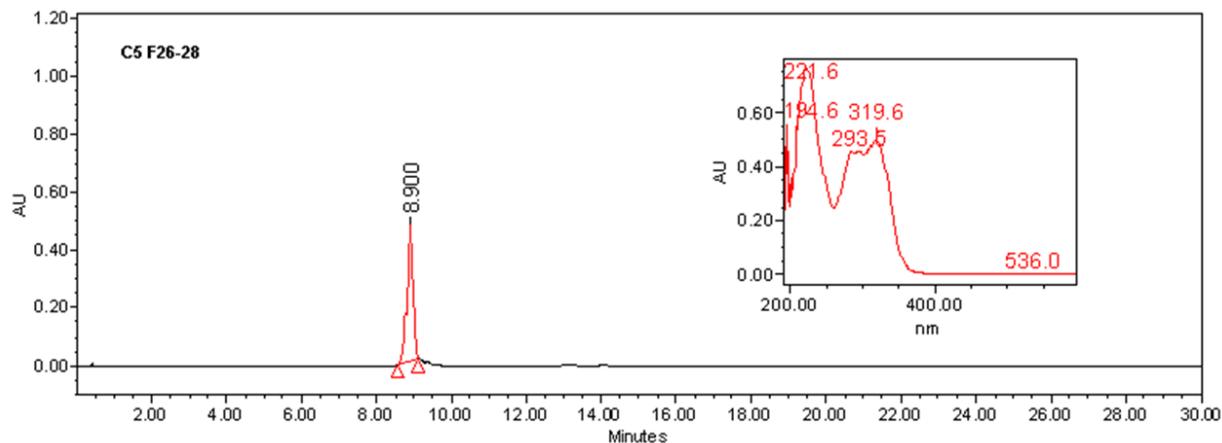


Figura 55. Cromatograma de CLAR (detección a los 325 nm) de la fracción C3F18 de extracto metanólico de *T. lophophoroides* . Pico mayoritario al Rt=8.900 minutos.

Algunas fracciones se analizaron en el equipo de UPLC- Masas Waters y estos fueron algunos de los espectros UV a 325 nm y de espectrometría de masas obtenidos respectivamente:

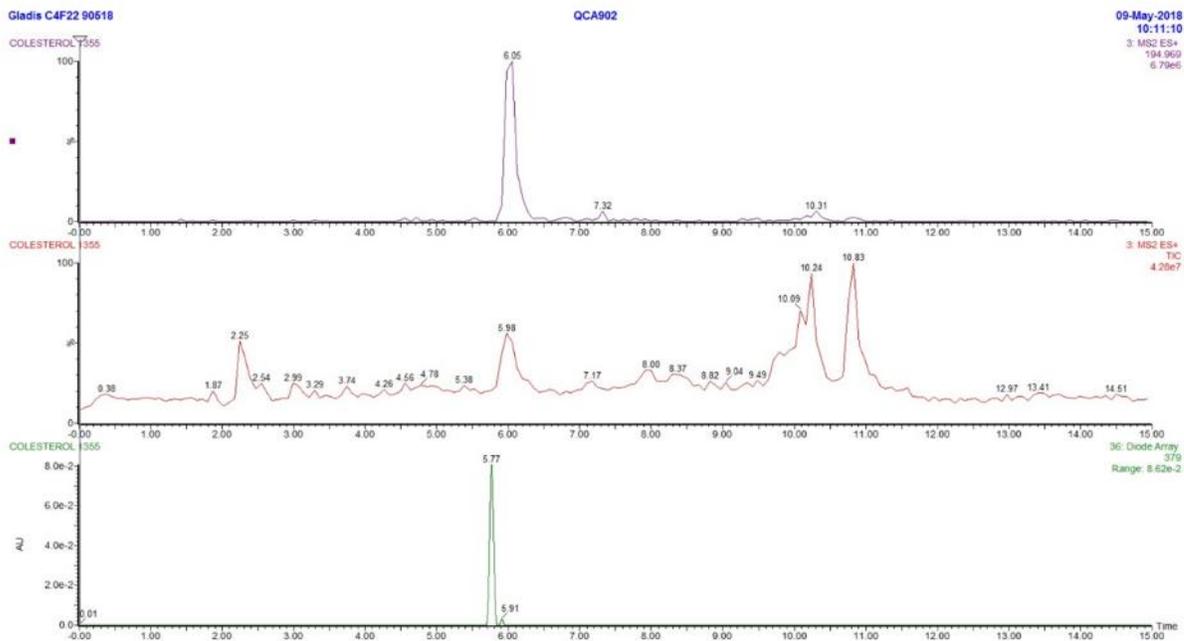


Figura 56. Cromatograma de UPLC de la fracción C1F13 de extracto metanólico de *T. lophophoroides*. Pico mayoritario al Rt=6.77 minutos.

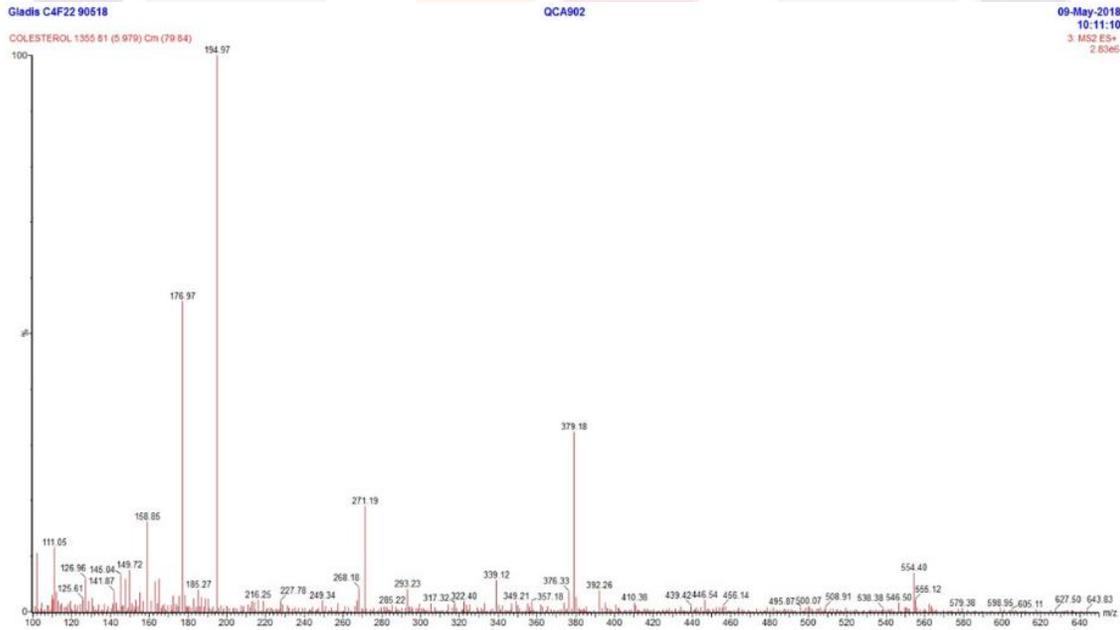


Figura 57. Espectro de masas de la fracción C1F13 de extracto metanólico de *T. lophophoroides*.

El ión pseudomolecular de la fracción 22 columna 4 ( $[M-H]^-$  con  $m/z$ : 355.1047) mostró fragmentos a  $m/z$ : 175, 193 and 295 sugiriendo la presencia de un derivado de feruloil glucósido como propone Chougui et al. (2015) para este compuesto.

Luego de seleccionar fracciones mayoritarias a partir de los análisis de HPLC y UPLC-masas, debido a su abundancia, se procedió al estudio de la fracción 22 de la columna 4 (35.6 mg) por resonancia magnética nuclear. Se encontró un compuesto mayoritario en esta fracción el cual fue caracterizado mediante los datos de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (HMBC).

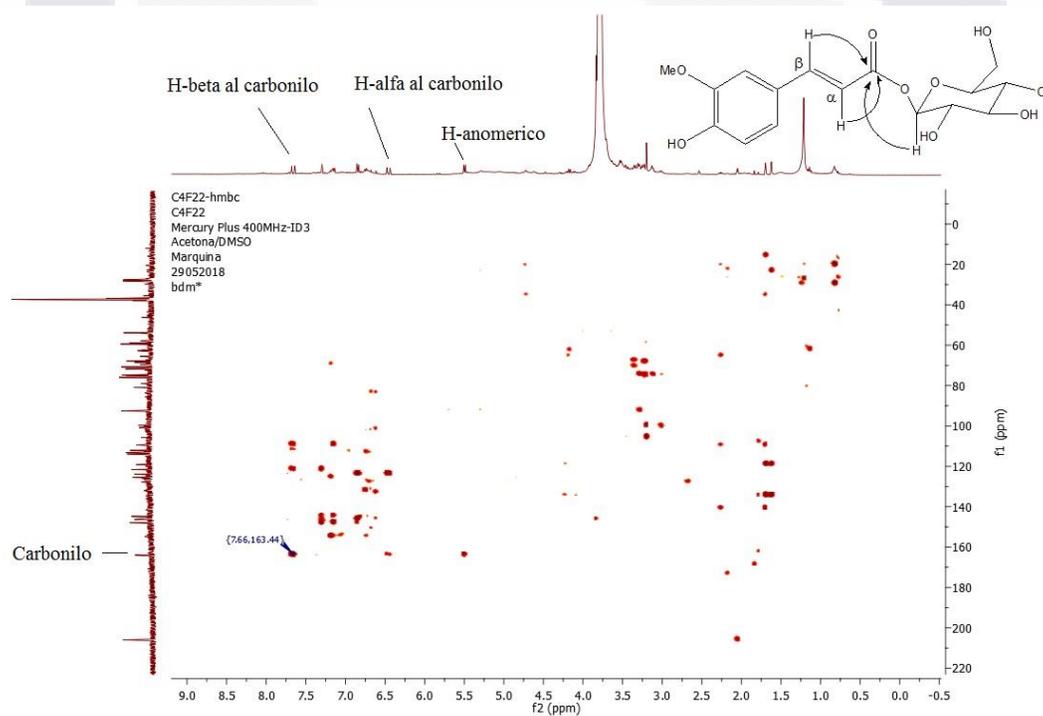


Figura 58. HMBC de correlaciones de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ .

De esta manera el compuesto mayoritario encontrado en los cultivos de raíces transformadas de *Turbinicarpus lophophosphoroides* en su fase exponencial de crecimiento en la fracción metanólica 22 de la columna 4 se identificó como feruloil glucósido.

Se encontró un compuesto mayoritario en esta fracción (fracción 22 columna 4) el cual fue caracterizado mediante la comparación de los datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con los reportados previamente para feruloil glucósido por Kim y colaboradores (2016).

