



Universidad del Papaloapan

Terra Uberissima, Mens Aperta

Campus San Juan Bautista Tuxtepec

**Evaluación del efecto elicitor del metil
jasmonato sobre la producción de
fenilpropanoides en plántulas *in vitro* de
Gomphrena globosa y estudio *in silico* de
enzimas clave de su síntesis**

TESIS

Para obtener el título de:

Maestría en Biotecnología

Presenta:

Estefania del Carmen Urdiana Arteaga

Director de Tesis

Dr. Edgar García López

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. 2019

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales y de Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan, bajo la dirección del Dr. Edgar García López.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento del proyecto 3212 Cátedras-CONACYT 183958 e INFRA CONACYT 255514. Asimismo, se contó con la beca CONACYT con número de registro 782851 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.

PRODUCTOS

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

MODALIDAD CARTEL

Urdiana Arteaga, E. del C., García López, E. Análisis bioinformático de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en *Gomphrena globosa* para los estudios de niveles de expresión génica. Poster 15° IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx. 3-6 diciembre 2017. Tlaxcala, Tlaxcala, México.

ARTÍCULOS

Urdiana-A, E., García-L, E. 2018. Análisis Bioinformático de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en *Gomphrena globosa* para el estudio de los niveles de expresión génica. Mexican Journal of Biotechnology 3(3): 68-76

AGRADECIMIENTO

Emprender este reto implicó alejarme de casa, y de mi familia, agradezco por su apoyo y comprensión. A mi hermanita Diana le agradezco su amor y por extrañarme tanto, deseo que todo el esfuerzo y sacrificio que me ha visto pasar, le sirva de motivación para su continua superación.

Al Dr. Edgar, mi director de tesis, le agradezco por todos los consejos y conocimientos que me ha brindado, y la paciencia que me ha tenido en todos los altibajos por los que he pasado. A la Dra. Ariana y a la Dra. Jacqueline por estar al pendiente de mí, por auxiliarme en el laboratorio y por todas sus recomendaciones. Dra. Blanca y Dr. Julián muchísimas gracias por toda su ayuda.

Agradezco también a todos los doctores que formaron parte de mi preparación, pues cada uno dejó lecciones que he ido poniendo en práctica.

Gracias muchas gracias a mis compañeros de laboratorio, Betzaida, Frank; me enseñaron cosas que me permitieron sacar adelante mi trabajo. Y a mis grandes amigas que encontré en el camino, doña Karen, Abril y Liria; juntas hemos pasado grandes momentos y espero que nuestra amistad perdure.

Quiero agradecer a Hazael Ortiz, mi amor, quien me ha apoyado desde siempre, y ha permanecido a mi lado, sin importar que tan lejos pueda estar. Cada logro que consigamos es nuestro. Gracias por soportar la distancia y mi ausencia, sin ti no podría haberlo logrado.

DEDICATORIA

Para ti mi amor, mi mejor amigo, compañero ideal.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/016
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 8 de febrero de 2019

C. ESTEFANIA DEL CARMEN URDIANA ARTEAGA
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	Presidente
Dr. Edgar García López	Cátedras CONACYT	Vocal
Dr. Miguel Ángel Peña Rico	UNPA	Secretario
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	1er Suplente
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedras CONACYT	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo.



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

C.c.p. Dr. Edgar García López – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

Recibi
Edgar García López
200219

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial,
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria,
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/077
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 20 de febrero de 2019

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro en Biotecnología del **C. Estefania del Carmen Urdiana Arteaga**, matrícula **16140018**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Evaluación del efecto elicitor del metiljasmonato sobre la producción de fenilpropanoides en plántulas *in vitro* de *Gomphrena globosa* y estudio *in silico* de enzimas clave de su síntesis**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. Adolfo López Torres
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. C. Estefania del Carmen Urdiana Arteaga
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

Contenido

Índice de figuras.....	10
Índice de tablas.....	11
ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
1. Introducción.....	17
2. Antecedentes.....	18
2.1 Familia de las <i>Amaranthaceae</i>	18
2.1.1 Género <i>Gomphrena</i>	19
2.2 Usos terapéuticos del género <i>Gomphrena</i>	19
2.3 Fitoquímica de <i>Gomphrena</i>	22
2.4 Principales familias de metabolitos secundarios (con actividad biológica) en <i>Gomphrena globosa</i>	26
2.4.1 Betalaínas.....	26
2.4.2 Saponinas.....	28
2.4.3 Fenilpropanoides.....	29
2.5 Estudios de la expresión genética.....	36
2.5.1 PCR.....	36
2.5.2 Estudios de los niveles de expresión en plantas.....	37
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> vegetal.....	39
2.6.1 Reguladores de crecimiento vegetal.....	41
2.6.2 Medio de cultivo.....	43
2.6.3 Tipos de cultivo <i>in vitro</i> vegetal.....	44
2.6.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gomphrena globosa</i>	47
2.7 Elicitación.....	48
2.7.1 Tipos de elicitor.....	48
2.7.2 Factores que influyen la elicitación.....	49
2.7.3 Elicitación con metil jasmonato.....	51
3. Justificación.....	52
4. Hipótesis.....	53
5. Objetivos.....	53
5.1 Objetivo general.....	53
5.2 Objetivos específicos.....	53
6. Estrategia experimental.....	54

7. Materiales y métodos	55
7.1 Propagación de cultivos de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Gomphrena globosa</i>	55
7.2 Selección de los genes de estudio y diseño de oligonucleótidos para su amplificación	55
7.3 Inducción de estrés en plántulas de <i>Gomphrena globosa</i>	56
7.4 Extracción de compuestos fenilpropanoides	57
7.5 Cuantificación de compuestos fenilpropanoides	57
7.6 Extracción de ADN	58
7.7 Ensayo de PCR.....	58
7.8 Electroforesis en gel de agarosa	59
8. Resultados y discusión	60
8.1 Propagación de cultivos de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Gomphrena globosa</i>	60
8.2 Cinética de elicitación con MeJA en plántulas de <i>Gomphrena globosa</i>	62
8.3 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides de las muestras elicidadas.....	64
8.4 Selección de genes de estudio	75
8.5 Diseño de oligonucleótidos para su amplificación.....	76
8.6 Pruebas de amplificación sobre ADN genómico	79
9. Conclusiones	81
10. Perspectivas.....	82
Bibliografía	83
ANEXOS.....	91

Índice de figuras

Figura 1. Compuestos extraídos de <i>Gomphrena globosa</i> : 1) estigmasterol y 2) β -sitosterol	24
Figura 2. Ruta metabólica de la biosíntesis de betalaínas.....	27
Figura 3. Ruta metabólica de la biosíntesis de saponinas.....	29
Figura 4. Ruta metabólica de biosíntesis de fenilpropanoides.....	35
Figura 5. Tipos de cultivo <i>in vitro</i> vegetal.....	46
Figura 6. Estrategia experimental por seguir para el estudio de expresión genética de compuestos fenilpropanoides en <i>Gomphrena globosa</i>	54
Figura 7. Plántulas de <i>Gomphrena globosa</i>	60
Figura 8. Cinética de elicitación con MeJA en plántulas de <i>G. globosa</i>	63
Figura 9a. Producción de fenoles totales en parte aérea de <i>G. globosa</i> durante 24 h de exposición al elicitor.....	64
Figura 10a. Producción de fenoles totales en raíz de <i>G. globosa</i> durante 24 h de exposición al elicitor.....	66
Figura 11a. Producción de flavonoides en parte aérea de <i>G. globosa</i> durante 24 h de exposición al elicitor.....	67
Figura 9b. Producción de fenoles totales en parte aérea de <i>G. globosa</i> durante 24 h de exposición al elicitor.....	68
Figura 10b. Producción de fenoles totales en raíz de <i>G. globosa</i> durante 24 h de exposición al elicitor.....	69
Figura 11b. Producción de flavonoides en parte aérea de <i>G. globosa</i> durante 24 h de exposición al elicitor.....	70
Figura 12. Resultado del alineamiento de secuencias en MEGA 7 para la enzima HQT.....	79
Figura 13. Gel de agarosa de amplificación de oligonucleótidos en ADN.....	80

Índice de tablas

Tabla 1. Principales actividades biológicas reportadas para el género <i>Gomphrena</i> ...	20
Tabla 2. Actividades biológicas en <i>Gomphrena globosa</i>	21
Tabla 3. Elementos orgánicos detectados en dos especies de <i>Amaranthaceae</i>	24
Tabla 4. Metabolitos identificados en <i>Gomphrena globosa</i>	25
Tabla 5. Principales ventajas y desventajas de qPCR.....	37
Tabla 6. Ventajas y desventajas del cultivo <i>in vitro</i>	40
Tabla 7. Composición de medios de cultivo para cultivo vegetal <i>in vitro</i>	44
Tabla 8. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Gomphrena globosa</i>	47
Tabla 9. Clasificación de elicitores de acuerdo con su naturaleza y composición molecular.....	49
Tabla 10. Diseño de experimentos de la cinética de elicitación con plántulas de <i>G. globosa</i>	56
Tabla 11. Master Mix para ensayo de amplificación.....	58
Tabla 12. Gradiente de temperaturas para ensayo de amplificación.....	59
Tabla 13. Programa de amplificación de oligonucleótidos.....	59
Tabla 14. Números de acceso a la información disponible de las enzimas de la ruta de fenilpropanoides	75
Tabla 15. Números de acceso a las secuencias disponibles para el gen de actina	77
Tabla 16. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de enzimas de la ruta de fenilpropanoides	78

ABREVIATURAS

µg: microgramo	°C: grados celsius
µL: microlitro	C3H: 4-cumaroato 3-hidroxisilasa; cinamato (cumaroil quinato/shikimato) 3- hidroxisilasa)
µM: micromolar	C4H: cinamato 4-hidroxisilasa
2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético	CCR: cinamoil CoA reductasa
4CL: 4-cumaroato CoA ligasa	Cd: cadmio
ABA: ácido abscícico	CHS: chalcona sintasa
ADN: ácido desoxirribonucleico	CHI: chalcona isomerasa
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario	cm: centímetro
AIA: ácido indol 3-acético	Cl: cloro
AlCl ₃ : cloruro de aluminio	Co: cobalto
ARN: ácido ribonucleico	Cr: cromo
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	Cu: cobre
ARNr: ácido ribonucleico ribosomal	DFR: dihidroflavonol 4-reductasa
ARNt: ácido ribonucleico de transferencia	DMAPP: dimetilalil difosfato
B5: medio de cultivo basal Gamborg	DOD: dihidroxifenilalanina 4,5- dioxigenasa
Ba: bario	DOPA: dihidroxifenilalanina
BAP: 6-benzil-amino-purina	EAG: equivalentes de ácido gálico
Br: bromo	EQ: equivalentes de quercetina
BS: biomasa seca	ES: extracto seco
cDOPA: ciclodihidroxifenilalanina	

F3H: flavonona 3-hidroxilasa	min: minuto
Fe: fierro	mL: mililitro
FPP: farnesil difosfato	mm: milímetro
g: gramos	mM: milimolar
GC: guanina/citosina	Mn: manganeso
GPP: geranil difosfato	MS: medio Murashige & Skoog
H ₂ O ₂	NAA: ácido naftalenacético
h: horas	Na ₂ CO ₃ : carbonato de sodio
HPLC-RP: cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa	NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
HQT: hidroxicinamoil CoA: quinato hidroxicinamoil transferasa	NaNO ₃ : nitrato de sodio
IPP: isopentenil difosfato	NaOH: hidróxido de sodio
IAA: ácido indolacético	ng: nanogramo
JA: ácido jasmónico	Ni: níquel
K: potasio	nm: nanómetro
KIN: cinetina	OGD: 2-oxoglutarato dependiente dioxigenasa
LDOX: leucoantocianidina dioxigenasa	ORF: marco abierto de lectura
M: molar	P: fósforo
MAV: mevalonato	PAL: L-fenilalanina amonio liasa
MeJA: metiljasmonato	pb: par de bases
MEP: metileritriol fosfato	Pb: plomo
mg: miligramo	PPO: polifenol oxidasa
	p/v: peso/volumen