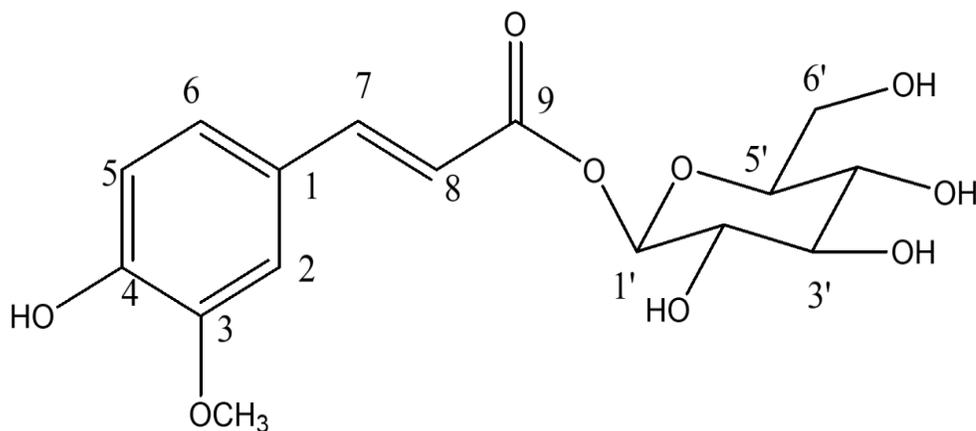


Figura 59. Feruloil glucósido.

Tabla 9 Comparación de los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos para feruloil glucósido con datos ya reportados. Los patrones de fragmentación y las constantes de acoplamiento (J, en Hz) aparecen en paréntesis.

Posición del Carbón	Feruloil glucósido		Feruloil glucósido (Kim, et al., 2016)	
	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$	$\delta\text{C}$
1	—	126.3	—	125.5
2	8.13 (1H, <i>d</i> , 1.6, H-2')	111.8	7.34 (1H, <i>d</i> , 1.6, H-2)	111.4
3		146.9	---	147.9
4		146.9	---	149.6
5	7.68 (1H, <i>d</i> , 8.0, H-5')	114.6	6.80 (1H, <i>d</i> , 8.2, H-5)	115.5
6	7.98 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.4 H-6')	123.8	7.15 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.5 H-6)	123.3
7	8.5 (1H, <i>d</i> , 15.6)	146.9	7.63 (1H, <i>d</i> , 15.9)	146.3
8	6.33 (1H, <i>d</i> , 15.6)	114.8	6.48 (1H, <i>d</i> , 16.0)	113.9
9		167.41	---	165.4

1'	6.33 (1H, d, 8.0, H-1')	95.06	5.46 (1H, d, 8.1, H-1')	94.2
2'	3.1 (1H, m, C-2')	74.2	3.20 (1H, m, C-2')	72.5
3'	3.37 (1H, m, C-3')	77.4	3.23 (1H, m, C-3')	76.5
4'	2.88 (1H, m, C-4')	70.4	3.07 (1H, m, C-4')	69.5
5'	3.37 (1H, m, C-5')	74.2	3.22 (1H, m, C-5')	77.8
6'	4.1 (1H, m, C-6'a)	61.6	3.66 (1H, m, C-6'a)	60.6
	3.9 (1H, m, C-6'b)		3.46 (1H, m, C-6'b)	
Me	4.03 (3H, s, O-CH <sub>3</sub> )	56.26	3.82 (3H, s, O-CH <sub>3</sub> )	55.7

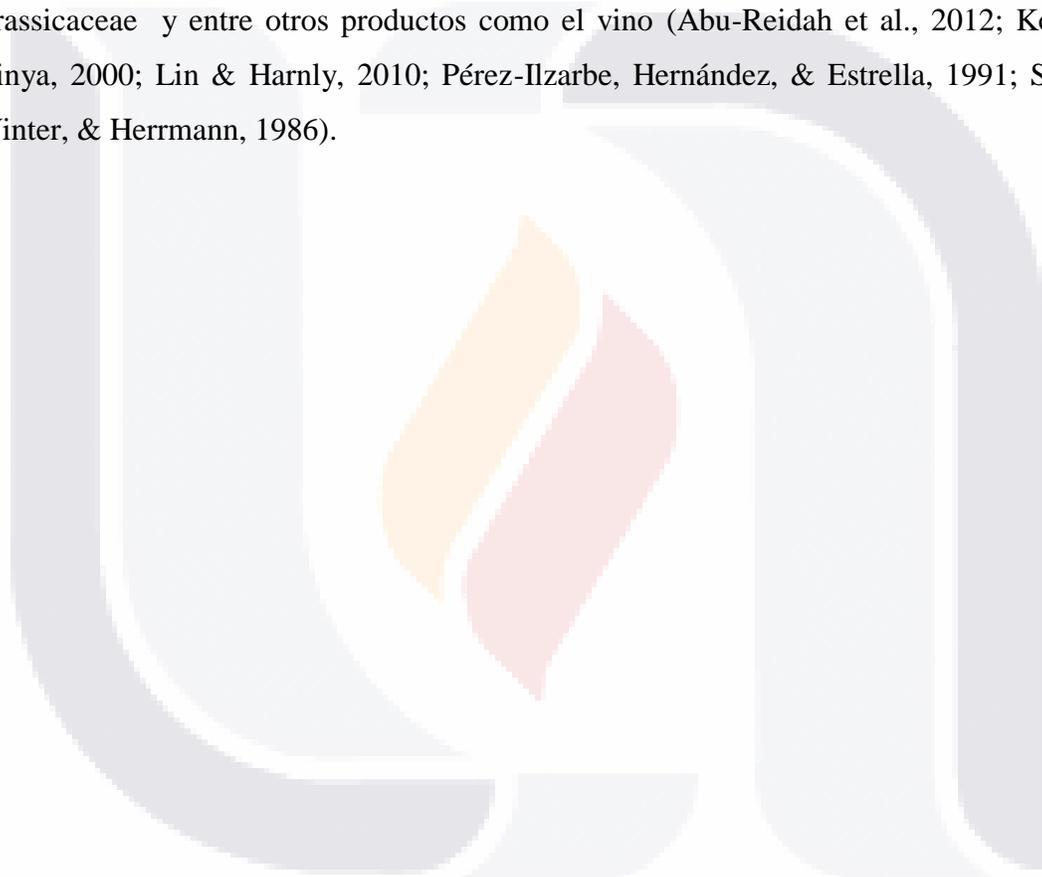
---

El feruoil glucósido ha sido localizado en frutas de *Opuntia ficus indica*, especie de la familia de las Cactaceae en un estudio realizado por Kim y colaboradores (2016). Como tal, este ácido hidroxicinámico glicosilado es encontrado en fuentes naturales con propiedades funcionales como agente aclarante en cosmética (Tanimoto, Tominaga, Okada, & Nomura, 2006), antioxidante (Bokern, Wray, & Strack, 1991), hipolipidémico y con propiedades antiinflamatorias (Tang, Olatunji, Zhou, & Hou, 2017). Los ésteres de ácidos hidroxicinámicos glicosilados biológicamente en las plantas derivan del metabolismo de los fenilpropanoides, a su vez de la ruta de Shikimato (Hoffmann et al., 2003; Boudet, 2007; Emiliani et al., 2009).

Los precursores de los ácidos hidroxicinámicos glicosilados provienen de la ruta del Shikimato en forma de ácido ferúlico, quínico o cumárico, que a su vez funcionan como precursores de bloques estructurales de la célula vegetal en forma de lignanos y derivados (Tuan et al., 2014). En cultivos de raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* no se ha encontrado información sobre este compuesto como uno de los mayoritarios, sin embargo, puede estar funcionando como agente antioxidante en dichos cultivos y a la vez como precursor de estos bloques de crecimiento celular del tipo ligninas

por el crecimiento acelerado que caracteriza a este modelo biotecnológico de raíces transformadas.

Existe poca información sobre el compuesto como tal y su función biológica y aislada como tal. Existen muchos reportes donde se cataloga junto con otros compuestos de la misma clase dentro de las principales sustancias a las que se les atribuyen actividad oxidante, principalmente en frutas como manzanas, berries; en vegetales como los de la familia Brassicaceae y entre otros productos como el vino (Abu-Reidah et al., 2012; Kovács & Dinya, 2000; Lin & Harnly, 2010; Pérez-Ilzarbe, Hernández, & Estrella, 1991; Schuster, Winter, & Herrmann, 1986).



## 7. CONCLUSIONES

Los análisis de CCF y CLAR permitieron determinar que la producción de metabolitos en raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* es similar a la que presenta el brote de ambas especies, cosa que no se observa en general en el extracto de la raíz sin transformar de un explante *in vitro*. Con ello, se muestra que las raíces transformadas con las que se está trabajando tienen la capacidad de síntesis de metabolitos secundarios. En los análisis por CLAR se separaron compuestos tipo ácido clorogénico para *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides*. Esto es, en *E. platyacanthus* creciendo en MS tanto semisólido como en agitación en todos los tratamientos se detectó la presencia de un compuesto (tipo ácido clorogénico); así mismo en el caso de *T. lophophoroides* se encontraron también este tipo de compuestos (2 picos).

Se aisló por la CCA e identificó por espectrometría de masas y RMN el feruloil glucósido en el extracto metanólico de raíces transformadas de *T. lophophoroides*.

La acumulación de feruloil glucósido está asociada al crecimiento. Se logró hacer la separación de compuestos tipo ácido clorogénico en una columna abierta al realizar TLC y análisis de algunas muestras por HPLC para muestras de ambas especies de raíces transformadas *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* creciendo bajo distintas condiciones de iluminación y en medio MS semisólido y MS y B5 en agitación.

Al evaluar el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y la capacidad antioxidante de los extractos de raíces transformadas tanto de *E. platyacanthus* como de *T. lophophoroides* creciendo bajo distintas condiciones de cultivo se observa una fuerte correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y el contenido de flavonoides, así como actividad antioxidante.

La inducción de las raíces transformadas de *E. platyacanthus* y *T. lophophoroides* con moléculas tales como ácido salicílico, metil jasmonato, ácido abscísico y quitosano (moléculas inductoras y/o de señalización de estrés) no alteró en gran medida el perfil

fitoquímico que se esperaba influir en las raíces transformadas tras la exposición de las mismas a distintas concentraciones de inductor a distintos periodos de tiempo. Son necesarios estudios más finos para determinar concentraciones adecuadas de inductor a las cuales exponer a los cultivos de raíces transformadas ya que se considera una saturación del inductor dada la biomasa fresca que en biomasa seca solo alcanza el 5% de rendimiento, es decir la biomasa de exposición al inductor es mínima considerando su gran composición de agua.

Los cultivos de raíces transformadas tanto de *E. platyacanthus* como *T. lophophoroides* son sistemas biotecnológicos de estudio de amplia riqueza por lo que es interesante explorar y las alternativas que ofrecen no solo de rápido crecimiento, sino de su estabilidad y posible estandarización de un cultivo de producción de compuestos de interés.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Reidah, I. M., Arráez-Román, D., Quirantes-Piné, R., Fernández-Arroyo, S., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2012). HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Res Int.*, *46*(1), 108-117. doi:10.1016/j.foodres.2011.11.026
- Alippi, A. M., López, A. C., & Balatti, P. A. (2011). Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Revista Argentina de Microbiología*, *43*, 278-286.
- Anderson, E. F. (2001). *The cactus family* Portland, Oregon, U.S.A.: Timber Press, Inc.
- Aragón-Gastélum, J. L., Flores, J., Yáñez-Espinosa, L., Reyes-Olivas, Á., Rodas-Ortiz, J. P., Robles-Díaz, E., & González, F. J. (2017). Advantages of vivipary in *Echinocactus platyacanthus*, an endemic and protected Mexican cactus species. *Journal of Arid Environments*, *141*, 56-59. doi:10.1016/j.jaridenv.2017.01.012
- Astello-García, M. G., Cervantes, I., Nair, V., Santos-Díaz, M. d. S., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., . . . Barba de la Rosa, A. P. (2015). Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *J Food Compos Anal*, *43*, 119-130. doi:10.1016/j.jfca.2015.04.016
- Batista, D. S., de Castro, K. M., da Silva, A. R., Teixeira, M. L., Sales, T. A., Soares, L. I., . . . Otoni, W. C. (2016). Light quality affects in vitro growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *52*(3), 276-282. doi:10.1007/s11627-016-9761-x
- Bokern, M., Wray, V., & Strack, D. (1991). Accumulation of phenolic acid conjugates and betacyanins, and changes in the activities of enzymes involved in feruloylglucose metabolism in cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Planta*, *184*(2), 261-270. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/BF01102427>. doi:10.1007/bf01102427
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>. doi:[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bravo-Hollis, H., & Sánchez-Mejorada, H. (1991). *Las Cactáceas de México. Tomo II.* . México: UNAM.
- Britton, N. L., & Rose, J. N. (1963). *The Cactaceae descriptions and illustrations of plants of the cactus family*. New York: Dover Publications Inc.
- Castañeda-Romero, M., Luna-Contreras, M., Vela-Godinez, D., Montoya-Santiago, G., González-Bermúdez, A., Martínez Peña, R., & Esperón-Rodríguez, M. (2016). Nota sobre la estructura poblacional de *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) en la Reserva de la Biósfera "Barranca de Metztitlán", Hidalgo, México. *Acta botánica mexicana*, 65-73. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-71512016000200065&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-71512016000200065&nrm=iso).

- Chougui, N., Djerroud, N., Naraoui, F., Hadjal, S., Aliane, K., Zeroual, B., & Larbat, R. (2015). Physicochemical properties and storage stability of margarine containing *Opuntia ficus-indica* peel extract as antioxidant. *Food Chem.*, *173*, 382-390. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466036>. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.025
- Dávila-Figueroa, C. A., Lourdes de la Rosa-Carrillo, M. d., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2005). In vitro propagation of eight species or subspecies of *Turbinicarpus* (Cactaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *41*(4), 540-545. doi:10.1079/ivp2005668
- Del Castillo, R., & Trujillo, S. (1991). Ethnobotany of *Ferocactus Histrix* and *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) in the semiarid central Mexico: past, present and future. *Economic Botany*, *45*(4), 495-502.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 3010-3014. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/jf0115589>. doi:10.1021/jf0115589
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.*, *28*(3), 350-356. doi:10.1021/ac60111a017
- Fu, X., Yin, Z. P., Chen, J. G., Shanguan, X. C., Wang, X., Zhang, Q. F., & Peng, D. Y. (2015). Production of chlorogenic acid and its derivatives in hairy root cultures of *Stevia rebaudiana*. *J Agric Food Chem*, *63*(1), 262-268. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548875>. doi:10.1021/jf504176r
- Gabr, A. M. M., Ghareeb, H., El Shabrawi, H. M., Smetanska, I., & Bekheet, S. A. (2016). Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of Milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures. *J Genet Eng Biotechnol*, *14*(2), 327-333. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30647631>. doi:10.1016/j.jgeb.2016.10.003
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, *50*, 151-158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5
- Georgiev, M. I., Agostini, E., Ludwig-Muller, J., & Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol*, *30*(10), 528-537. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906523>. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.001
- Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., & Bley, T. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *74*(6), 1175. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0856-5>. doi:10.1007/s00253-007-0856-5
- Gitelson, A. A., Peng, Y., Arkebauer, T. J., & Suyker, A. E. (2015). Productivity, absorbed photosynthetically active radiation, and light use efficiency in crops: Implications for remote sensing of crop primary production. *Journal of Plant Physiology*, *177*, 100-109. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161715000073>. doi:10.1016/j.jplph.2014.12.015

- González-Díaz, M. C., Pérez-Reyes, M. E., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2006). In vitro analysis of susceptibility to *Agrobacterium rhizogenes* in 65 species of Mexican cacti. *Biologia Plantarum*, 50(3), 331-337. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0077-2>. doi:10.1007/s10535-006-0077-2
- Gorelick, J., & Bernstein, N. (2014). Chapter Five - Elicitation: An Underutilized Tool in the Development of Medicinal Plants as a Source of Therapeutic Secondary Metabolites. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 124, pp. 201-230): Academic Press.
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., & Fruk, A. (2017). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(2), 239-265. doi:10.1007/s11240-017-1332-2
- Jiménez-Aspee, F., Quispe, C., Soriano, M. d. P. C., Fuentes Gonzalez, J., Hüneke, E., Theoduloz, C., & Schmeda-Hirschmann, G. (2014). Antioxidant activity and characterization of constituents in copao fruits (*Eulychnia acida* Phil., Cactaceae) by HPLC–DAD–MS/MSn. *Food Res Int*, 62, 286-298. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914001719>. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.013
- Jiménez-Sierra, C., Mandujano, M. C., & Eguiarte, L. E. (2007). Are populations of the candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus*) in the desert of Tehuacán, Mexico at risk? Population projection matrix and life table response analysis. *Biological Conservation*, 135(2), 278-292. doi:10.1016/j.biocon.2006.10.038
- Kim, J. W., Kim, T. B., Yang, H., & Sung, S. H. (2016). Phenolic compounds isolated from *Opuntia ficus-indica* fruits. *Nat Prod Sci*, 22(2), 117-121. doi:10.20307/nps.2016.22.2.117
- Klem, K., Ač, A., Holub, P., Kováč, D., Špunda, V., Robson, T. M., & Urban, O. (2012). Interactive effects of PAR and UV radiation on the physiology, morphology and leaf optical properties of two barley varieties. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 52-64. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847211001900>. doi:https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.008
- Kovács, Z., & Dinya, Z. (2000). Examination of non-volatile organic compounds in red wines made in eger. *Microchem J*, 67(1), 57-62. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X00000977>. doi:10.1016/S0026-265X(00)00097-7
- Lin, L. Z., & Harnly, J. M. (2010). Phenolic component profiles of mustard greens, yu choy, and 15 other *Brassica* vegetables. *J Agric Food Chem*, 58(11), 6850-6857. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/jf1004786>. doi:10.1021/jf1004786
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C., Lee, C. Y., Brown, J., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2926-2930. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/jf0111209>. doi:10.1021/jf0111209
- Lucini, L., Rocchetti, G., Kane, D., & Trevisan, M. (2017). Phenolic fingerprint allows discriminating processed tomato products and tracing different processing sites. *Food Control*, 73, 696-703. doi:10.1016/j.foodcont.2016.09.020

- Ludwig-Muller, J., Jahn, L., Lippert, A., Puschel, J., & Walter, A. (2014). Improvement of hairy root cultures and plants by changing biosynthetic pathways leading to pharmaceutical metabolites: strategies and applications. *Biotechnol Adv*, 32(6), 1168-1179. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699436>. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.03.007
- Madala, N. E., Steenkamp, P. A., Piater, L. A., & Dubery, I. A. (2014). Metabolomic insights into the bioconversion of isonitrosoacetophenone in *Arabidopsis thaliana* and its effects on defense-related pathways. *Plant Physiol Biochem*, 84, 87-95. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942814002708>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.023>
- Martínez-Ávalos, J. G., Martínez Gallegos, R., & Backer Kurt, B. (2011). Nota sobre la descripción taxonómica de *Turbincarpus nieblae* (Cactaceae) una especie endémica de Tamaulipas, México. *Cact. Suc. Mex.*, 57(1), 16-24.
- Matkowski, A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - a review. *Biotechnol Adv*, 26(6), 548-560. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682287>. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.07.001
- Mehrotra, S., Srivastava, V., Ur Rahman, L., & Kukreja, A. K. (2015). Hairy root biotechnology--indicative timeline to understand missing links and future outlook. *Protoplasma*, 252(5), 1189-1201. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626898>. doi:10.1007/s00709-015-0761-1
- Miguel-Talonia, C., Téllez-Valdés, O., & Murguía-Romero, M. (2014). Las cactáceas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México: estimación de la calidad del muestreo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(2), 436-444. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1870345314707717>. doi:<https://doi.org/10.7550/rmb.31390>
- Mosco, A. (2009). Micro-morphology and anatomy of *Turbincarpus* (Cactaceae) spines. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80(1), 119-128. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42511957014>.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nair, V. D., Panneerselvam, R., Gopi, R., & Hong-bo, S. (2013). Elicitation of pharmacologically active phenolic compounds from *Rauvolfia serpentina* Benth. Ex. Kurtz. *Industrial Crops and Products*, 45, 406-415. doi:10.1016/j.indcrop.2013.01.008
- Naleway, J. J. (1992). Histochemical, Spectrophotometric, and Fluorometric GUS Substrates. In S. R. Gallagher (Ed.), *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression* (pp. 61-76). San Diego: Academic Press.
- Ono, N. N., & Tian, L. (2011). The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant Sci*, 180(3), 439-446. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421390>. doi:10.1016/j.plantsci.2010.11.012
- Palomeque-Carlin, A. (2015). *Desarrollo in vitro y capacidad biosintética de raíces de Cactáceas transformadas con los genes silvestres de A. rhizogenes*. (Doctorado

- Investigación), Universidad Autónoma de Aguascalientes Aguascalientes, Ags. México.
- Palomeque-Carlín, A., Tafoya, F., Alpuche Solís, A. G., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2015). Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, 51(3), 332-339. doi:10.1007/s11627-015-9681-1
- Palomeque-Carlin, A., Tafoya, F., Alpuche-Solís, A. G., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2015). Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 51(3), 332-339. doi:10.1007/s11627-015-9681-1
- Pérez-Ilzarbe, J., Hernández, T., & Estrella, I. (1991). Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Z Lebensm Unters Forsch*, 192, 551-554. doi:10.1007/BF01202512
- Pérez-Molphe-Balch, E., Santos-Díaz, M. d. S., Ramírez-Malagón, R., & Ochoa-Alejo, N. (2015). Tissue culture of ornamental cacti. *Sci. Agric.*, 72(6), 540-561. doi:10.1590/0103-9016-2015-0012
- Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., & Giuliatti, A. M. (2000). The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2), 252-258. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022999001374>. doi:https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00137-4
- Prasch, C. M., & Sonnewald, U. (2015). Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 4-14. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.06.020
- Russowski, D., Maurmann, N., Rech, S. B., & Fett-Neto, A. G. (2006). Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 86(2), 211-218. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9109-z>. doi:10.1007/s11240-006-9109-z
- Salas de León, S. N., García Mendoza, A., Reyes Agüero, J. A., & Villar Morales, C. (1999). Distribución geográfica y ecológica de la flora amenazada de extinción en la zona árida del estado de San Luis Potosí, México. *Polibotánica*(10), 0. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62101001>.
- Santos-Díaz, M. S., Pérez-Molphe, E., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Mexican Threatened Cacti: Current Status and Strategies for their Conservation. In G. H. Tepper (Ed.), *Species Diversity and Extinction* (pp. 1-60). United States: Nova Science Publishers, Inc.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., . . . Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*, 403(1-2), 136-138. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933071>. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.09.035
- Schuster, B., Winter, M., & Herrmann, K. (1986). 4-O-β-D-Glucosides of Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acids — Their Synthesis and Determination in Berry Fruit and Vegetable. *Z Naturforsch*, 41(5-6), 511. Retrieved from