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

rbcL: gen de ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa/ oxigenasa de subunidad larga del cloroplasto

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

s: segundo

S: azufre

SA: ácido salicílico

SAR: sistema de resistencia adquirido

Sc: escandio

sp: especie

spp: múltiples especies

Sr: estroncio

Ti: titanio

Tm: temperatura de alineamiento

UFGT: uridín difosfato glucosa: flavonoide 3-O-glucosil transferasa

UV: ultravioleta

v: volts

V: vanadio

Zn: zinc

RESUMEN

Gomphrena globosa es una planta ornamental que cuenta con metabolitos secundarios que han sido reportados en estado silvestre y en cultivos *in vitro*, principalmente los compuestos fenilpropanoides (fenoles y flavonoides). Estos compuestos con diversas actividades biológicas fungen también como defensores del sistema contra estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del metil jasmonato sobre la producción de fenilpropanoides en cultivos *in vitro* de *Gomphrena globosa* y estudiar *in silico* las enzimas clave de su biosíntesis. Se realizó la propagación de plántulas de *G. globosa* en medio Murashige & Skoog semisólido para contar con las unidades experimentales para el experimento de elicitación. Se elicitaron 3 plántulas por unidad experimental con metil jasmonato (MeJA) 25 y 50 μM , teniendo como controles muestras sin elicitar y muestras con etanol 4.5 mM. La mayor producción de fenoles totales se observó a las 6 y 12 h posteriores a la aplicación del elicitor a 25 μM (65.580 mg EAG/g ES y 60.902 mg EAG/g ES) y a las 6 h con MeJA 50 μM (60.604 mg EAG/g ES) en parte aérea, y en raíz el mayor incremento se obtuvo a las 12 h con MeJA 50 μM (23.652 mg EAG/g ES). Después de 3 h con MeJA 50 μM y de 18 h con MeJA 25 μM se alcanzó un contenido de 0.595 mg EQ/g ES y 0.664 mg EQ/g ES respectivamente. El diseño de oligonucleótidos se realizó por homología de secuencias para 6 enzimas clave en la biosíntesis de fenilpropanoides, debido a que no existen secuencias reportadas para *G. globosa*, validando su amplificación con un barrido de temperaturas. De los 6 pares de oligonucleótidos (PAL, C4H, 4CL, C3H, HQT Y CCR), sólo amplificaron 2 (C3H y HQT) en las condiciones establecidas, obteniendo bandas de entre 50 y 150 pb. Este es el primer trabajo donde se evalúa la elicitación con MeJA en plántulas de *G. globosa* y se realiza un estudio *in silico* de las enzimas clave en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides.

ABSTRACT

Gomphrena globosa is an ornamental plant, it has secondary metabolites that have been reported in the wild and *in vitro* cultures, mainly the phenylpropanoid compounds (phenols and flavonoids). These compounds, with diverse biological activities, also serve as defenders of the system against oxidative stress. The objective of this work was to evaluate the effect of methyl jasmonate on the production of phenylpropanoids in *in vitro* cultures of *G. globosa* and to study, *in silico*, key enzymes of its biosynthesis. The propagation of *G. globosa* seedlings in semi-solid Murashige & Skoog medium was carried out in order to acquire the experimental units necessary for the elicitation experiment. Three seedlings were elicited per experimental unit with methyl jasmonate (MeJA) at 25 and 50 μM , having as controls untreated samples and samples treated with 4.5 mM ethanol. The highest production of total phenols was observed at 6 and 12 h after the application of the elicitor at 25 μM (65.580 mg EAG/g DE and 60.902 mg EAG/g DE) and at 6 h with 50 μM MeJA (60.604 mg GAE/g DE) in aerial part, and in the root the greater increase was obtained at 12 h with MeJA 50 μM (23.652 mg GAE/g DE). After 3 h with 50 μM MeJA and 18 h with 25 μM MeJA, a content of 0.595 mg QE/g DE and 0.664 mg QE/g DE was observed, respectively. The oligonucleotide design was carried out by sequence homology of 6 key enzymes in the phenylpropanoid biosynthesis, because there are no reported sequences for *G. globose*. Its amplification was validated using a PCR experiment with temperature gradient. Out of the 6 pairs of oligonucleotides designed (PAL, C4H, 4CL, C3H, HQT and CCR), only two of them amplified (C3H and HQT) under the defined conditions, rendering bands between 50 and 150 bp. This is the first study where the elicitation with MeJA in *G. globosa* seedlings is evaluated and *in silico* study of the key enzymes in the phenylpropanoid biosynthesis pathway is carried out.

1. Introducción

Gomphrena globosa, comúnmente conocida como amaranto globoso o siempre viva, ha adquirido interés científico debido a las actividades biológicas de sus metabolitos secundarios. Los principales metabolitos secundarios encontrados en *Gomphrena* son: betalainas con actividad antioxidante, anticancerígena, antiproliferativa y antiinflamatoria (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008); saponinas con actividad citotóxica, antiinflamatoria, antifúngica, antimicrobiana y antiviral (Kim *et al*, 2011); y los fenilpropanoides con actividad antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana y antiinflamatoria (Castrillón & Délano, 2016). En nuestro equipo de trabajo, los principales metabolitos encontrados en *Gomphrena globosa* son los fenoles simples y flavonoides (Méndez, 2017).

Gomphrena globosa es una especie de hierba presente en América tropical, ramificada anual, cultivada como una hierba de floración ornamental en jardines con una tasa de crecimiento lento (Ilyas, Tarnam, & Begum, 2013). El cultivo *in vitro* vegetal de plántulas es un método para multiplicar de manera masiva en corto tiempo en cualquier época del año, conservando el germoplasma y produciendo compuestos de interés como los fenilpropanoides. Aunado al hecho de las plántulas, al desarrollar por completo ciertos órganos, nos permite tener un panorama general de lo que ocurre en su metabolismo a través de estudios fitoquímicos.

La elicitación puede inducir la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro*, donde el metil jasmonato (MeJA por sus siglas en inglés) es la fitohormona que inhiben el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas, promueven la senescencia, la abscisión y la formación de tubérculos, además de que se ha estudiado su efecto como aplicación exógena, incrementando la producción de metabolitos secundarios como los fenilpropanoides (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005). A su vez el ácido salicílico (SA por sus siglas en inglés) es una fitohormona producida por la vía de fenilpropanoides, que induce el sistema de resistencia adquirido (SAR por sus siglas en inglés). Su aplicación exógena inhibe la síntesis de enzimas que participan en la transducción de señales, formando especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), estimulando la producción de metabolitos secundarios (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005).

Se ha observado también que la elicitación puede modificar los niveles de expresión de enzimas clave en la biosíntesis de metabolitos secundarios, lo que es posible corroborar si la

ruta de biosíntesis se conoce en su totalidad. Sin embargo, en *Gomphrena globosa* no existe información reportada sobre estos hechos, por lo que en el presente estudio se evaluarán los niveles de expresión de enzimas claves en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, a través de la elicitación con MeJA y SA en plántulas *in vitro* de dicha especie.

2. Antecedentes

2.1 Familia de las *Amaranthaceae*

La familia de las angiospermas *Amaranthaceae*, clase Magnoliopsida del orden Caryophyllales fue establecida en 1789 por A. L. Jussieu, la cual incluye 176 géneros y 2400 especies; 25 géneros son exclusivos de África, 13 son endémicos de América y de las Islas Galápagos. 3 de estos géneros corresponden a las *Amaranthoideae* y los otros 10 géneros le pertenecen a *Gomphrenoideae-Gomphreneae* (Sánchez, Flores, & Valdés, 1999). En México se han reportado 10 géneros de esta familia, 36 especies y 6 variedades, siendo la octava familia más diversa en el país, con respecto a las 79 familias de flora halófila y gipsófila (Sánchez, Flores, & Valdés, 1999).

Las *Amaranthaceae* son una familia cosmopolita la cual crece en condiciones severas, en áreas salinas y áridas; una de estas características asegura su supervivencia en ambientes adversos al realizar la fotosíntesis por la ruta metabólica C4 debido a la anatomía interna de las hojas. Otras características presentes en esta familia son la esperanza de vida, estructura de las hojas, comportamiento, cobertura pilosa y tipos de venas; secuencias *rbcL* (gen de Ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa/oxigenasa de subunidad larga del cloroplasto por sus siglas en inglés), secuencia ORF2280 (marco abierto de lectura por sus siglas en inglés, del plástido de plantas), estructura del cloroplasto y sitios de restricción del ADN. Algunas especies tienen hojas y raíces comestibles, las semillas de las especies ubicadas en Sudamérica son usadas para flores y otras son ornamentales, por ejemplo: *Celosia* spp., *Gomphrena* spp., e *Iresine* spp (Fank de Carvalho *et al*, 2010).

Las *Amaranthaceae* son hierbas erectas o ascendentes de 50 cm, con hojas en espiral, deltoides a elípticas ovaladas. Tienen inflorescencias axilares, esbeltas y con puntas tirsoideas. Florecen principalmente entre junio y diciembre (Ilyas, Tarnam, & Begum, 2013).

Los miembros de la familia *Amaranthaceae* están divididos en cuatro tribus: *Celosieae*, *Achyrantheae*, *Braylineae* y *Gomphreneae* (Salvador *et al*, 2012). El grupo *Gomphrenoideae* contiene 19 géneros y aproximadamente 400 especies; *Gomphrena* y *Alternanthera* son dos de los géneros más grandes y amplios con 120 y 100 especies respectivamente (Sánchez, Borsch, & Motley, 2009).

2.1.1 Género *Gomphrena*

Varias especies del género *Gomphrena* son arbustos o hierbas, usualmente con un sistema grueso subterráneo de naturaleza maderosa o carnosa. Existen varias especies consideradas malezas y algunas son cultivadas como jardinería ornamental. Las especies *Gomphrena* comprenden una serie de plantas comestibles, ornamentales y medicinales comúnmente conocidas como Amaranto globoso (Ilyas, Tarnam, & Begum, 2013).

Gomphrena globosa es una especie de América tropical, es una hierba ramificada anual, cultivada como una hierba de floración ornamental en jardines, la cual es comúnmente conocida como amarantina, amaranto redondo, perpetua, amaranto perenne, siempreviva, flor de Santa Lucía, ocucha, pluma, malva blanca, violetilla, violeta silvestre o flor de la oración, que pertenecen a la familia de las *Amaranthaceae*. Sus hojas son de entre 5-10 cm, subsésiles, elípticas u ovaladas, agudas u obtusas. Sus flores tienen de 2.5-3.7 cm de diámetro, moradas o rosadas, globosas con dos brácteas frondosas, con pedúnculos terminados en ramificaciones. Crece de 30 a 60 cm de altura con una tasa de denso y lento crecimiento (Hamiduzzaman *et al*, 2012).

2.2 Usos terapéuticos del género *Gomphrena*

Las especies de *Gomphrena* son empleadas en la medicina popular para el tratamiento de muchas enfermedades, debido a su valor nutritivo. Las hojas y flores de *Gomphrena globosa* es un remedio popular para la oliguria, fiebre y empacho, hipertensión, como antimicrobial y antioxidante, para la tos, diabetes, problemas del riñón, ronquera, bronquitis y otras enfermedades respiratorias, principalmente como expectorante y para problemas reproductivos. Las diferentes especies de este género también muestran actividad antibacterial, antimalárica y diurética. Además del uso ornamental es también comúnmente usada para el tratamiento de ictericia, colesterol alto y problemas urinarios en América Latina y el Caribe (Ilyas, Tarnam, & Begum, 2013).

En Sudamérica, *Gomphrena globosa* es utilizada como abortivo. Decocción de la planta entera de esta y de otras especies relacionadas son aplicadas a heridas gangrenadas. *Gomphrena martiana* y *Gomphrena boliviana* son empleadas como agentes antimicrobianos por los nativos. Como tratamiento para el dolor de cuerpo, las hojas de *Gomphrena globosa* son molidas en una pasta que se aplica en la parte afectada y se cubren con la hoja de la misma planta. Las especies con actividad biológica, incluyendo la actividad antimicrobiana, con usos en enfermedades respiratorias y gastrointestinales y enfermedades infecciosas se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Principales actividades biológicas reportadas para el género *Gomphrena* (Salvador *et al*, 2012).

Especie	Actividad biológica
<i>Gomphrena boliviana</i>	Actividad antimicrobiana, propiedades anticancerígenas, actividad citotóxica.
<i>Gomphrena celosioides</i>	Actividad antimicrobiana (bacteria <i>Plasmodium falciparum</i>), propiedades anticancerígenas, actividad analgésica.
<i>Gomphrena globosa</i>	Actividad antimicrobiana, propiedades anticancerígenas, actividad citotóxica.
<i>Gomphrena haenkeana</i>	Actividad antimicrobiana, propiedades anticancerígenas, actividad citotóxica.
<i>Gomphrena macrocephala</i>	Muluscicida (<i>Biomphalaria glabrata</i>) y citotóxica contra <i>Artemia salina</i>
<i>Gomphrena martiana</i>	Actividad antimicrobiana, propiedades anticancerígenas, actividad citotóxica.
<i>Gomphrena mayeniana</i>	Actividad antimicrobiana, propiedades anticancerígenas, actividad citotóxica.
<i>Gomphrena perennis</i>	Actividad antimicrobiana, propiedades anticancerígenas, actividad citotóxica.
<i>Gomphrena pulchella</i>	Actividad antimicrobiana

Las actividades biológicas reportadas para *Gomphrena globosa* se muestran en la Tabla 2, donde se incluye el antecedente del equipo de trabajo.

Tabla 2. Actividades biológicas en *Gomphrena globosa*

<i>Gomphrena globosa</i>	Actividad	Autor
Planta completa (extracto metanólico)	Antioxidante	Cai <i>et al</i> , 2003
Hojas (extracto etanólico)	Citotóxica Antimicrobiana Hipotensiva	Arcanjo <i>et al</i> , 2011
Planta completa (extracto metanólico)	Antimicrobiana Citotóxica Antioxidante	Hamiduzzaman <i>et al</i> , 2012
Inflorescencias (extracto acuoso y etanólico)	Antioxidante Antiinflamatoria	Silva <i>et al</i> , 2012
Parte aérea (extracto con cloroformo)	Citotóxica	Latha & Rajendran, 2013
Flores (extracto metanólico, butanólico y etanólico)	Antioxidante	Sharma & Grewal, 2014
Flores (extracto acuoso)	Antioxidante	Lobo, <i>et al</i> , 2015
Planta completa (extracto de acetato de etilo)	Anticancerígena	Aguilar, 2018

2.3 Fitoquímica de *Gomphrena*

Ferreira, y colaboradores en 2004 encontraron que la parte aérea de la planta contiene glicósidos de esterol como Gomphesterol β -D glucósido unido a β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, estigmasterol- β -D-glucósido, friedelina, 3-epi-friedelinol, alantoína y crisoeriol-7-O- β -D-glicósido, gomphrenósido, hopan-7 β -ol, β -sitosterol-3-O- β -D glucósido y 1-triacontanol. La extracción con acetato de etilo y metanol de *Gomphrena celosioides*, al realizarle el análisis fitoquímico por Dosumu *et al*, en 2005 se reveló la presencia de metabolitos secundarios que incluyeron: alcaloides, taninos, saponinos, esteroides, glicósidos y azúcares reductores. Corke, Cai, y Sun, en 2005 identificaron betacianinas en ocho tipos de amarantinas, seis tipos de gomphreninas y dos tipos de betaninas de Amaranthaceae mediante la caracterización por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (HPLC-RP por sus siglas en inglés).

Kuroda, y colaboradores en 2006 analizaron los constituyentes fitoquímicos de *Gomphrena macrocephala*, resultando en el aislamiento de dos nuevos oleananoglicósidos y un nuevo taraxerano glicósido. Betalainas, betacianinas y flavonoides fueron también aislados de la planta completa (Chang, Chu, & Chu, 2012) y de las flores (Heuer *et al*, 1992).

Dosumu, y colaboradores en 2010 aislaron compuestos bioactivos como saponinas, esteroides, aminoácidos, azúcares no reductores, fenoles y flavonoides de la extracción metanólica de *Gomphrena celosioides*. Dosumu, y colaboradores en 2010 evaluaron la bioactividad de extractos de *Gomphrena celosioides* contra diversos organismos. Los extractos de acetato de etilo y metanol de la planta mostraron actividad inhibitoria en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. El extracto de metanol fue activo contra *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y especies *Tricophyton* con un diámetro entre 14 y 20 mm. La extracción fraccionada con metanol produjo 3-(4-hidroxifenil) metilpropenoato con una leve actividad antimicrobiana contra los microorganismos evaluados. El ensayo antihelmíntico mostró en los extractos de acetato de etilo y metanol actividad contra *Fasciola gigantica*, *Taenia solium* y *Pheretima posthuma*. El extracto de acetato de etilo fue el más tóxico causando: parálisis a *Taenia solium* por 15 minutos y la muerte de *Fasciola gigantica* en 20 minutos de

aplicación. El análisis fitoquímico *Gomphrena globosa* extraída con etanol detectó la presencia de saponinas, alcaloides, azúcares reductores y cumarinas (Arcanjo *et al*, 2011).

Algunas especies de *Gomphrena* han sido estudiadas buscando la caracterización de elementos inorgánicos y metales pesados en sus tejidos. Algunos de estos trabajos realizados sugieren que estas plantas pueden bioconcentrar metales pesados. Usando análisis de fluorescencia de rayos X, se demostró que varios elementos inorgánicos que pudieran ser detectados en los extractos y polvos de las especies de *Gomphrena* (Tabla 3) (Salvador *et al*, 2012).

El análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección de Diodos (HPLC-DAD por sus siglas en inglés) permitió la determinación de 24 compuestos fenólicos identificados en inflorescencias de *Gomphrena globosa* extraídas con agua por calentamiento, y los cuales comprenden ácidos fenólicos libres, glicósidos flavonoides y aglicones. También fue posible identificar ocho betacianinas de la extracción con metanol de las inflorescencias (Silva *et al*, 2012)

Hamiduzzaman & Zafrul Azam, en 2012 hallaron tres componentes mostrados en la Figura 1: estigmasterol, β -sitosterol y ácido isocavícínico del extracto crudo la planta entera de *Gomphrena globosa* con metanol en combinación con una columna cromatográfica y cromatografía de capa fina sobre sílica gel. La oleuropeina fue aislada por Babu y colaboradores, en 2012 en *Gomphrena serrata* sometiéndola a extracción con cloroformo aplicando calor.

Los estudios químicos previos de las especies de este género fueron relacionados al aislamiento de hidrocarburos, alcoholes, esteroides, terpenoides, ecdisteroides, flavonoides y protoalcaloides. A pesar de que algunos estudios fitoquímicos y de actividad biológica se han llevado a cabo en ciertas especies, el género *Gomphreneae* sigue pobremente estudiado (Ilyas, Tarnam, & Begum, 2013).

Tabla 3. Elementos orgánicos detectados en dos especies de *Gomphrena*

Especie	Elementos inorgánicos detectados
<i>Gomphrena glabrata</i>	P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, Sr, Cd, Ba y Pb
<i>Gomphrena globosa</i>	S, K, Ca, Sc, Ti, V, Mn, Fe, Co, Cu y Zn
<i>Gomphrena globosa</i>	S, K, Ca, Fe, Co, Cu y Zn

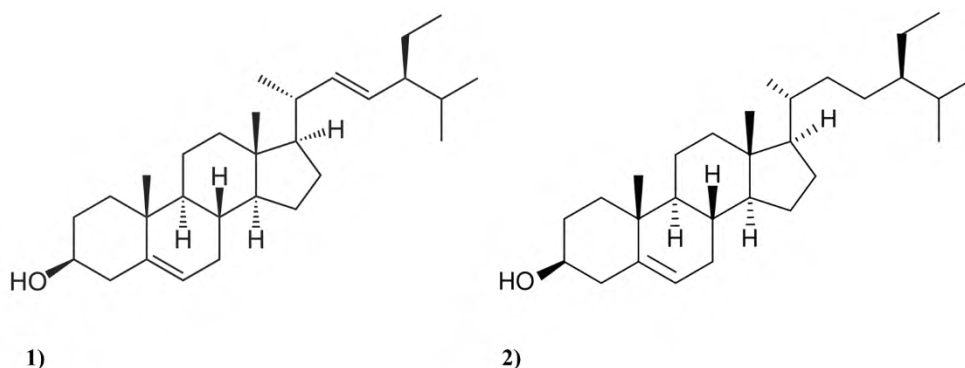


Figura 1. Compuestos extraídos de *Gomphrena globosa*: 1) estigmasterol y 2) β -sitosterol (Hamiduzzaman & Zafrul Azam, 2012).

Una nueva betaxantina fue detectada en inflorescencias de Ulluco amarillo y en *Gomphrena globosa*: Arginina-Betaxantina por Biswas, Satyahari, y Ramkrishna, en 2013; el cual no había sido reportado hasta entonces como un pigmento que ocurre de manera natural, siendo caracterizado en espectrofotometría de masas y UV-Visible.

Los metabolitos encontrados hasta la fecha en *G. globosa* y que ya se encuentran publicados se resumen en la Tabla 4, incluyendo lo reportado por nuestro equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales, que ha observado la presencia compuestos fenólicos y betalaínas, en cultivos celulares y plántulas obtenidas a partir de semillas artificiales (Méndez, 2017; Cruz, 2018).

Tabla 4. Metabolitos identificados en *Gomphrena globosa*

Material vegetal	Metabolito	Autor
Planta silvestre	Saponinas esteroideas (extracto hexánico) y triterpenoides (extracto diclorometánico) Compuestos nitrogenados (alantoína, adenosina) y compuestos aromáticos (flavonoides) (extracto metanólico)	André <i>et al</i> , 2003
Cultivo de callos	Flavonoides	
Planta silvestre	Triterpenoides (extracto metanólico fraccionado)	Dinda <i>et al</i> , 2004
Planta silvestre (hojas)	Saponinas, alcaloides, azúcares reductores y cumarinas	Arcanjo <i>et al</i> , 2011
Inflorescencias	Compuestos fenólicos (24) y betacianinas (8), (extracto acuoso)	Ferreres <i>et al</i> , 2011
Planta silvestre	Fenoles totales (extracto metanólico)	Hamiduzzaman <i>et al</i> , 2012
Inflorescencias	Compuestos fenólicos (24) (extracto acuoso) y betacianinas (8) (extracto metanólico)	Silva <i>et al</i> , 2012
Planta silvestre	Oleuropeina (extracto de cloroformo, metanol y acuoso)	Latha & Rajendran, 2013
Planta silvestre	Compuestos fenólicos (21) y betacianinas (extractos metanólicos)	Lobo <i>et al</i> , 2014
Inflorescencias	Betacianinas (extracto etanólico)	Lobo <i>et al</i> , 2017
Cultivos celulares	Compuestos fenólicos y betalainas	Méndez, 2017
Plántulas de semillas artificiales	Fenoles totales y betalainas (extracto acuoso)	Cruz, 2018

2.4 Principales familias de metabolitos secundarios (con actividad biológica) en *Gomphrena globosa*

Los metabolitos secundarios se encuentran sólo en organismos específicos o en grupos de organismos y son una expresión de individualidad en las especies. Los metabolitos secundarios no son necesariamente producidos en todas las condiciones y en la gran mayoría de los casos la función de estos compuestos y su beneficio al organismo aún no es conocido. Algunos sin duda son producidos por razones fácilmente apreciables: materiales tóxicos que proveen defensa contra predadores, atrayentes volátiles hacia las mismas u otras especies, pero es lógico asumir que todos juegan un papel vital en el bienestar del productor. En esta área, el metabolismo secundario provee muchos de los productos naturales farmacológicamente activos (Dewick, 2002). Entre los compuestos bioactivos que se han reportado en *Gomphrena globosa* se describen a continuación.