- <https://www.degruyter.com/view/j/znc.1986.41.issue-5-6/znc-1986-5-603/znc-1986-5-603.xml>. doi:10.1515/znc-1986-5-603
- Semarnat. (2010a). *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010*. Diario Oficial de la Federación (DOF)
- Semarnat. (2010b). *Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. NOM-059-SEMARNAT-2010*. México: Diario oficial de la federación
- Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>.
- Sevón, N., & Oksman-Caldentey, K. M. (2002). Agrobacterium rhizogenes-Mediated Transformation: Root Cultures as a Source of Alkaloids. *Planta Med*, 68(10), 859-868. doi:10.1055/s-2002-34924
- Shanks, J. V., & Morgan, J. (1999). Plant 'hairy root' culture. *Curr Opin Biotechnol*, 10(2), 151-155. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166999800263>. doi:10.1016/S0958-1669(99)80026-3
- Shetty, A. A., Rana, M. K., & Preetham, S. P. (2012). Cactus: a medicinal food. *J Food Sci Technol*, 49(5), 530-536. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24082263>. doi:10.1007/s13197-011-0462-5
- Shin, H. S., Satsu, H., Bae, M.-J., Zhao, Z., Ogiwara, H., Totsuka, M., & Shimizu, M. (2015). Anti-inflammatory effect of chlorogenic acid on the IL-8 production in Caco-2 cells and the dextran sulphate sodium-induced colitis symptoms in C57BL/6 mice. *Food Chemistry*, 168, 167-175. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614009984>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.100>
- Smith, M., Fitz Maurice, W. A., Fitz Muarice, B., & Sotomayor, M. (2017). *Turbinicarpus lophophoroides*, Biznaguita. *The IUCN red list of threatned species*. doi:10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T40981A2949100.en
- Štarha, R., Chybidziurová, A., & Lacný, Z. (1999). Alkaloids of the genus *Turbinicarpus* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(8), 839-841. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197899000198>. doi:10.1016/S0305-1978(99)00019-8
- Stomp, A. M. (1992). Histochemical localization of  $\beta$ -glucuronidase. In S. A. Gallagher (Ed.), *GUS protocols: using the GUS gene as a reporter of gene expression* (pp. 103–113). San Diego: Academic.
- Tang, X., Olatunji, O. J., Zhou, Y., & Hou, X. (2017). *Allium tuberosum*: Antidiabetic and hepatoprotective activities. *Food Res Int*, 102, 681-689. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29196001>. doi:10.1016/j.foodres.2017.08.034
- Tanimoto, S., Tominaga, H., Okada, Y., & Nomura, K. (2006). Synthesis and cosmetic whitening effect of glycosides derived from several phenylpropanoids. *Yakugaku Zasshi*, 126(3), 173-177. doi:10.1248/yakushi.126.173

- Trejo-Moreno, C., Méndez-Martínez, M., Zamilpa, A., Jimenez-Ferrer, E., Perez-Garcia, M. D., Medina-Campos, O. N., . . . Rosas-Salgado, G. (2018). *Cucumis sativus* aqueous fraction inhibits angiotensin II-induced inflammation and oxidative stress *in vitro*. *Nutrients*, *10*(276), 1-14. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29495578>. doi:10.3390/nu10030276
- Tuan, P. A., Kwon, D. Y., Lee, S., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Park, N. I., & Park, S. U. (2014). Enhancement of chlorogenic acid production in hairy roots of *Platycodon grandiflorum* by over-expression of an *Arabidopsis thaliana* transcription factor AtPAP1. *Int J Mol Sci*, *15*(8), 14743-14752. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25153629>. doi:10.3390/ijms150814743
- Varela, S. A. (2010). Aspectos básicos de la fisiología en respuesta a estrés y el clima como condicionante del mismo en las plantas. In *Comunicaciones técnicas*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Villaseñor, J. L. (2016a). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *87*(3), 559-902. doi:10.1016/j.rmb.2016.06.017
- Villaseñor, J. L. (2016b). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Rev Mex Biodivers*, *87*(3), 559-902. doi:10.1016/j.rmb.2016.06.017
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas*. Germany: Springer.
- Wu, C.-H., Dewir, Y. H., Hahn, E.-J., & Paek, K. Y. (2006). Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology*, *49*(3), 193-199. doi:10.1007/BF03030532
- Yoon, J. Y., Chung, I. M., & Thiruvengadam, M. (2015). Evaluation of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities from transgenic hairy root cultures of gherkin (*Cucumis anguria* L.). *South African Journal of Botany*, *100*, 80-86. doi:10.1016/j.sajb.2015.05.008

9. ANEXO A. Curvas de calibración

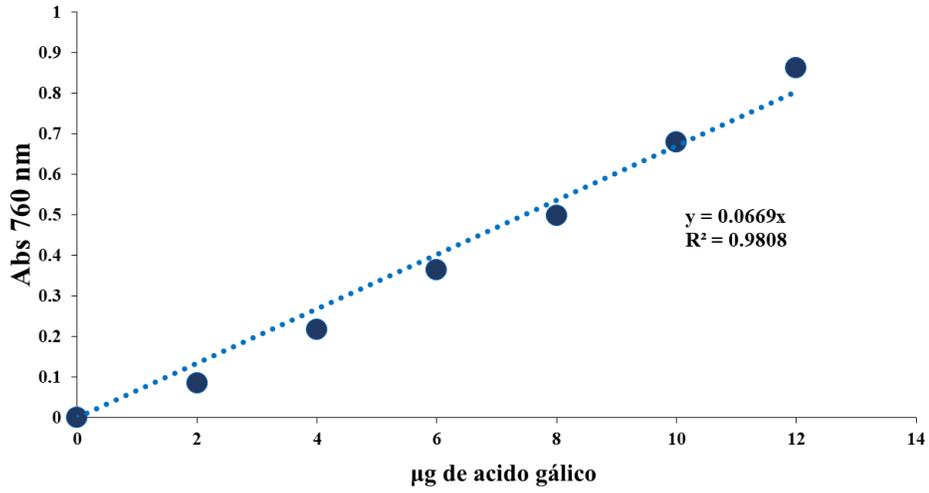


Figura 60. Curva patrón de ácido gálico para las determinaciones de compuestos fenólicos en raíces de *E. platyacanthus* expuestas a inductores.

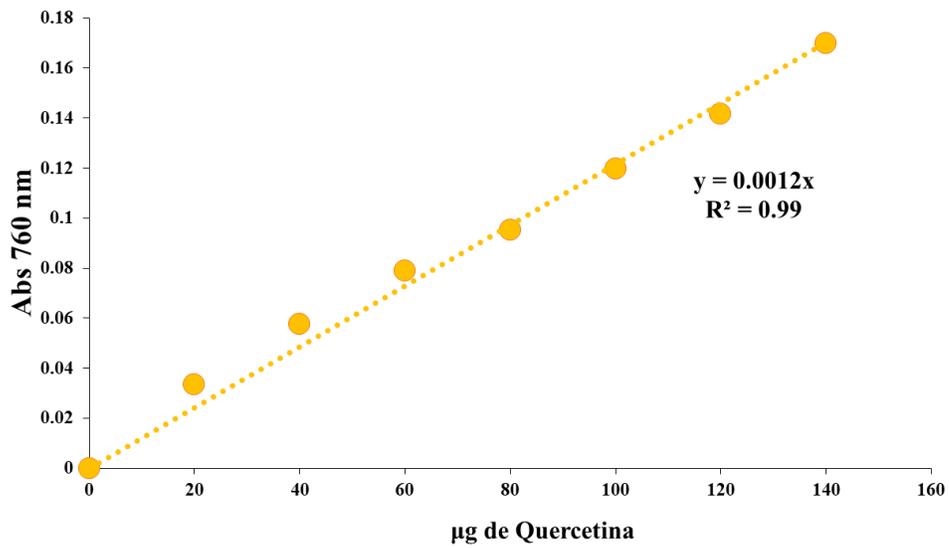


Figura 61. Curva patrón de Quercetina para las determinaciones de flavonoides en raíces de *E. platyacanthus* expuestas a inductores

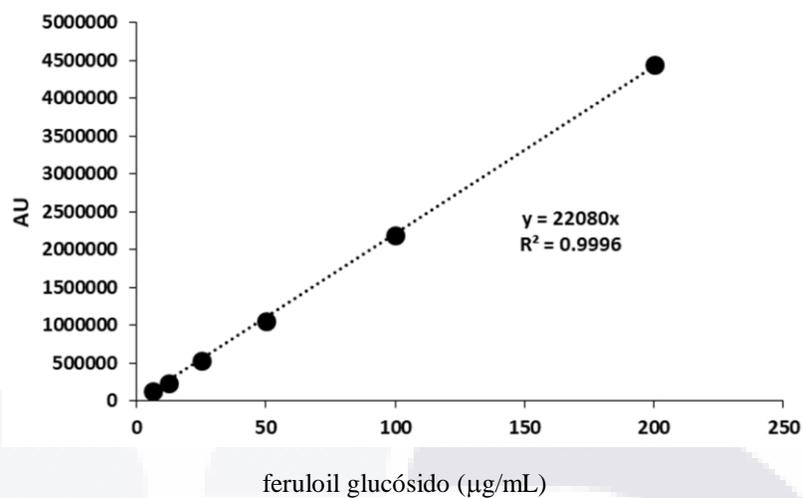


Figura 62 Curva patrón de feruloil glucósido para cuantificación en inducción por ácido salicílico, metil jasmonato, ácido abscísico y quitosano.

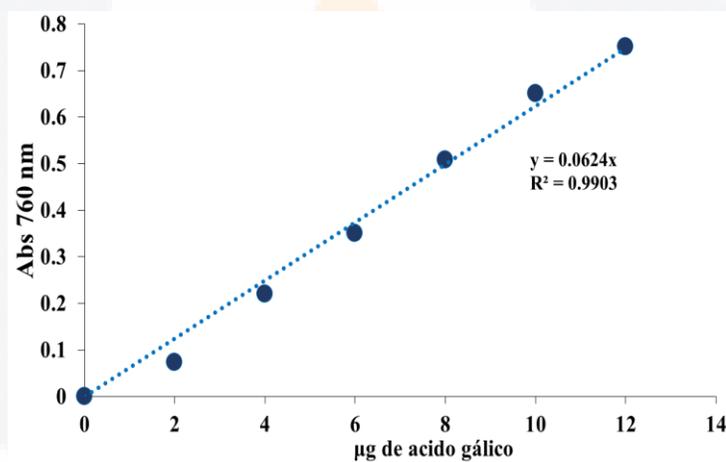


Figura 63. Curva patrón de ácido gálico para las determinaciones de compuestos fenólicos en raíces de *Turbinicarpus lophophoroides* expuestas a inductores.

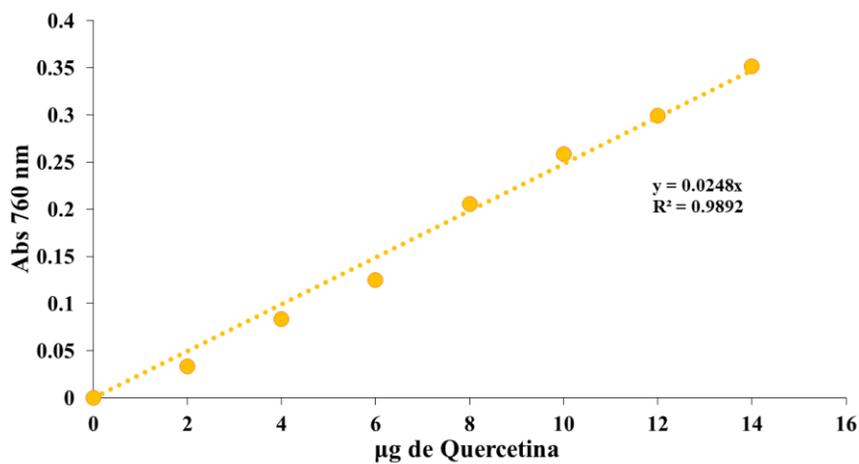


Figura 64. Curva patrón de Quercetina para las determinaciones de flavonoides en raíces de *T. lophophoroides* expuestas a inductores.

**9.1. ANEXO B. Manuscrito**



1 Submitted to: In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant

2

3 **Identification and quantitative determination of feruloyl-glucoside from hairy root**  
4 **cultures of *Turbincarpus lophophoroides* (Cactaceae)**

5

6 Gladis Judith Solis-Castañeda<sup>a</sup>, Alejandro Zamilpa<sup>b</sup>, Emmanuel Cabañas<sup>a</sup>, Silvia Marquina  
7 Bahena<sup>c</sup>, Eugenio Pérez-Molphe-Balch<sup>a</sup>, Yenny Adriana Gómez-Aguirre<sup>ad</sup>

8

9 <sup>a</sup> Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de  
10 Aguascalientes, Av. Universidad 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes  
11 20131, México.

12 Phone: +52 449 9107400 Ext. 365

13 E-mail address: gladis.solis@hotmail.com (G. Solis)

14 E-mail address: eperezmb@correo.uaa.mx (E. Pérez-Molphe-Balch)

15

16 <sup>b</sup>Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina  
17 1, Col. Centro, Xochitepec, Morelos 62730. México.

18 Phone: +52 777 3612155 / 777 3612124

19 E-mail address: azamilpa\_2000@yahoo.com.mx (A. Zamilpa)

20

21 <sup>c</sup>Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,  
22 Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209 Cuernavaca, México

23 Phone: +52 777 329 79 97 Ext.6010

24 E-mail address: smarquina@uaem.mx (S. Marquina)

25

26 <sup>d</sup>CONACyT Research Fellow-Universidad Autónoma de Aguascalientes - Av. Universidad  
27 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Aguascalientes 20131. México.

28

29 \*Corresponding author: CONACyT Research Fellow-Universidad Autónoma de  
30 Aguascalientes - Avenida Universidad 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes,  
31 Aguascalientes 20131. México. E-mail addresses: yagomez@correo.uaa.mx;  
32 gomezye@yahoo.com (Y.A. Gómez-Aguirre)



33 **Abstract**

34 Transformed hairy root cultures have become an alternative for the biosynthesis of plant  
35 secondary metabolites with biological activities. In this work, the effect of liquid Murashige  
36 and Skoog (MS) and Gamborg B5 (B5) medium on kinetic behavior, biomass and phenolic  
37 metabolites production were analyzed in *Turbinicarpus lophophoroides* hairy root cultures.  
38 MS liquid medium showed the highest biomass production (13.67 g L<sup>-1</sup> dry weight) after 77  
39 days of culture and for B5 medium it was achieved at day 56 (8.10 g L<sup>-1</sup> dry weight). Isolation  
40 and structural elucidation of the major compound present in *T. lophophoroides* hairy roots  
41 was determined by nuclear magnetic resonance and mass spectral analysis. As result, ferulic  
42 acid derivative (feruloyl-glucoside) was isolated from *T. lophophoroides* hairy roots and  
43 reported for the first time. Quantitative analysis indicated that feruloyl-glucoside was the  
44 major phenolic metabolite at 56 days of growth in MS medium (2.7267 ± 0.041 mg g<sup>-1</sup> dry  
45 weight L<sup>-1</sup>) and at 7 and 35 days in B5 medium (2.6328 ± 0.108 and 2.4372 ± 0.026 mg g<sup>-1</sup>  
46 dry weight L<sup>-1</sup>, respectively). The feruloyl-glucoside was not detected in untransformed roots  
47 (control). Our results suggest the potential of *T. lophophoroides* hairy roots culture for the  
48 production of this phenolic glycoside.

49

50 **Keywords**

51 Phenolic glycosides

52 NMR

53 Phytochemical analysis

54 Secondary metabolites

55 UPLC-ESI-MS

56

57 **1. Introduction**

58 Plant secondary metabolites play an important role in plant defense mechanisms  
59 (Madala, Steenkamp, Piater, & Dubery, 2014) and represent a source of bioactive molecules  
60 (Ludwig-Muller, Jahn, Lippert, Puschel, & Walter, 2014). Phenolic glycosides, such as  
61 feruloyl-glucoside or its derivatives, are constituents of vegetables (Lucini, Rocchetti, Kane, &  
62 Trevisan, 2017) and their occurrence has been reported in different sources such as apple  
63 (Pérez-Illarbe et al., 1991), Cucumber (*Cucumis sativus* L.) (Abu-Reidah et al., 2012),  
64 *Opuntia ficus-indica* fruits (Kim, Kim, Yang, & Sung, 2016), *Brassica* species (Lin &  
65 Harnly, 2010) and wines (Kovács & Dinya, 2000), and its functional properties such as  
66 antidiabetic, hepatoprotective (Tang et al., 2017) and whitening agents in cosmetics  
67 (Tanimoto et al., 2006) has been proposed.

68 Different cacti species has proven to be a source of plant secondary metabolites (Astello-  
69 García et al., 2015). *Turbinicarpus lophophoroides* Werderm, Buxb. & Backeb is a globular  
70 and small cactus endemic to Mexico, which contains alkaloids (Štarha et al., 1999) and has  
71 been overexploited mainly due to ornamental purposes (Smith et al., 2017; Villaseñor,  
72 2016b). *T. lophophoroides* is a slow growing plant in its natural habitat and it is subjected to  
73 special protection by the Mexican normativity (NOM-059-SEMARNAT-2010) (Semarnat,  
74 2010b). Thus, the development of *in vitro* cultures by asexual propagation of *T.*  
75 *lophophoroides* has enormous potential since the yield of biomass production of cacti species  
76 may be enhanced in shorter periods of time and minimal space requirements (Pérez-Molphe-  
77 Balch et al., 2015). It has been shown that *in vitro* culture is a suitable alternative for biomass  
78 production and for the improvement of plant secondary metabolites production through

79 biotechnological approaches, such as the generation of transformed hairy root, which have  
80 advantages such as: a) hormone-free medium for root formation since hairy roots synthesize  
81 their own growth factors; b) faster growth rate compared with that of plants growing *in situ*,  
82 c) biochemical and genetic stability, d) elemental research like hairy root-mediated secondary  
83 metabolite production coupled with productivity enhancement strategies and, e) transformed  
84 hairy roots-based functional research (Georgiev et al., 2012; Georgiev et al., 2007; Mehrotra  
85 et al., 2015).

86 As a part of our efforts towards the conservation and preservation of cactus genetic resources  
87 and sustainable management, we have focused on several aspects of *T. lophophoroides*  
88 biotechnology, including *in vitro* conservation of germplasm, induction of transformed hairy  
89 roots (Palomeque-Carlín, Tafoya, Alpuche Solís, & Pérez-Molphe-Balch, 2015; Pérez-  
90 Molphe-Balch et al., 2015) and its phytochemical characterization. The research presented  
91 here reports the identification and quantitative determination of the main compound present  
92 in hairy root cultures and non-transformed roots derived from *in vitro* plants of *Turbinicarpus*  
93 *lophophoroides* and investigates changes in biomass accumulation and feruloyl-glucoside  
94 levels during the growth cycle and the effect of media composition in order to increase and  
95 deepen in the knowledge of transformed hairy roots of cacti species and its potential  
96 applications.

97

## 98 **2. Materials and methods**

99

### 100 **2.1. Plant material**

101 Transformed hairy roots of *T. lophophoroides* were previously established by Palomeque-  
 102 Carlín et al. (2015). The root tip segments (1cm in length) were cultured on Murashige and  
 103 Skoog (MS) basal medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 30 gL<sup>-1</sup> sucrose  
 104 and 10 gL<sup>-1</sup> agar. The hairy roots cultures were grown under fluorescent light (40 μmol/m<sup>2</sup>/s)  
 105 at a photoperiod of 16/8h light/dark and temperature 25±2 °C. Non-transformed roots  
 106 obtained from *in vitro* plants were grown under the same conditions and used as control.

107

108 **2.2. Biomass and phenolic compound accumulation in different culture medium**

109 For transformed hairy root culture optimization experiments, 0.05 or 0.30 g of root tip  
 110 segments were transferred into 200 mL Erlenmeyer flasks containing 70 mL liquid MS or  
 111 Gamborg B5 (B5) basal medium (Gamborg, Miller, & Ojima, 1968; Murashige & Skoog,  
 112 1962), supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> or 20 g L<sup>-1</sup> sucrose, respectively. Each flask was  
 113 maintained on a rotary shaker (80 rpm) at 25±2 °C in dark conditions for 13 weeks. For kinetic  
 114 evaluation, random samples were collected (n=3) each week to measure biomass fresh weight  
 115 (FW) and dry weight (DW). Collected biomass was freeze-dried and stored at -20 °C for  
 116 further analysis.

117

118 **2.2.1. Nutrient uptake evaluation**

119 Nutrient consumption in the medium was evaluated by means of total sucrose concentration  
 120 by the phenol-sulphuric spectrophotometric method proposed by Dubois et al. (1956). A  
 121 standard curve was prepared with sucrose (0 to 70 μg mL<sup>-1</sup>). Aliquots were taken and then  
 122 0.5 mL of 5% phenol solution (Sigma-Aldrich) and 2.5 mL of concentrated sulfuric acid (J.  
 123 T Baker) were added. After 30 min of reaction, the absorbance of each sample (n=3) was

124 monitored at 490 nm (Jenway, Genova). The electric conductivity and pH of the medium  
125 were additionally measured.