2.4.1 Betalainas

Las betalainas se clasifican en betacianinas rojas y en betaxantinas amarillas. La biosíntesis metabólica de betalainas, las enzimas y los genes involucrados en la ruta metabólica son menos comprendidos que los flavonoides y los carotenoides. Los pasos de la biosíntesis fueron propuestos hace 25 años, como base de evidencia fitoquímica de experimentos alimenticios. La molécula precursora de esta ruta es dihidroxifenilalanina (DOPA por sus siglas en inglés), a partir de tirosina por la enzima tirosin hidroxilasa. Esta ruta de biosíntesis consiste en pasos de varias reacciones enzimáticas y reacciones químicas espontáneas (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008), las cuales se muestran en la Figura 2.

La formación de DOPA es catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa, hacia la formación de ácido betalámico por DOPA 4,5-dioxigenasa (DOD por sus siglas en inglés), la formación de cDOPA (ciclodihidroxifenilalanina por sus siglas en inglés) en plantas se lleva cabo por PPO (polifenol oxidasa por sus siglas en inglés) o DOPA oxidasa (enzima III), la conjugación de ácido betalámico y el grupo amino de un aminoácido por cDOPA (Enzima VIII), y la modificación con moléculas de azúcar y alifáticos o aromáticos por las enzimas IV-VII. cDOPA es presumiblemente sintetizado a partir de DOPA por la acción de PPO, pero no hay

evidencia directa que lo pruebe *in vitro*, excepto la correlación de la acumulación de ARNm de PPO y contenido de betacianina en tejidos de menta (Joy IV *et al*, 1995).

Las betalaínas son unos de los primeros colorantes naturales desarrollados para el uso en sistemas alimenticios y son ampliamente usados en la industria alimenticia moderna, además de que se demostró que tienen importantes actividades biológicas como la inducción de la quinona reductasa, potente enzima de detoxificación en la quimio prevención del cáncer, actividad antiproliferativa de células de melanoma maligno y actividad antioxidante que representa una nueva clase de antioxidantes alimenticios (Cai, Sun, & Corke, 2005).

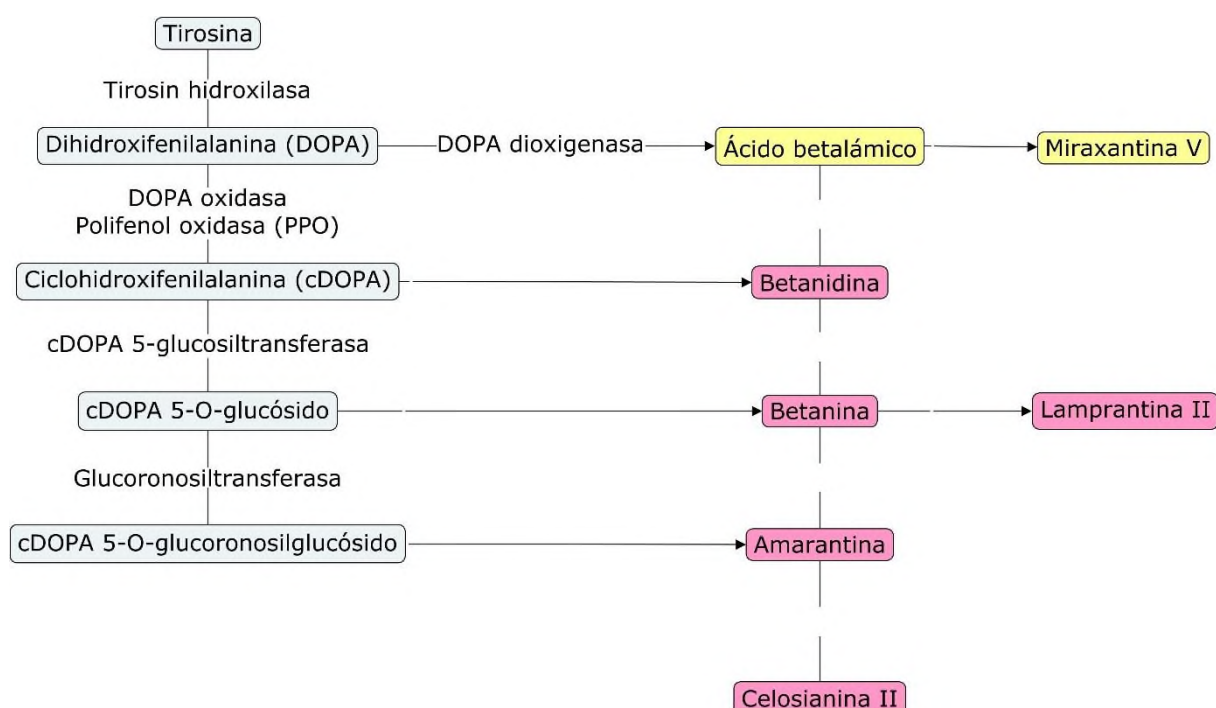


Figura 2. Ruta metabólica de la biosíntesis de betalaínas (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008). Las enzimas se encuentran como palabra de enlace entre los cuadros, y los metabolitos resultantes se encuentran dentro de los cuadros grises. Las flechas que tienen una división entre ellas corresponden a reacciones incompletas o enzimas desconocidas.

2.4.2 Saponinas

La biosíntesis de saponinas es un proceso complicado mediado por dos rutas metabólicas de biosíntesis: la ruta del mevalonato (MAV por sus siglas en inglés) y la ruta del metil-eritriol (MEP por sus siglas en inglés), ambas lideran la formación de isopentenil difosfato (IPP por sus siglas en inglés) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP por sus siglas en inglés), los cuales son los precursores de todos los terpenos que se formarán. La adición de IPP y DMAPP encabeza la formación de geranil difosfato (GPP por sus siglas en inglés) mediada por geranil difosfato sintasa. Farnesil difosfato sintasa es responsable de la adición de un IPP a un GPP. Más adelante, la enzima escualeno sintasa dirige la condensación de dos moléculas de farnesil difosfato (FPP por sus siglas en inglés) de la síntesis del escualeno, las cuales son las principales precursoras de saponinas esteroideas y triterpenas. Subsecuentemente, escualeno es oxidado a óxidoescualeno, el punto de inicio común de reacciones de ciclación de biosíntesis saponinas triterpenas. Óxidoescualeno es convertido en derivados cíclicos que crean un carbocatión que se someten a muchos tipos de reacciones de ciclación. El tipo de ciclasa que se involucra en las reacciones de ciclación determina el esqueleto que se formará. Diferentes tipos de ciclasas han sido descritas y su mecanismo de acción está bien documentado; las más importantes son: dammarediol sintasa, β -amirina sintasa y α -amirina sintasa que resultan en diferentes tipos de saponinas (Lambert, Faizal, & Geelen, 2011). La ruta metabólica de biosíntesis de saponinas, incluyendo sus precursores, intermediarios y regulación se muestra en la Figura 3.

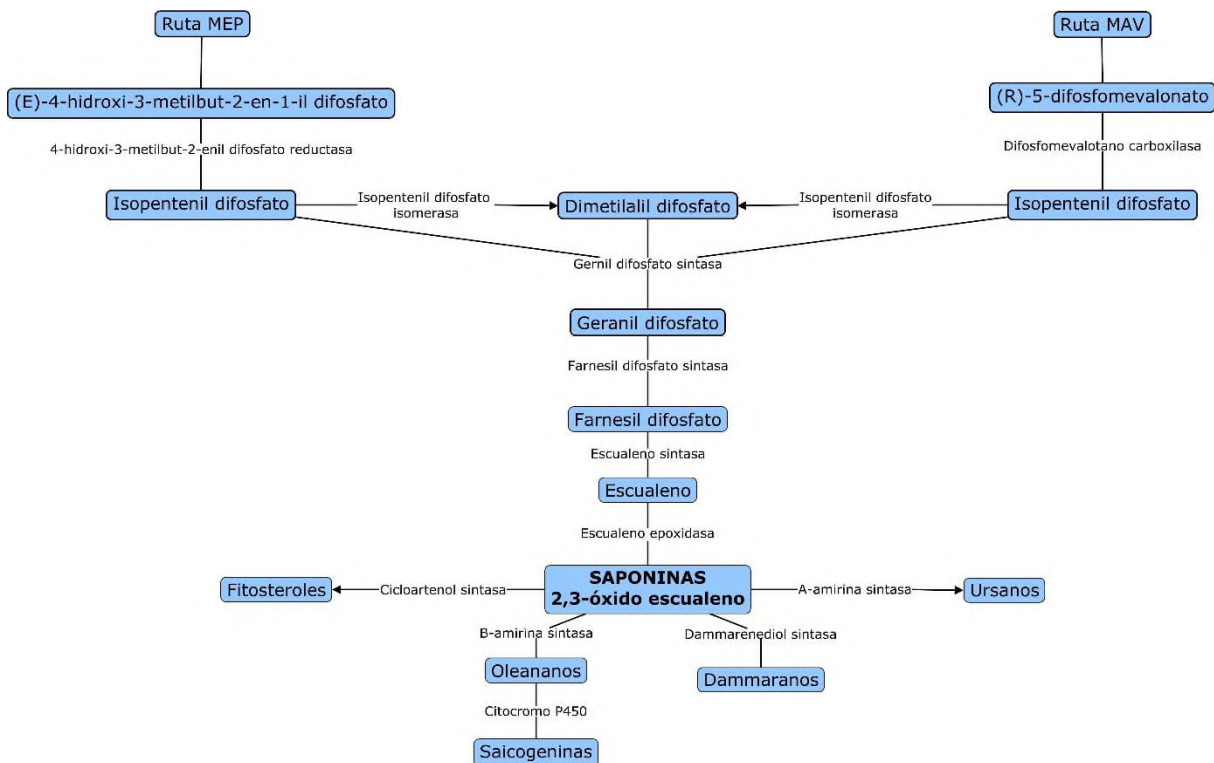


Figura 3. Ruta metabólica de biosíntesis de saponinas (Kim *et al*, 2011). La ruta del lado izquierdo es la ruta MEP y la ruta del lado derecho es la ruta MVA que biosintetizan saponinas. Las enzimas están como palabras de enlace entre las flechas, y los metabolitos resultantes se encuentran dentro de los cuadros grises.

2.4.3 Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides contribuyen en todos los aspectos de las respuestas de las plantas mediante estímulos bióticos y abióticos. Indican la respuesta de estrés de la planta y son mediadores de la resistencia de las plantas a patógenos. Los polímeros de fenilpropanoides contribuyen sustancialmente a la estabilidad y robustez de gimnospermas y angiospermas por daño mecánico o ambiental. La gran diversidad de fenilpropanoides se debe a la modificación y amplificación de un núcleo limitado de estructuras derivadas de la vía del shikimato, además del perfil que se desarrolla por la superfamilia de enzimas que participan en la ruta: oxigenasas, ligasas, oxidoreductasas y transferasas (Vogt, 2010).

Los fenilpropanoides se acumulan en todos los órganos y tejidos en diferentes etapas del desarrollo y dependen de las condiciones ambientales. Además de los múltiples roles en el desarrollo y adaptación de la planta al ambiente, estas moléculas son de mayor interés para la nutrición y salud humana, ya que contribuyen a la calidad organoléptica de los productos derivados de las plantas (Castrillón & Délano, 2016).