126

### 127 **2.2.2. Determination of kinetic parameters of *T. lophophoroides* hairy root cultures and** 128 **phenolic compounds accumulation pattern**

129 The growth curve of *T. lophophoroides* hairy root cultures was established according to the  
130 change in FW and DW each week during the growth cycle (13 weeks) as proposed (see  
131 section 2.2). Kinetic parameters such growth index (GI), duplication time (DT) and growth  
132 rate ( $\mu$ ) were calculated as proposed by (Wu, Dewir, Hahn, & Paek, 2006). For phenolic  
133 compounds accumulation analysis, intermediate points of each growth phase were selected.  
134 Methanolic extracts were prepared with samples collected at 21, 56 and 91 d for liquid MS  
135 medium and at 7, 35 and 84 d for liquid B5 medium and then the total content of the major  
136 phenolic metabolite was analyzed using chromatographic and spectroscopic approaches, as  
137 shown in quantitative HPLC analysis (see section 2.4).

138

### 139 **2.3. Sample preparation, isolation and identification of feruloyl-glucoside**

140 For phytochemical analysis, *T. lophophoroides* hairy roots growing in MS medium were  
141 propagated for 56 days, when exponential growth phase was achieved (45.25 g DW).  
142 Otherwise, non transformed roots and shoots growing for 273 days were harvested (70 mg  
143 DW and 186 mg DW, respectively). All these samples were freeze-dried, and then extracted  
144 thrice with methanol at 60°C for 10 minutes (Wagner & Bladt, 1996). The resultant extract  
145 was concentrated by rotary evaporation (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG.,  
146 Schwabach, Germany) under reduced pressure at 45°C (Trejo-Moreno et al., 2018) and then

147 the obtained methanolic crude extract (11.2 g DW) was fractionated by preparative column  
148 chromatography (Silica Gel 60 Kieselgel 0.063-0.200 mm 70-230 mesh ASTM Merck) using  
149 a gradient elution system composed of dichloromethane: methanol (100:00→00:100).  
150 Collected fractions were analyzed by thin-layer chromatography (TLC). Aliquots of each  
151 fraction were spotted onto silica gel 60 F<sub>254</sub> and silica gel 60 RP18 F<sub>254</sub>S aluminum plates  
152 (Merck) and eluted with dichlorometane:methanol (9:1) and water:acetonitrile (7:3),  
153 respectively. Plates were examined by UV fluorescence (365 nm) and then sprayed with ceric  
154 sulfate and heated at 105 °C for 1–2 min (Wagner & Bladt, 1996). The main collected fraction  
155 (fraction 22; 35.6 mg DW) was further analyzed using nuclear magnetic resonance (NMR)  
156 and mass spectrometry for qualitative analysis of the main chemical entity.

157

### 158 **2.3.1. Qualitative analysis of feruloyl-glucoside**

159 The main fraction (fraction 22) obtained after preparative chromatography was identified by  
160 means of mass spectrometry and NMR analyses. Mass spectroscopic analysis was carried out  
161 using an ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass  
162 spectrometry (UPLC-ESI-MS) system (UPLC ACQUITY-Z-spray ESI-APCI-ESCi; Waters,  
163 Milford, MA, USA) equipped with an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm × 50 mm  
164 i.d., 1.7-µm particle size; Waters, USA) and MassLynx software. The mobile phase consisted  
165 of 0.05 % trifluoroacetic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The  
166 gradient system was as follows: 0-4 min, 0% B; 4-5 min, 30% B; 5-6 min, 50% B; 6-8 min,  
167 100% B. The flow rate was maintained at 0.3 mL/min and the injection volume was 5 µL.  
168 UPLC-ESI-MS analysis was performed in negative ion mode. Finally, the major compound  
169 was identified by NMR analysis.

170 The conformational structure of the main detected metabolite was further elucidated by <sup>1</sup>H  
171 NMR (400 MHz), <sup>13</sup>C NMR (100 MHz) and two-dimensional experiment HMBC (400 MHz)  
172 using a Varian Mercury Plus 400 MHz -ID3 spectrometer and acetone d<sub>6</sub>: dimethyl sulfoxide-  
173 d<sub>6</sub> (95:05) as solvent. Chemical shifts are described in parts per million (ppm) relative to  
174 tetramethylsilane (TMS) as internal standard. The resulting spectra was compared with  
175 reported data (Kim et al., 2016).

176

177 **2.4. Quantitative HPLC analysis of feruloyl-glucoside at different growth phases of *T.***  
178 ***lophophoroides* hairy roots**

179 For quantitative analysis of feruloyl-glucoside at intermediate points of each growth phase of  
180 *T. lophophoroides* hairy roots cultures and *in vitro* non transformed tissues (shoot and root),  
181 we developed a high performance liquid chromatography (HPLC) method using a Waters  
182 2695 separation module equipped with a Waters 996 photodiode array detector and Empower  
183 Pro software (Waters Corporation, USA). A Supelcosil LC-F column (4.6 mm × 250 mm i.d.,  
184 5-μm particle size) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA) was used and the mobile phase  
185 consisted of 0.5 % trifluoroacetic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile (solvent  
186 B). The gradient system was as follows: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B, 4-20 min, 30% B;  
187 21-23 min, 50% B; 24-25min, 80% B; 26-27 100% B; 28-30min, 0% B. The flow rate was  
188 maintained at 0.9 mL/min and the injection volume was 10 μL. The absorbance was measured  
189 at 330 nm. The retention time for the most abundant peak (peak 1) was 8.968 min ( $\lambda = 242$ ,  
190 and 323 nm) and the concentration of this polyphenolic compound was estimated by  
191 interpolation of the peak areas and comparison with a calibration curve prepared with  
192 feruloyl-glucoside. The calibration curve was linear in the range of 31.25 to 250 μg feruloyl-

193 glucoside /mL in methanol ( $y = 35944x - 278037$ ;  $R^2=0.9971$ ). Feruloyl-glucoside was  
194 identified by comparison of the retention times and UV spectra in each sample. All analyses  
195 were performed by triplicate and the data were expressed as mean values in milligram per  
196 gram of DW of sample.

197

## 198 **2.5. Statistical analyses**

199 Data were analyzed by one-way ANOVA and Brown-Forsythe tests were used for multiple  
200 comparisons among means. The significance level for all statistical tests was 5%. Statistical  
201 analyses were performed with Prism 7 for Mac OS X (GraphPad Software Inc.).

202

## 203 **3. Results**

204

### 205 **3.1. Growth kinetics of *T. lophophoroides* hairy roots**

206 The kinetic behavior of *T. lophophoroides* hairy root cultures growing in MS and B5 medium  
207 is shown in Figures 1 and 2, respectively. For MS medium, the lag, exponential and stationary  
208 growth phases (0-35, 36-77 and 78-91days, respectively) were observed (Fig. 1a) and kinetic  
209 parameters were calculated. The specific growth rate corresponded to  $0.06 \text{ d}^{-1}$ ; the growth  
210 index was 307.78 and duplication time was 12.14 d. Changes in total sucrose concentration,  
211 pH and electrical conductivity in the medium were analyzed as a function of culture time and  
212 biomass growth in MS medium (Fig. 1a-b). The increase in biomass accumulation and the  
213 decrease of electrical conductivity in MS medium was in agreement with the consumption of  
214 the carbon source. The pH of the medium was constant along growth kinetics (Fig. 1b).

215 On the other hand, the hairy roots of *T. lophophoroides* growing in B5 medium showed  
216 shorter growth phases but lower biomass yield when compared with that for MS medium: lag  
217 phase (0-14 days), exponential phase (15-49 days), stationary phase (50-55 days) and death  
218 phase (day 56-91). Kinetic parameters as growth index, duplication time and growth rate  
219 (33.00, 15.00 d and 0.05 d<sup>-1</sup>, respectively) were calculated. The total sugar concentration was  
220 measured to assess the agreement between biomass production and the decrease of the carbon  
221 source concentration in B5 liquid medium (Fig. 2a). Conductivity and pH showed the similar  
222 behavior as in MS culture (Fig 2b).

223 The morphological characteristics of *T. lophophoroides* hairy roots growing in MS and B5  
224 liquid medium are summarized in Figure 3. In B5 medium, the hairy roots proliferated mainly  
225 by elongation and the biomass turned brown at 84 days, while for MS medium, lateral roots  
226 were developed.

227

## 228 **3.2. Chemical identification of the major compounds**

### 229 **3.2.1. Identification of feruloyl glucoside**

230 After HPLC analysis, two peaks were detected (Peak 1 at Rt 8.979 min and Peak 2 at Rt  
231 10.225 min) at the exponential growth phase of *T. lophophoroides* hairy roots. The main peak  
232 (peak 1) was isolated and tentatively identified by means of mass spectrometry and then the  
233 conformational structure was elucidated by NMR analysis. Pseudomolecular ion of peak 1  
234 ([M-H]<sup>-</sup> at *m/z*: 355.1047; Fig. 6, supplementary) yielded fragments at *m/z*:175, 193 and 295,  
235 suggesting the presence of a feruloyl-glucoside derivative as proposed (Chougui et al., 2015).  
236 The mass accuracy between theoretical and measured mass was 3 ppm. This structure was  
237 corroborated by NMR analysis. Table 1 shows the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts and the

238 coupling constants of this compound which displayed very similar data to those previously  
239 described for feruloyl-glucoside (Kim et al., 2016). The  $^3J$  correlation between the anomeric  
240 proton of glucose ( $\delta$  6.33 d,  $J= 8.0$ ) and the acetate carbonyl group at 167. 41 in the HMBC  
241 spectrum indicated the position of the sugar in the ferulic acid skeleton. This is the first report  
242 of the presence of feruloyl-glucoside in *T. lophophoroides* hairy roots.

243

### 244 **3.3. HPLC quantitative analysis**

245 The accumulation pattern of feruloyl glycoside in *T. lophophoroides* hairy roots cultures was  
246 determined using HPLC analysis. Our results suggest that the induction of *T. lophophoroides*  
247 hairy roots enhances the accumulation of feruloyl-glucoside (peak 1, Rt 8.979 min,  $\lambda = 242,$   
248 and 323 nm) at different growth stages in both MS and B5 culture medium. The detected  
249 signals for non transformed roots and shoots harvested after 273 days were low for  
250 quantification (Fig. 4, Table 2).

251 The highest accumulation of feruloyl-glycoside in *T. lophophoroides* hairy roots growing in  
252 MS medium was achieved at the exponential growth phase ( $2.7267 \pm 0.041 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW L}^{-1}$ )  
253 followed by the stationary ( $2.0498 \pm 0.010 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW L}^{-1}$ ) and the lag phase ( $1.2900 \pm 0.054$   
254  $\text{mg g}^{-1} \text{ DW L}^{-1}$ ). For B5 medium, the content of feruloyl-glycoside was slightly higher at the  
255 lag phase ( $2.6328 \pm 0.108 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW L}^{-1}$ ) followed by the exponential phase ( $2.4372 \pm 0.026$   
256  $\text{mg g}^{-1} \text{ DW L}^{-1}$ ); stationary growth phase showed the lowest values ( $0.3498 \pm 0.0004 \text{ mg g}^{-1}$   
257  $\text{DW L}^{-1}$ ).