Los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina con un esqueleto C₆C₃ son los precursores de un amplio rango de productos naturales. En plantas, el primer paso de la ruta de biosíntesis es la formación del ácido *trans* cinámico debido a la eliminación del amonio de la cadena lateral. El ácido cinámico se forma a partir de L-fenilalanina y el ácido 4-cumárico (ácido p-cumárico) se forma a partir de L-tirosina o L-fenilalanina (Figura 4). En la mayoría de las plantas vasculares, L-fenilalanina es el sustrato preferencial, las monocotiledóneas pueden usar L-fenilalanina y L-tirosina. Todas las plantas parecen tener la habilidad de eliminar el amonio a través de L-fenilalanina amonio-liasa (PAL), pero la transformación de tirosina es más restringida, limitado principalmente para la familia de las *Graminae/Poaceae*. Otros ácidos cinámicos son obtenidos por hidroxilaciones y metilaciones adicionales, construyendo secuencialmente un patrón de sustitución típico de los metabolitos de la vía del shikimato. Algunos de los ácidos cinámicos más comunes son: el ácido 4-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico (Figura 4); los cuales se pueden encontrar de forma libre en las plantas y en formas esterificadas que dan lugar a diferentes familias de metabolitos de mayor complejidad que corresponden al grupo de fenilpropanoides (Dewick, 2002).

La biosíntesis de **lignan**os y **lignin**as está mediada por los ácidos cinámicos (Figura 4). Los polímeros de lignina son el material que da rigidez a la pared celular de las plantas, comportándose como matriz de las microfibras de celulosa, además de comprender un amplio reservorio de materiales aromáticos que son difíciles de aprovechar debido a como se encuentran agrupados. La lignina se forma por oxidación fenólica acoplada a monómeros de alcohol hidroxicinamil por enzimas peroxidasas. Los alcoholes son derivados de la reducción de ácidos cinámicos por ésteres de coenzimas A y aldehídos por patrones de sustitución que no son necesariamente elaborados en el paso de los ácidos cinámicos. Los ésteres de coenzima A y aldehídos pueden también ser sustratos para hidroxilaciones aromáticas y metilaciones. La formación de ésteres de coenzima A facilita el primer paso de reducción por

la introducción de un mejor grupo saliente por la reacción dependiente de NADPH. La reducción de aldehído a alcohol, que es el segundo paso de reducción, utiliza a una molécula adicional de NADPH y es reversible. La oxidación de un electrón del grupo fenol es llevada a cabo por la enzima peroxidasa, esta oxidación permite la deslocalización del electrón desapareado, causando formas resonantes en las cuales el electrón reside en la posición *orto* y *para* en función del oxígeno. Los **cinamaldehídos** son también derivados fenilpropenos y producto de reacciones de reducción (Dewick, 2002).

La hidroxilación de ácidos *orto* cinámicos de la cadena lateral es un paso crucial en la formación de un grupo de ácidos cinámicos derivados de lactona, las **cumarinas** (Figura 4). La oxidación del ácido 4-cumárico puede ocurrir de forma *orto* en la cadena lateral. Los ácidos hidroxicinámicos que luego sufren un cambio en la configuración de la cadena lateral de la forma *trans* a la forma menos estable *cis*. Mientras que la isomerización *trans-cis* podría ser desfavorable en el caso de un aislado simple de doble enlace, en los ácidos cinámicos la conjugación completa del sistema permite que este proceso ocurra con facilidad, y la irradiación con luz UV es suficiente para producir mezclas equilibradas que pueden separarse (Dewick 2002).

Los ácidos cinámicos, como los ésteres de coenzima A pueden funcionar también como unidades iniciales para extensiones de cadena con unidades de malonil-CoA, combinando elementos de la vía del shikimato y del acetato. Comúnmente tres unidades de C₂ son adicionadas vía malonato dando lugar a los flavonoides y estilbenos. El producto inicial es un policétido y dependiendo de la naturaleza de la enzima se puede plegar en dos diferentes maneras. La enzima estilbeno sintasa y chalcona sintasa acopla a una unidad de cinamoil CoA con tres unidades de malonil CoA dando **estilbenos**. Las chalconas son precursoras de un amplio rango de **flavonoides** y sus derivados (Dewick, 2002).

Los **isoflavonoides** forman una amplia subclase de compuestos flavonoides con variaciones estructurales, el anillo aromático derivado del shikimato ha migrado hacia el carbón adyacente del heterociclo. La oxidación de compuestos fenólicos, como los catecoles dan lugar a **quinonas**: orto-quinonas y quinoles. Las quinonas se pueden formar por sistemas fenólicos generados ya sea por vía del shikimato o del acetato, dando catecol o quinol (Dewick, 2002).

Todas las clases de compuestos fenilpropanoides no están presentes en todas las especies de plantas. Aunque los ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides son ubicuos en plantas superiores, los isoflavonoides y estilbenos están limitados a familias de plantas particulares (Dixon *et al*, 2002).

Los fenilpropanoides pueden jugar un papel importante como moléculas señal, tanto en el desarrollo y defensa de las plantas. También es posible que estos roles puedan sobreponerse, como modificaciones para mejorar la resistencia a enfermedades que puedan afectar el proceso de desarrollo. Los ejemplos bien sabidos del papel regulatorio de los fenilpropanoides incluyen las actividades dehidrodiconiferil glucósidos y flavonoides glucósidos como moduladores potenciales de la división celular, flavonoides como reguladores en el transporte de auxinas y el ácido salicílico como regulador en la activación de genes de defensa por inducción ante patógenos, por estallamiento oxidativo y por muerte celular inducida por patógenos (Dixon *et al*, 2002).

La ruta metabólica de la síntesis de fenilpropanoides (Figura 4) es bien comprendida y conservada entre plantas con semillas y se sintetizan en el citosol. Se ha propuesto que las enzimas que participan en la biosíntesis forman un complejo supermolecular (metabolon) por la interacción vía proteína y se une al retículo endoplásmico de la membrana (Grotewold, 2006; Winkel, 2004), secuestrando los intermediarios mediante piscinas citosólicas difusibles. Esto impacta fuertemente en el resultado de los intentos por incrementar o disminuir el nivel de un compuesto en particular mediante procesos transgénicos (Dixon *et al*, 2002).

Las enzimas que biosintetizan los fenilpropanoides pertenecen a varias familias, como 2-oxoglutarato dependiente dioxigenasas (OGD por sus siglas en inglés), citocromos P450 y glucosiltransferasas, las cuales sugieren que las plantas reclutan estas enzimas de rutas metabólicas preexistentes. El análisis filogenético indica que los genes que codifican estas enzimas con actividad idéntica o parecida se han separado antes de la especiación de las plantas de semillas (Tanaka & Brugliera, 2008).

Esta vía metabólica presenta algunos de los ejemplos mejores caracterizados de canalización metabólica en metabolismo de plantas. La canalización metabólica involucra la organización física de enzimas sucesivas en una vía metabólica en complejos a través de los cuales los

intermediarios de la vía son canalizados sin difusión en la mayor parte del citosol (Dixon *et al.*, 2002).

La ruta metabólica de fenilpropanoides sirve como un excelente sistema para desarrollar la comprensión de como manipular genéticamente la ruta en plantas, debido a la extensa información disponible respecto a los genes estructurales y regulatorios. Sin embargo, aún falta información importante sobre los puntos de control y sobre varias subdivisiones en la ruta.

2.4.3.1 Regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides

La enzima PAL comprende una familia de isoenzimas o complejos multi-enzimáticos que no requieren cofactor para actuar, se regula en sus niveles de expresión o en su actividad. La regulación en sus niveles de expresión se encuentra dada por la inducción genética, al aumentar su transcrito (ARNm) por estrés abiótico, lesiones, elicitores fúngicos, radiación UV y ataque por patógenos. La regulación de la actividad enzimática es a través del sistema ferredoxina-tioredoxina en los cloroplastos, siendo la luz el estímulo básico. La forma reducida de PAL es la forma activa, provocando su oxidación por la oscuridad e inactivando la enzima (Boudet, 2007).

La enzima C4H pertenece a la familia de las P450, y es altamente específica para la conversión de cinamato, y promotor de las regiones de genes C4H que contienen elementos putativos *cis*-activos conocidos de otros genes fenilpropanoides que apoyan una regulación transcripcional coordinada de los genes de la vía de fenilpropanoides. La regulación río abajo de C4H en plantas transgénicas y con mutaciones de C4H induce efectos pleiotrópicos en los patrones fenólicos, incluyendo la reducción de ácido clorogénico, flavonoides y ligninas. Lo anterior es de utilidad para apoyar a la idea de que C4H es un paso limitante para la canalización del flujo de carbono en la ruta de fenilpropanoides (Boudet, 2007).

La formación de ácido cafeico a partir del ácido p-cumárico está mediada por una enzima 3-hidroxilasa perteneciente a la familia de las citocromos P450, la cual no se ha caracterizado hasta la fecha, sin embargo, al expresarse de manera heteróloga en levadura, se encontró que

esta enzima es responsable del paso final en la biosíntesis de ácido clorogénico, un compuesto fenólico común en plantas (Boudet, 2007).

En general, la familia de las citocromos P450, son las principales responsables de la diversidad y flexibilidad del metabolismo fenólico, además de controlar el flujo metabólico en dos diferentes ramificaciones de la ruta metabólica (Boudet, 2007).

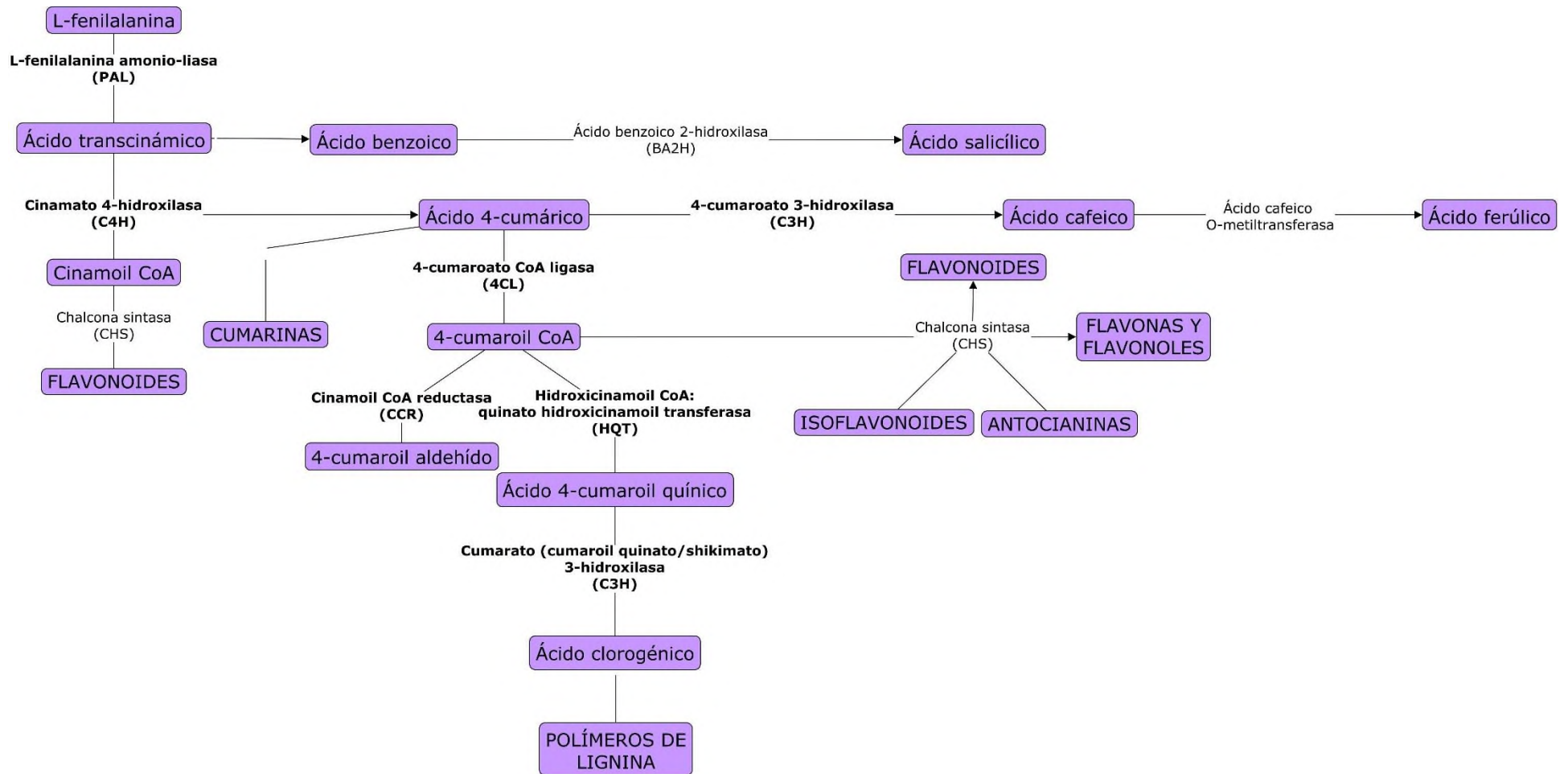


Figura 4. Ruta de biosíntesis de Fenilpropanoides (Dewick, 2002, Dixon *et al*, 2002, Kanehisa Laboratories, 2017). Las palabras de enlace representan a las enzimas de la ruta, las que se encuentran en negritas son consideradas las enzimas claves de la biosíntesis de fenoles simples. Los cuadros grises representan a los metabolitos obtenidos de la ruta. Las flechas con espacio entre ellas representan a pasos que llevan más de una reacción o una enzima desconocida.

2.5 Estudios de la expresión genética

El proceso por el que la información de un gen es usada en la síntesis de un producto funcional se denomina expresión genética, la cual incluye la activación del gen hasta que la proteína madura se localiza en el lugar adecuado y realiza su función (Hernandez, Vasallo, Torres, & Salido, 1994); y en el caso en el que los genes no codifican proteínas, el producto es un ARN (ácido ribonucleico) funcional: ARNm, ARNr y ARNt (ARN mensajero, ribosomal y de transferencia respectivamente). La regulación de actividades en los organismos vivos se debe a la activación e inactivación la expresión de genes proporcional al número de copias de ARNm de un gen determinado. Esto es determinante en la identificación de productos celulares específicos, ya que el ARNm es traducido en los ribosomas para formar proteínas, posibilitando obtener información acerca de la producción de elementos biológicos si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson, Hames, & Taylor, 2008).

La capacidad de detectar ARNm específicos es la base de los métodos de estudio de la expresión genética, en los cuales el Northern blot ha sido la técnica más utilizada para detectar moléculas de ARN. En la actualidad han surgido técnicas con mayor precisión para el estudio de la expresión genética como la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR por sus siglas en inglés), y técnicas de alta productividad como los chips de ADN (ácido desoxirribonucleico), y técnicas de secuenciación. Los métodos basados en la secuenciación masiva proporcionan enormes cantidades de datos y son muy útiles para estudios de transcriptómica comparada, mientras que la RT-qPCR es más específica y adecuada para el estudio de genes concretos (Hernandez *et al*, 1994).

2.5.1 PCR

La PCR es un método de análisis cuantitativo para cualquier secuencia de ADN amplificable que utiliza una videocámara para monitorear varias PCR a la vez detectando la acumulación de dobles cadenas de ADN en base al incremento de fluorescencia de bromuro de etidio, esta técnica se conoce como qPCR. La amplia capacidad de esta herramienta para detectar y medir mínimas cantidades de ácidos nucleicos en un amplio rango de muestras de diferentes orígenes la convierte en una herramienta excelente para las ciencias de la vida, agricultura,

medicina y el diagnóstico molecular (Bustin, 2000). Ésta última herramienta resulta muy útil para amplificar y cuantificar moléculas de ADNc (ADN complementario) específicas, obteniendo datos precisos y fiables sobre la expresión genética de las células en estudio (Heid *et al*, 1996). En la Tabla 5 se enlistan las principales ventajas y desventajas de esta técnica.

Tabla 5. Principales ventajas y desventajas de qPCR

Ventajas	Desventajas
El proceso completo se realiza en el termociclador	No aporta información sobre el tamaño de ARNm
Gran sensibilidad detectando bajos niveles de ADNc molde	Sensible a la estructura del ARNm
Cuantificación precisa	Menos capacidad de resolución que otros métodos
Amplio rango de cuantificación	Requiere información previa del transcrito
Procesamiento de elevado número de muestras en paralelo	Resultado afectado por error debido a Taq polimerasa
Rapidez	Cuantificación absoluta requiere trabajo complejo
Reproducibilidad	

2.5.2 Estudios de los niveles de expresión en plantas

Los estudios de los niveles de expresión realizados en diferentes especies se han llevado a cabo bajo diferentes condiciones: se insertaron los genes de las enzimas CHS y DFR en petunia, se observó un incremento en la expresión de los genes, pero no hubo efecto en la floración. En otro caso se observó la reducción de la floración y de la expresión de los genes, sugiriendo un fenómeno de silenciamiento génico (van der Krol *et al*, 1990).

En *Vitis vinifera* se evaluó el efecto de la luz en la germinación de semillas, siguiendo los niveles de expresión de las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de flavonoides y estilbenos: PAL, CHS, CHI (chalcona isomerasa), F3H (flavonona 3-hidroxilasa), DFR (dihidroflavonol 4-reductasa), LDOX (leucoantocianidina dioxigenasa) y UFGT (uridín

difosfato glucosa: flavonoide 3-O-glucosil transferasa); encontrándose que PAL y estilbeno sintasa se expresan de manera constitutiva, mientras que las otras enzimas se inducen por exposición a la luz (Sparvoli *et al*, 1994).

En *Arabidopsis thaliana* se evaluó el efecto de la activación de moléculas señal en la inducción de genes relacionados con la defensa de la planta ante patógenos. Las moléculas señal estudiadas fueron etileno y metil jasmonato, donde los resultados observados fueron que, al infectar al material vegetal, se activaron ambas moléculas señal, lo que no causa efecto en la expresión de genes de defensa, sin embargo, al tratar el material vegetal con estas moléculas se inhibió la expresión de los genes, lo que habla de un efecto de concomitancia y no de subsecuencia (Penninckx *et al*, 1998).

Se evaluaron los niveles de expresión de genes que codifican enzimas que biosintetizan alcaloides indol terpénicos en plántulas de *Catharanthus roseus*, analizando el efecto de estrés hídrico, luminoso y con elicitación con metil jasmonato y ácido acetilsalicílico. Los resultados mostraron que la regulación de esta ruta es llevada a cabo a nivel transcripcional, al haber diferencias en la cantidad de transcritos en cada condición experimental (Rocha & Leech, 2002).

En *Medicago truncatula* se logró el incremento de transcritos de que codifican para β -amirina sintasa con metil jasmonato, y se incrementó la cantidad de transcritos para PAL y CHS exponiendo los cultivos de células a levadura. En contraste, metil jasmonato provocó ligeros cambios en los niveles de fenilpropanoides y la levadura indujo débilmente los transcritos de β -amirina sintasa. Al evaluar estos cambios mediante microarreglos de ADN se confirma una reprogramación diferencial de las células cultivadas a nivel transcripcional en respuesta a los elicitores, e indica la respuesta diferencial de miembros individuales de la familia de genes (Suzuki *et al*, 2005).

Para *Solanum tuberosum* L. se evaluó la expresión de 13 genes involucrados en la biosíntesis de polifenoles, después de la exposición a sequía, lo que indujo cambios en la expresión de estos genes, resultando en diferentes perfiles metabólicos de acuerdo con la variación en la expresión de los genes, haciendo suponer que la regulación en la expresión de los genes es trascendental en la producción de polifenoles (antocianinas) (André *et al*, 2009).

Se investigó el papel regulatorio de escualeno sintasa en cultivo de raíces de *Bupleurum falcatum* L. en la biosíntesis de triterpenos y fitosteroles (saponinas) bajo el efecto de metil jasmonato, ácido abscísico, etefon y la transformación de las raíces con *Agrobacterium* para sobreexpresar escualeno sintasa. Los resultados obtenidos fueron que en la transformación genética se observó un incremento en la acumulación de ARNm de escualeno epoxidasa y cicloartenol sintasa, pero disminuyó los niveles de escualeno sintasa; caso contrario observado con metil jasmonato, que aumentó en gran medida la acumulación de ARNm de β -amirina sintasa y la producción de saikosaponinas, pero suprimió la producción de fitosteroles. Al elicitar las raíces transformadas con metil jasmonato no acumuló ARNm de β -amirina sintasa, aunque si promueve la producción de saikosaponinas y fitosteroles. Entonces la sobreexpresión de escualeno sintasa regula más fuertemente río abajo de la ruta de biosíntesis de saponinas, que la elicitación con metil jasonato (Kim *et al*, 2011).

Mangifera indica L. (mango ataulfo) fue evaluada en diferentes estados de madurez siguiendo la expresión de los genes y la actividad de las enzimas relacionadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: PAL y C3H. Se encontró que PAL se encuentra regulada río abajo, mientras que C3H se encuentra regulada río arriba de la ruta, esto se debe a que los niveles de expresión y la actividad de PAL fueron similares al inicio y al final del proceso de madurez, mientras que C3H mostró cambios en los niveles de expresión y en su actividad dependiendo de la madurez del fruto, sugiriéndose una regulación a nivel transcripcional para C3H (Palafox *et al*, 2014).

2.6 Cultivo *in vitro* vegetal

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* comprende el conjunto de técnicas aplicadas para obtener a partir de un explante, células, órganos o tejidos, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos. Ya que toda célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, sin importar la función o posición que tenga tiene la capacidad de regenerar una planta nueva completa, es decir, totipotencialidad. El proceso en el que una célula se transforma a una planta u órgano se denomina organogénesis (Calva & Pérez, 2005).

Partiendo de un explante de una planta madre, se obtiene descendencia uniforme con plantas genéticamente idénticas, por esto la micropropagación es una de las aplicaciones más usadas en el cultivo *in vitro*. Otras de las aplicaciones del cultivo *in vitro* depende del objetivo que se busque, pero en general estas aplicaciones pueden ser: estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; bioconversión y producción de compuestos útiles, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos y conservación e intercambio de germoplasma (Mroginski & Roca, 1991). En la Tabla 6 se enlistan las principales ventajas y desventajas de esta técnica.

Tabla 6. Ventajas y desventajas del cultivo *in vitro* vegetal (Ortiz & Aquino, 1998).

Ventajas	Desventajas
Permite sanar plantas con virus, mediante el cultivo de meristemas	Material químico empleado en preparación de medios es costoso y poco disponible
Facilita la propagación clonal masiva de plantas idénticas en corto tiempo	Requiere de implementación de infraestructura y equipos costosos
Permite la ampliación de la base genética de una especie	No es posible instalar laboratorios donde no se cuenta con fluido eléctrico o con interrupciones periódicas
Es posible propagar clones en cualquier época del año	Escasa literatura respecto al cultivo <i>in vitro</i>
El costo del mantenimiento del germoplasma en menor, en comparación con mantener las condiciones de campo	Requiere de personal de laboratorio especializado
Plántulas libres de plagas y enfermedades por condiciones asépticas de cultivo	
Permite realizar pruebas de resistencia a plántulas	

2.6.1 Reguladores de crecimiento vegetal

Las hormonas de crecimiento se definen como las sustancias que siendo producidas en una parte del organismo son transferidas a otra, influenciando un proceso fisiológico específico, sin embargo, los reguladores de crecimiento son aquellos compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Hurtado & Merino, 1987).