258

## 259 **4. Discussion**

260 In recent years, the production of bioactive molecules in biotechnological systems has gained  
261 attention due to the capacity for enhanced biomass and metabolite production (Matkowski,  
262 2008). Transformed hairy roots provides a biotechnological approach for the biosynthesis  
263 and production of bioactive molecules (Ludwig-Muller et al., 2014) such as phenolics.  
264 Different cacti species have been recognized as sources of bioactive metabolites (Jiménez-  
265 Aspee et al., 2014; Kim et al., 2016); nevertheless, reports dealing with the organ culture of  
266 cacti species are scarce (Pérez-Molphe-Balch et al., 2015). In our research, we identified and  
267 quantified for the first time the main compound present in transformed hairy root cultures  
268 and non transformed roots derived from *in vitro* plants of *Turbinicarpus lophophoroides*, and  
269 investigated the effect of MS and B5 culture medium on biomass accumulation and feruloyl-  
270 glucoside levels during the growth cycle.  
271 The biomass production in *T. lophophoroides* hairy roots was influenced by the use of  
272 different culture medium. The maximum biomass production was achieved at 77 d (13.7 g L<sup>-1</sup>)  
273 using MS liquid medium and at 56 d (8.1 g L<sup>-1</sup>) for liquid B5 medium. For other plant  
274 systems, it has been proposed that biomass growth can be influenced by different factors such  
275 as inoculum size, carbon source availability, ammonium/nitrate ratio, pH, and others (Wu et  
276 al., 2006). According to the kinetic parameters calculated for *T. lophophoroides* hairy roots  
277 growing in MS or B5 medium, we found that MS medium (DT=12.14 and  $\mu=0.06\text{ d}^{-1}$ )  
278 generated a 307.78-fold increase in 77 days compared with inoculum. On the other hand,  
279 inoculum of hairy roots growing in B5 medium (DT=15.00 and  $\mu=0.05\text{ d}^{-1}$ ) yielded a 33.00-  
280 fold increase in 56 days, thus MS medium is proposed as the best basal salt mixture for *T.*  
281 *lophophoroides* hairy roots biomass production.

282 After the isolation of the major metabolite of *T. lophophoroides* hairy roots cultures, the  
283 identification was carried out. Mass spectral (see electronic supplementary material Figure  
284 1) and NMR analyses indicated the presence of feruloyl glycoside (Table 1). Feruloyl-  
285 glycoside is a glycosylated hydroxycinnamic acid found in natural sources and its functional  
286 properties such as whitening agent (Tanimoto et al., 2006), antioxidant, hypolipidemic and  
287 anti-inflammatory activities (Tang et al., 2017) has been proposed. Quantitative analysis  
288 indicated that B5 medium yielded the highest accumulation of feruloyl-glycoside after 7 days  
289 of culture ( $2.6328 \pm 0.108 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW L}^{-1}$ ) when compared with that of MS medium  
290 ( $2.7267 \pm 0.041 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW L}^{-1}$ ) after 56 days of culture; thus, we propose B5 medium for the  
291 production of this phenolic glycoside in the lag phase of the culture (day 7). These differences  
292 in biomass and metabolite accumulation may be attributed to the B5 and MS composition,  
293 since it has been proposed that ammonia/nitrate ratio in the culture medium affects phenolics  
294 and biomass production (Russowski, Maurmann, Rech, & Fett-Neto, 2006; Wu et al., 2006)  
295 as we found in our research for MS and B5 medium (see table 2). Our results suggests that  
296 the accumulation pattern of feruloyl glycoside in MS and B5 medium was independent of  
297 biomass accumulation (see Figure 4 and Table 2), similar to that found for rosmarinic acid  
298 production in *Dracocephalum moldavica* hairy roots (Weremczuk-Jeżyna et al., 2013).  
299 Information regarding to the accumulation pattern of feruloyl glycoside in biotechnological  
300 systems is scarce and limited to cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* (Bokern et  
301 al., 1991), nevertheless information related to its concentration is not given; thus, our research  
302 finds the potential applications of *T. lophophoroides* hairy roots for the production of biomass  
303 and for the biosynthesis and study of this phenolic glycoside or related compounds after 7  
304 days of culture in B5 medium.

305

306 **5. Conclusions**

307

308 The present study demonstrates the capacity of *T. lophophoroides* hairy roots for the  
309 biosynthesis of feruloyl-glucoside, a ferulic acid derivative with functional properties.

310 Among evaluated conditions, B5 medium proved to be suitable for feruloyl glycoside  
311 biosynthesis after 7 days of culture under the given conditions, meanwhile MS medium is  
312 better for biomass production. Our results contribute to the knowledge of cacti species and  
313 the identified metabolite is reported for the first time in *T. lophophoroides*.

314

315 **Acknowledgements**

316

317 This work was supported by the Departamento de Apoyo a la Investigación de la Universidad  
318 Autónoma de Aguascalientes (UAA) (Grants PIBT16-16). G.J. Solis-Castañeda is indebted  
319 to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-México) for the doctoral  
320 fellowship awarded. Y.A. Gómez-Aguirre is grateful to Cátedras-CONACyT.

321

322 **Conflict of Interest**

323

324 All authors contributed to and have approved the final manuscript. The authors declare no  
325 conflict of interest.

326

## 10. References

11. Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Quirantes-Piné R, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2012) HPLC–ESI-Q-TOF-MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Res Int* 46:108-117
12. Astello-García MG, Cervantes I, Nair V, Santos-Díaz MdS, Reyes-Agüero A, Guéraud F, Negre-Salvayre A, Rossignol M, Cisneros-Zevallos L, Barba de la Rosa AP (2015) Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *J Food Compos Anal* 43:119-130
13. Bokern M, Wray V, Strack D (1991) Accumulation of phenolic acid conjugates and betacyanins, and changes in the activities of enzymes involved in feruloylglucose metabolism in cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Planta* 184:261-270
14. Chougui N, Djerroud N, Naraoui F, Hadjal S, Aliane K, Zeroual B, Larbat R (2015) Physicochemical properties and storage stability of margarine containing *Opuntia ficus-indica* peel extract as antioxidant. *Food Chem* 173:382-390
15. Dubois M, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
16. Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158
17. Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T (2007) Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1175
18. Georgiev MI, Agostini E, Ludwig-Muller J, Xu J (2012) Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol* 30:528-537
19. Jiménez-Aspee F, Quispe C, Soriano MdPC, Fuentes Gonzalez J, Hüneke E, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G (2014) Antioxidant activity and characterization of constituents in copao fruits (*Eulychnia acida* Phil., Cactaceae) by HPLC–DAD–MS/MSn. *Food Res Int* 62:286-298

20. Kim JW, Kim TB, Yang H, Sung SH (2016) Phenolic compounds isolated from *Opuntia ficus-indica* fruits. *Nat Prod Sci* 22:117-121
21. Kovács Z, Dinya Z (2000) Examination of non-volatile organic compounds in red wines made in eger. *Microchem J* 67:57-62
22. Lin LZ, Harnly JM (2010) Phenolic component profiles of mustard greens, yu choy, and 15 other *Brassica* vegetables. *J Agric Food Chem* 58:6850-6857
23. Lucini L, Rocchetti G, Kane D, Trevisan M (2017) Phenolic fingerprint allows discriminating processed tomato products and tracing different processing sites. *Food Control* 73:696-703
24. Ludwig-Muller J, Jahn L, Lippert A, Puschel J, Walter A (2014) Improvement of hairy root cultures and plants by changing biosynthetic pathways leading to pharmaceutical metabolites: strategies and applications. *Biotechnol Adv* 32:1168-1179
25. Madala NE, Steenkamp PA, Piater LA, Dubery IA (2014) Metabolomic insights into the bioconversion of isonitrosoacetophenone in *Arabidopsis thaliana* and its effects on defense-related pathways. *Plant Physiol Biochem* 84:87-95
26. Matkowski A (2008) Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - a review. *Biotechnol Adv* 26:548-560
27. Mehrotra S, Srivastava V, Ur Rahman L, Kukreja AK (2015) Hairy root biotechnology-indicative timeline to understand missing links and future outlook. *Protoplasma* 252:1189-1201
28. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
29. Palomeque-Carlín A, Tafoya F, Alpuche Solís AG, Pérez-Molphe-Balch E (2015) Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 51:332-339
30. Pérez-Illzarbe J, Hernández T, Estrella I (1991) Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Z Lebensm Unters Forsch* 192:551-554

31. Pérez-Molphe-Balch E, Santos-Díaz MdS, Ramírez-Malagón R, Ochoa-Alejo N (2015) Tissue culture of ornamental cacti. *Sci Agric* 72:540-561
32. Russowski D, Maurmann N, Rech SB, Fett-Neto AG (2006) Role of light and medium composition on growth and valepotriate contents in *Valeriana glechomifolia* whole plant liquid cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86:211-218
33. Semarnat (2010) Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario oficial de la federación, México, pp. 1-78
34. Smith M, Fitz Maurice WA, Fitz Muarice B, Sotomayor M (2013) *Turbinicarpus lophophoroides*, Biznaguita. The IUCN red list of threatned species, 10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T40981A2949100.en
35. Štarha R, Chybidziurová A, Lacný Z (1999) Alkaloids of the genus *Turbinicarpus* (Cactaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 27:839-841
36. Tang X, Olatunji OJ, Zhou Y, Hou X (2017) *Allium tuberosum*: Antidiabetic and hepatoprotective activities. *Food Res Int* 102:681-689
37. Tanimoto S, Tominaga H, Okada Y, Nomura K (2006) Synthesis and cosmetic whitening effect of glycosides derived from several phenylpropanoids. *Yakugaku Zasshi* 126:173-177
38. Trejo-Moreno C, Méndez-Martínez M, Zamilpa A, Jimenez-Ferrer E, Perez-Garcia MD, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J, Santana MA, Esquivel-Guadarrama FR, Castillo A, Cervantes-Torres J, Fragoso G, Rosas-Salgado G (2018) *Cucumis sativus* aqueous fraction inhibits angiotensin II-induced inflammation and oxidative stress *in vitro*. *Nutrients* 10:1-14
39. Villaseñor JL (2016) Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Rev Mex Biodivers* 87:559-902
40. Wagner H, Blatt S (1996) Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. Springer; Germany

41. Wu C-H, Dewir YH, Hahn E-J, Paek KY (2006) Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. Journal of Plant Biology 49:193-199

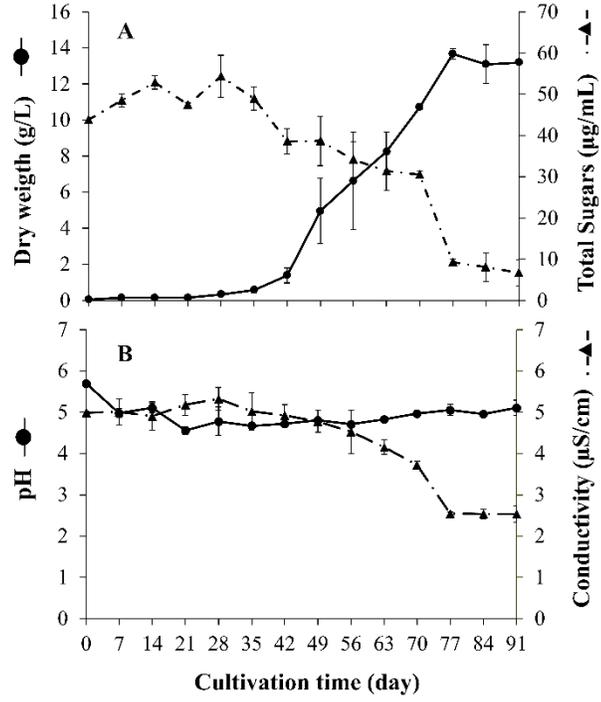


Figure 1.