El crecimiento de las plantas está estrictamente controlado, esto incluye a los reguladores de crecimiento vegetal a nivel planta, órgano, tejido y célula, ya que la actividad fisiológica de las plantas es mediada por los reguladores de crecimiento, fungiendo como moléculas mensajeras que pueden influir en múltiples procesos, al mismo tiempo y en diferentes partes de la planta (Hurtado & Merino, 1987). Los reguladores de crecimiento conocidos son:

- Promotores del crecimiento
 - Auxinas: Son derivadas de triptófano que son ubicuas en plantas superiores, siendo la principal el ácido indol-3-acético (AIA). Regulan las proporciones del crecimiento diferencial y la regulación de fenómenos de diferenciación que se pueden estimular o inhibir dependiendo de la concentración de auxinas presentes. Los principales efectos provocados por las auxinas son: afectación del alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces, tejido calloso, respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical, embriogénesis, entre otros.
El mecanismo de acción de las auxinas consiste en incrementar el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad del agua, reduciendo la presión de la pared o aumentando la síntesis de ARN, proteínas específicas (enzimas), aumentando la pared, provocando aumento en la plasticidad de la pared celular, extendiéndola y aumentando su crecimiento por alargamiento (Hurtado & Merino, 1987).
 - Citocininas: son derivadas de adenina que pueden estimular la división celular o citocinesis, siendo la zeatina la citocinina natural más potente que está presente en plantas superiores e inferiores. Las raíces son posiblemente

la fuente principal de citocininas en las plantas. Las citocininas se encuentran difundidas en las plantas ya sea ligada al ARN o en forma libre. Los efectos conocidos consisten en la promoción de la división celular, inhiben el crecimiento de raíces con un posible control en el desarrollo del sistema vascular, inhiben elongación del tallo, estimulan el alargamiento de las hojas, retrasan la senescencia y conducen a la organogénesis en la dominancia apical. Las citocininas son necesarias en la mitosis, pero en concentraciones elevadas pueden limitarla (Hurtado & Merino, 1987).

- Giberelinas: formadas a partir de diterpenos, compuestos por cuatro unidades de isopreno. La primera giberelina purificada e identificada fue el ácido giberélico. Las giberelinas se han detectado en varias partes de las plantas, pero sobre todo en áreas de crecimiento activo, como embriones, tejidos en desarrollo o meristemáticos. Los efectos de las giberelinas corresponden a un papel regulatorio principal en el crecimiento, atribuible a la estimulación de la división y el alargamiento celular, además de afectar el desarrollo vegetal, como la maduración de los frutos, senescencia y dominancia de las yemas. Se ha sugerido que las giberelinas promueven la síntesis de auxinas a partir de su precursor, incrementando su producción y controlando los fenómenos provocados por éstas (Hurtado & Merino, 1987).
- Inhibidores del crecimiento
 - Ácido abscísico (ABA): formado a partir de terpenos. El ABA influye en la aclimatación de las plantas a condiciones de sequía, frío y salinidad, y en el desarrollo de la latencia e inhibición de la germinación de semillas, regula el balance de agua en plantas en condiciones de estrés: con el cierre estomático y con la manutención de absorción de agua por la raíz. La forma cis (+) de ABA presente naturalmente en plantas es sintetizada en casi todas las células que contienen plastidios (Flores & Aleixo, 2009).
- Etileno: promueve la maduración de los frutos y senescencia, induce la abscisión de las hojas, promueve el crecimiento lateral, la respuesta ambiental ante patógeno, heridas o estrés abiótico (Segretín, 2017).

- Poliaminas: son putrescina, espermidina, cadaverina; las cuales ejercen controles regulatorios en el crecimiento y desarrollo de las plantas, es decir división celular y en la diferenciación. Las plantas con una alteración genética en el contenido de poliaminas presentan alteraciones en el desarrollo (Universidad Nacional de La Plata, 2017).
- Jasmonatos: incluye al ácido jasmónico y al metil jasmonato. Éstos inhiben el crecimiento de las plantas y la germinación de las semillas, promueven la senescencia, la abscisión y la formación de tubérculos. Participan en los mecanismos de defensa de las plantas, induciendo la síntesis de inhibidores de peptidasas y de otras enzimas involucradas en la defensa. La aplicación exógena de metil jasmonato induce la producción de metabolitos secundarios en varias especies (Universidad Nacional de La Plata, 2017).
- Ácido salicílico: si se aplica de manera exógena induce la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis, incrementa la longevidad de las flores, inhibe la síntesis de etileno y la germinación de las semillas y revierte los efectos del ABA (Universidad Nacional de La Plata, 2017).

2.6.2 Medio de cultivo

El éxito de los cultivos vegetales *in vitro* depende en gran medida del medio de cultivo, además de emplear tejidos viables, incubación y la calidad de reactivos. Dependiendo del balance hormonal y otras condiciones de cultivo, se puede propiciar la regeneración de distintos órganos o formaciones vegetales según sea el objeto de estudio (Hurtado & Merino, 1987). La composición en general de los medios de cultivo se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición de medios de cultivo para cultivo vegetal *in vitro* (Segretín, 2017).

Componente	Características
Agua destilada	Representa el 95% del medio
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa, es necesario adicionarlo ya que el material vegetal no logra cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que realiza
Sustancias inorgánicas	Macroelementos y microelementos según sea la proporción para la planta a cultivar, o de acuerdo con el medio a emplear
Vitaminas	Pueden ser vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Reguladores de crecimiento	Auxinas, citocininas, giberelinas o etileno, según las necesidades del material vegetal a obtener
Sustancias poco definidas	Extracto de levadura, extractos vegetales
Material inerte	Es el material de soporte: agar, agarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena

2.6.3 Tipos de cultivo *in vitro* vegetal

2.6.3.1 Cultivo diferenciado

- Embriogénesis somática

Son embriones que no resultan de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical que no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar plantas normales. La embriogénesis somática se puede obtener directamente a partir de células aisladas o utilizando callos, pero se usan comúnmente cotiledones e hipocótilos para producir embriones somáticos. Para la iniciación de los callos se necesita un medio de cultivo con altas concentraciones de sacarosa o manitol, sales y la presencia de una auxina, que debe ser removida después

de la inducción para permitir el desarrollo de éste (Universidad Nacional de La Plata, 2017).

- Organogénesis: se forma un primordio unipolar a partir de una yema, que después se desarrolla en brotes vegetativos que forman raíz mediante la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden formarse directamente del explante o indirectamente a partir de callos. La organogénesis se logra desarrollar en un medio de cultivo óptimo en sales, compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento (Universidad Nacional de La Plata, 2017).

2.6.3.2 Cultivo indiferenciado

El cultivo indiferenciado se obtiene a partir de órganos o tejidos organizados, cultivados en un medio de cultivo apropiado que se desdiferencian mediante la adición de auxinas. En medio sólido se obtienen masas celulares compactas que constituyen los callos, mientras que en medio líquido se logran las suspensiones celulares formadas por células libres o agregadas. Los cultivos de células vegetales indiferenciadas muestran una gran variedad estructural, genética y metabólica con respecto a la planta madre (Universidad Nacional de La Plata, 2017).

- Callos

Los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo, debido fundamentalmente a la disponibilidad de los nutrientes. Consisten en masas celulares cuya morfología no presenta características que permiten seleccionar líneas de interés. Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio de cultivo fresco en períodos cortos, que dependen de la especie que se esté cultivando. La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de la especie, cantidad de reguladores de crecimiento, concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Universidad Nacional de La Plata, 2017).

- Células en suspensión

Para iniciar el cultivo de células en suspensión se parte de un callo friable, formado por células indiferenciadas y con baja cohesividad entre ellas. Si no se cuenta con este tipo de callos, es posible utilizar de otro tipo, sin embargo, es necesario romper los agregados celulares por medios mecánicos o enzimáticos. Los cultivos con

tamaños diferentes de callos es posible que su comportamiento sea equivocado por la diferencia de microambientes.

La cinética de crecimiento de las células en suspensión es similar a la microbiana, pero con etapas de crecimiento mayor. La fase de adaptación se lleva a cabo de entre 1 a 3 días, seguida de la etapa de rápido crecimiento donde la biomasa crece de manera constante debido al incremento en el tamaño y número de células, hasta que los nutrientes son limitados y el índice mitótico comienza a disminuir, llegando a ser nulo en la fase estacionaria. Al comienzo de la fase de crecimiento, la relación entre la biomasa y el número de células es menor, y cuando el tamaño de las células aumenta, la relación es mayor. El peso seco comienza a aumentar debido a la captación de agua (Universidad Nacional de La Plata, 2017).

Los tipos de cultivo *in vitro* vegetal descritos anteriormente se ilustran en la Figura 5.

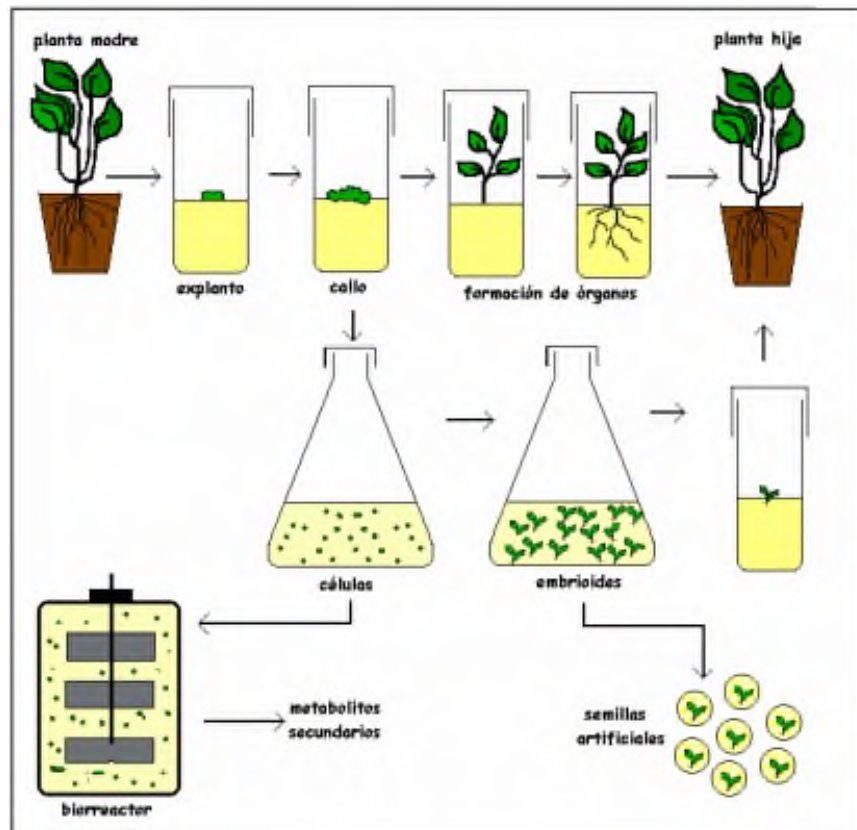


Figura 5. Tipos de cultivo *in vitro* vegetal obtenidos a partir de un explante, ejemplificando algunas aplicaciones (Segretín, 2017).

2.6.4 Cultivo *in vitro* de *Gomphrena globosa*

Los antecedentes del cultivo *in vitro* de *Gomphrena globosa* son escasos, aunque existen algunos reportes de cultivo *in vitro* de especies pertenecientes a la tribu *Gomphreneae*, en la Tabla 8 se muestran algunos de los reportes referentes al cultivo *in vitro* en *G. globosa* que pertenecen al equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, donde partieron de diferentes materiales para obtener plántulas y callos.

Tabla 8. Cultivo *in vitro* de *Gomphrena globosa*

Tipo de material	Tipo de cultivo	Medio de cultivo	Autor
Semilla	Plántulas	MS, sacarosa y fitagel	Méndez, 2017
Hipocótilos de plántulas <i>in vitro</i>	Callos friables	B5, sacarosa, 2,4-D, KIN	
Callos friables	Suspensiones celulares	B5, sacarosa, 2,4-D, KIN	
Semillas sintéticas a partir de hipocótilos	Plántulas	MS, sacarosa y fitagel	Cruz, 2018

2,4-D: 2,4-Diclorofenoxiacético **KIN:** quinetina **B5:** medio de cultivo Gamborg

Méndez en 2017 estableció cultivos de callos a partir de plántulas, y células en suspensión a partir de callos para producir compuestos fenólicos y betalaínas, obteniendo mayor producción de fenoles simples que betalaínas. El cultivo de plántulas *in vitro* y a partir de semillas sintéticas mostró diferencias en los perfiles de producción de metabolitos, ya que la producción de fenoles totales fue mayor en las plántulas de semillas sintéticas tanto en hoja, tallo y raíz, en comparación con las plántulas *in vitro*. En el caso de los flavonoides y betalaínas, la producción entre las plántulas *in vitro* y de semillas sintéticas fue similar en la raíz, pero mayor en el tallo y hojas de las plántulas de semillas sintéticas (Cruz, 2018).