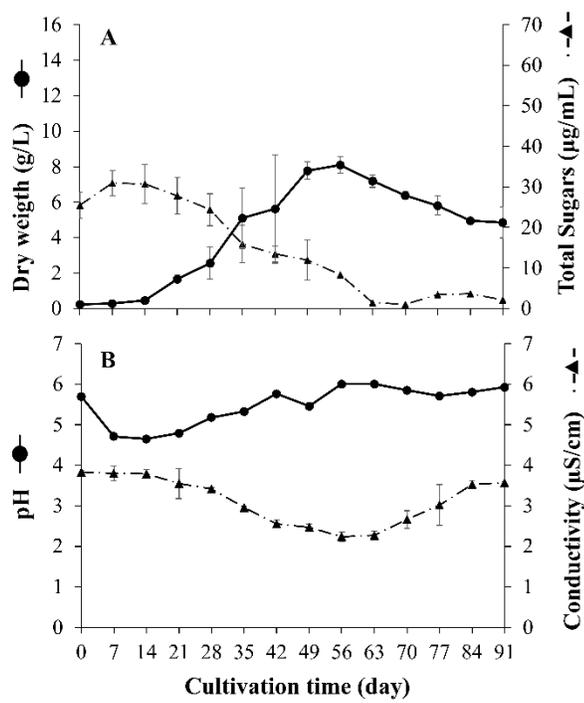


Figure 2.

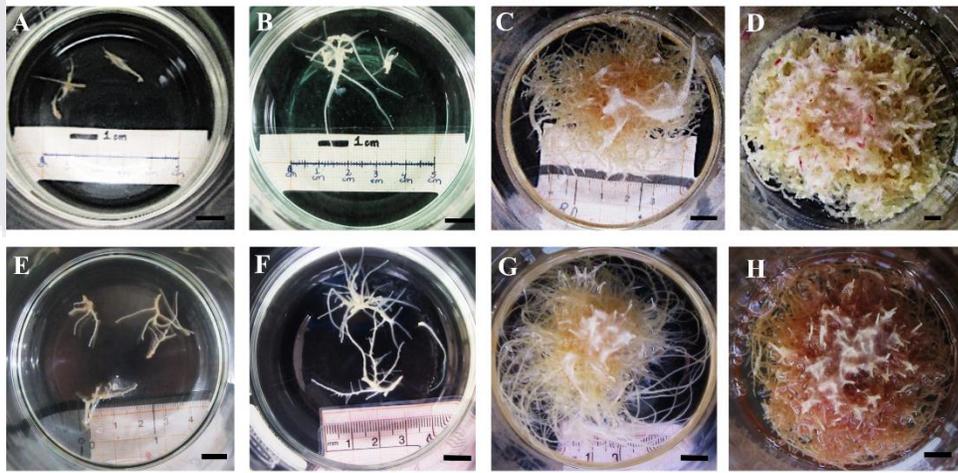


Figure 3.

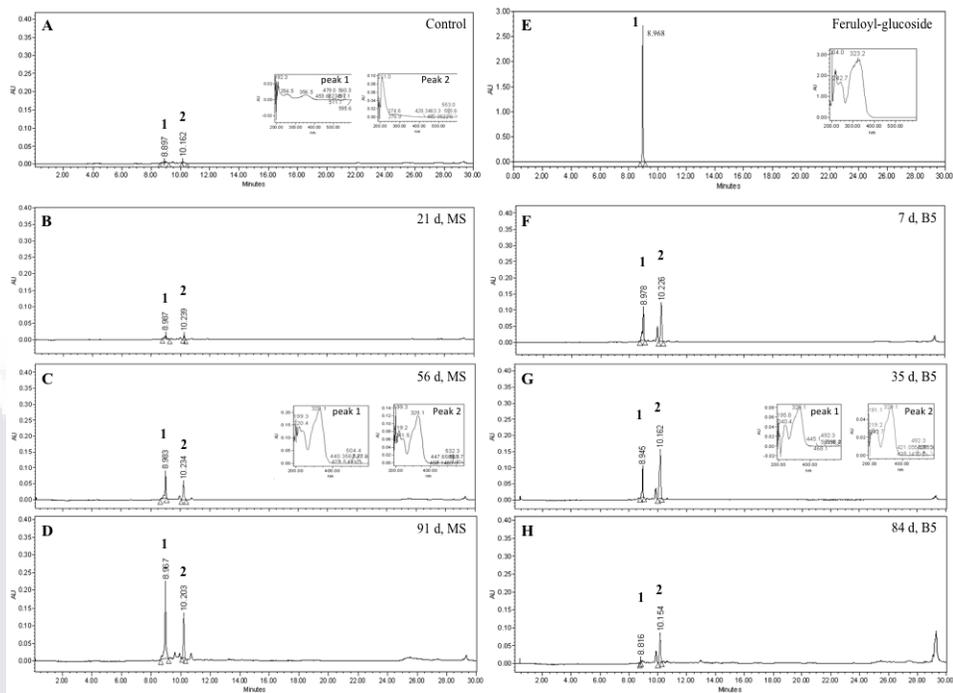


Figure 4.

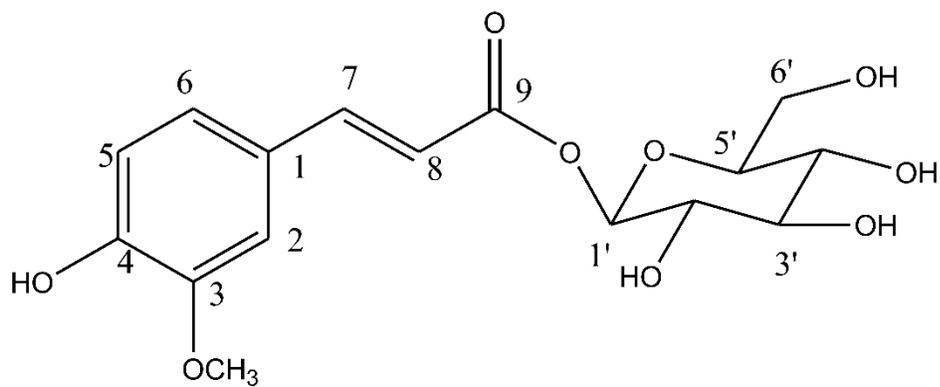


Figure 5.

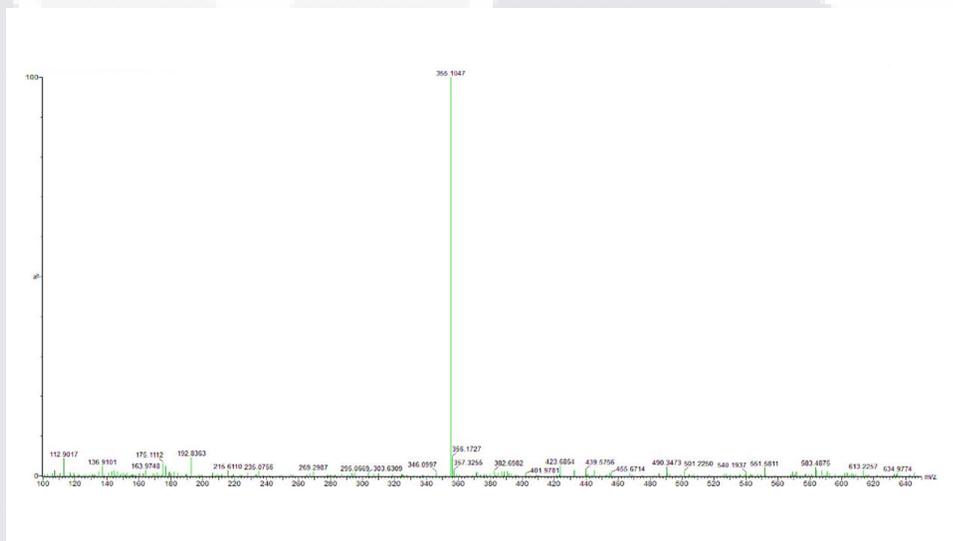


Figure 6. Supplement

**Table 1**

Carbon and proton chemical shifts ( $\delta$ , ppm) of feruloyl-glucoside (acetone  $d_6$ ).

Carbon position <sup>b</sup>	Feruloyl-glucoside <sup>a</sup>		Kim et al., 2016	
	$\delta$ H	$\delta$ C	$\delta$ H	$\delta$ C
1	-	126.3	-	125.5
2	8.13 (1H, <i>d</i> , 1.6, H-2')	111.8	7.34 (1H, <i>d</i> , 1.6, H-2)	111.4
3		146.9	-	147.9
4		146.9	-	149.6
5	7.68 (1H, <i>d</i> , 8.0, H-5')	114.6	6.80 (1H, <i>d</i> , 8.2, H-5)	115.5
6	7.98 (1H, <i>dd</i> , 8.0, 1.4 H-6')	123.8	7.15 (1H, <i>dd</i> , 8.2, 1.5 H-6)	123.3
7	8.5 (1H, <i>d</i> , 15.6)	146.9	7.63 (1H, <i>d</i> , 15.9)	146.3
8	6.33 (1H, <i>d</i> , 15.6)	114.8	6.48 (1H, <i>d</i> , 16.0)	113.9
9		167.41	---	165.4
1'	6.33 (1H, <i>d</i> , 8.0, H-1')	95.06	5.46 (1H, <i>d</i> , 8.1, H-1')	94.2
2'	3.1 (1H, <i>m</i> , C-2')	74.2	3.20 (1H, <i>m</i> , C-2')	72.5
3'	3.37 (1H, <i>m</i> , C-3')	77.4	3.23 (1H, <i>m</i> , C-3')	76.5
4'	2.88 (1H, <i>m</i> , C-4')	70.4	3.07 (1H, <i>m</i> , C-4')	69.5
5'	3.37 (1H, <i>m</i> , C-5')	74.2	3.22 (1H, <i>m</i> , C-5')	77.8
6'	4.1 (1H, <i>m</i> , C-6'a)	61.6	3.66 (1H, <i>m</i> , C-6'a)	60.6
	3.9 (1H, <i>m</i> , C-6'b)		3.46 (1H, <i>m</i> , C-6'b)	
Me	4.03 (3H, <i>s</i> , O-CH <sub>3</sub> )	56.26	3.82 (3H, <i>s</i> , O-CH <sub>3</sub> )	55.7

<sup>a</sup> Data in <sup>1</sup>H (400 MHz) and <sup>13</sup>C (100 MHz)

<sup>b</sup> See Fig. 1 for numbering

Splitting patterns and the coupling constant (*J*, values in Hz) are shown in parentheses.

Splitting patterns and the coupling constant (*J*, values in Hz) are shown in parentheses.