2.7 Elicitación

El término elicitor hace referencia a químicos de varias fuentes, bióticos o abióticos, o factores físicos que puedan desencadenar una respuesta en un organismo que resulta en acumulación de metabolitos secundarios. Es por esto por lo que los elicitores son herramientas útiles para mejorar la producción de compuestos de alto valor en plantas (Vasconsuelo & Boland, 2007). Entonces a la inducción de la biosíntesis de metabolitos por exposición de los cultivos a moléculas capaces de causarle una situación de estrés se denomina elicitación.

2.7.1 Tipos de elicitor

Una clasificación en general de los tipos de elicitores se realiza de acuerdo con su origen y estructura molecular. Cada tipo de elicitor conforme a sus características puede inducir respuestas específicas que dependen de la interacción planta-elicitor. Los elicitores pueden ser bióticos o abióticos. Los elicitores bióticos tiene un origen biológico, derivado de patógenos o de las propias plantas (en ocasiones denominados elicitores endógenos). Los elicitores bióticos pueden ser de composición definida, con su estructura molecular conocida, o tener una composición molecular compleja cuando presentan diferentes clases de moléculas, haciendo imposible definirlos con una sola identidad química. Los elicitores abióticos no tienen un origen biológico y están agrupados en factores físicos y compuestos químicos (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005).

Los elicitores también se pueden agrupar de acuerdo a su interacción con la planta a elicitar: elicitores generales que pueden desencadenar una respuesta de defensa en plantas hospedadas y no hospedadas, y los elicitores específicos, los cuales inducen una respuesta que origina la resistencia a una enfermedad sólo en el cultivo huésped dependiendo de la presencia simultánea de genes de avirulencia y resistencia en la planta y el patógeno, respectivamente (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005). Un tipo de clasificación de elicitores se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Clasificación de elicitors de acuerdo con su naturaleza y composición molecular

Elicitor			
Biótico		Abiótico	
Composición definida	Composición compleja	Químico	Físico
Quitano	Hongo homogeneizado	Ortovanadato de sodio	Estrés térmico
Alginato	Extracto de levadura	Vanadil sulfato	Estrés osmótico
Pectina	Esporas de hongo	Sales de metales pesados	Irradiación UV
Quitina			Herida
Elicitina			
Fitohormona			

2.7.2 Factores que influyen en la elicitación

La efectividad de la elicitación como una herramienta para promover la producción de metabolitos secundarios depende del complejo de interacción célula de la planta-elicitor, lo cual se puede ver afectado por los siguientes factores (Vasconsuelo & Boland, 2007).

2.7.2.1 Especificidad del elicitor

Existe evidencia de que el mismo elicitor puede estimular el metabolismo secundario en diferentes cultivos de células o, por otro lado, un cierto tipo de cultivo responda a diversos elicitors. El tratamiento de un cultivo en particular con diferentes elicitors resultará en la acumulación de los mismos compuestos, dado que estos son específicos para cada cultivo de plantas. Aunque, la clase de metabolitos depende de la especie de la planta, la cinética de inducción o niveles de acumulación varían con elicitors diferentes (Vasconsuelo & Boland, 2007).

2.7.2.2 Concentración de elicitor e intervalo de tratamiento

La concentración del elicitor es uno de los factores que más fuerte afecta la intensidad de respuesta y la dosis efectiva, lo cual varía correspondiendo a la especie de la planta, sólo

puede encontrarse empíricamente. También se ha demostrado que los niveles del elicitor ejerce efectos estimulatorios en ciertos sistemas de plantas cuando aplicados a otros los desproveen de actividad, reflejando diferentes sensibilidades a los componentes moleculares involucrados en la elicitación (Vasconsuelo & Boland, 2007).

Hay escasa información sobre los intervalos del tratamiento con el elicitor. En términos generales, el elicitor está en contacto con el sistema hasta su cosecha, pero el tiempo requerido para la acumulación máxima del metabolito secundario es característico para cada especie de plantas y normalmente es precedido por un incremento en la actividad de las enzimas de la vía metabólica (Vasconsuelo & Boland, 2007).

2.7.2.3 Condiciones de cultivo: etapa de crecimiento, composición del medio y luz

El momento ideal para adicionar el elicitor es durante la fase exponencial del crecimiento, cuando la maquinaria enzimática está en el máximo estado operativo, la respuesta del elicitor en consecuencia se puede lograr con facilidad. Otro factor que afecta es la presencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, lo cual característicamente afecta la elicitación del metabolismo secundario. Asimismo, las condiciones de luz en el cultivo tienen un papel importante, ya que también puede estimular el metabolismo secundario (Vasconsuelo & Boland, 2007).

Las fitohormonas regulan diversas actividades biológica y bioquímicas; dentro de éstas se encuentran los jasmonatos que regulan el crecimiento vegetal y la división celular, habiendo un balance entre crecimiento y defensa (Dučaiová *et al*, 2016). Todos los procesos de crecimiento y control hormonal son influenciados por condiciones ambientales. La acumulación de metabolitos en plantas en ocasiones ocurre debido al estrés o moléculas señal y los jasmonatos son posibles moléculas señal en el proceso de elicitación induciendo la activación de genes involucrados en la formación de metabolitos secundarios (Kikowska *et al*, 2015).

2.7.3 Elicitación con metil jasmonato

El metil jasmonato y el ácido jasmónico (JA por sus siglas en inglés) se han observado como transductores de señal de elicitación para la producción de metabolitos secundarios. La aplicación exógena de moléculas señal de jasmonatos estimula la biosíntesis de metabolitos secundarios. La inducción de la acumulación de metabolitos secundarios en plantas por la señalización vía jasmonatos no está limitada a un solo tipo de metabolitos, pero incluye una amplia variedad de productos secundarios como terpenoides, flavonoides, alcaloides y fenilpropanoides, adicional a otros tipos de metabolitos secundarios en varias plantas. Por lo tanto, la vía señalización es generalmente considerada como una señal integral para la biosíntesis de muchos productos secundarios. Además, debido a que varios elicitors estimulan la biosíntesis de jasmonatos de manera endógena en plantas, la vía de señalización de jasmonatos es considerada como un transductor o mediador de la señalización del elicitor, liderando la acumulación de metabolitos secundarios en plantas (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005).

La aplicación exógena de jasmonatos inducen un subconjunto de genes biosintéticos de metabolitos secundarios, lo cual puede modular la expresión de genes y la acumulación de compuestos inducidos por elicitors (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005).

3. Justificación

Gomphrena globosa es una planta que ha sido utilizada tradicionalmente para el tratamiento de diversas afectaciones: fiebre, problemas del riñón y como expectorante. Presenta diversas actividades biológicas en sus extractos, como actividad antimicrobiana, citotóxica y anticancerígena. Los principales compuestos bioactivos encontrados en cultivos *in vitro* del equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan en *G. globosa* son los fenilpropanoides, específicamente fenoles simples. No obstante, las rutas metabólicas de estos compuestos, aunque se encuentran estructuradas en su mayoría o casi en su totalidad, la información relacionada con los niveles de expresión y regulación de las enzimas clave de estas rutas es escasa, abriendo un campo de investigación para esta planta.

La elicitación en los cultivos *in vitro* ha permitido aumentar la producción de metabolitos secundarios y los niveles de expresión de enzimas reguladoras, y esto se ha comprobado por el equipo de trabajo en cultivos de *Stevia rebaudiana*. Por lo anterior, resulta importante entender mejor los procesos de regulación biosintéticos en *G. globosa* a través de la investigación de los niveles de expresión de enzimas claves de la vía metabólica de fenilpropanoides, vía qPCR y bajo condiciones de estrés. Estos resultados abrirán espacio para acceder al potencial biotecnológico de esta planta.

4. Hipótesis

La producción de compuestos fenilpropanoides aumentará debido a la exposición con MeJA y será dependiente de su concentración.

Los genes propuestos como claves en la biosíntesis de fenilpropanoides podrán ser amplificados usando los oligonucleótidos diseñados por homología.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del metil jasmonato sobre la producción de fenilpropanoides en cultivos *in vitro* de *Gomphrena globosa* y estudiar *in silico* las enzimas clave de su biosíntesis.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar experimentos cinéticos de elicitación con MeJA en plántulas *in vitro* de *G. globosa*.
- Cuantificar y comparar los compuestos fenilpropanoides en las condiciones experimentales de elicitación y no elicitación.
- Analizar *in silico* la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides en plantas y proponer puntos claves dentro de la ruta.
- Diseñar oligonucleótidos para los genes de las enzimas claves y probar sus condiciones de amplificación por PCR.

6. Estrategia experimental

En la Figura 6 se muestra la estrategia experimental a seguir en esta investigación, cada bloque indica las etapas principales en el proceso de experimentación.

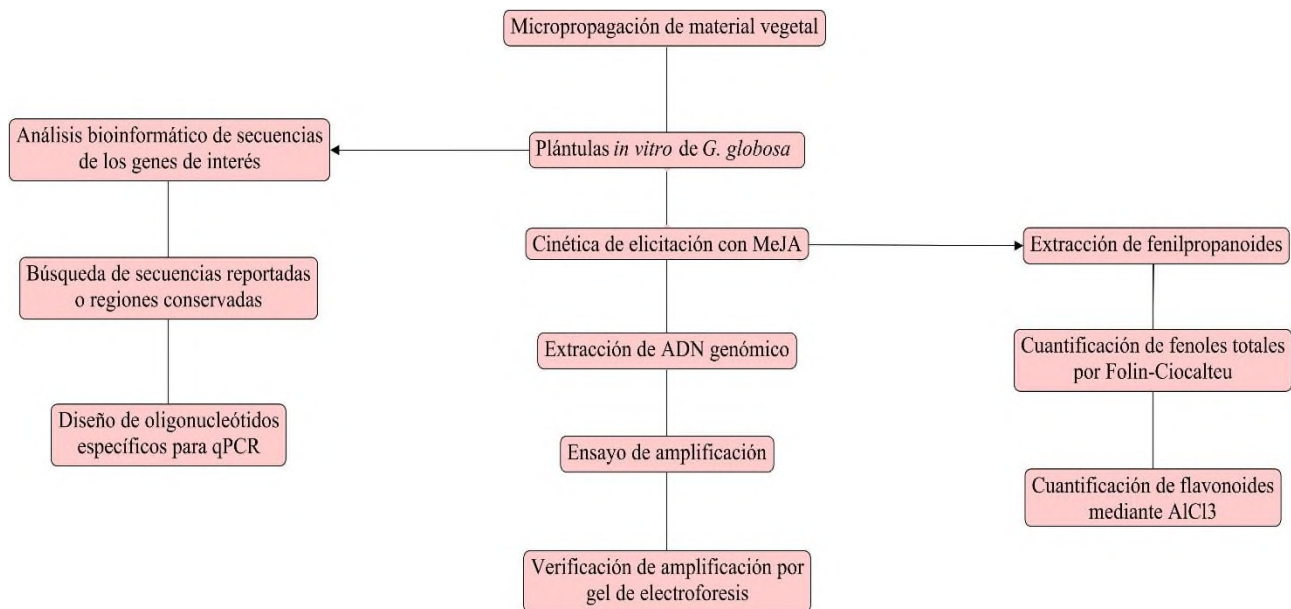


Figura 6. Estrategia experimental. Evaluación del efecto elicitor del MeJA sobre la producción de fenilpropanoides en plántulas *in vitro* de *G. globosa* y estudio *in silico* de enzimas claves en su síntesis.

7. Materiales y métodos

7.1 Propagación de cultivos de plántulas *in vitro* de *Gomphrena globosa*

Brotos de plántulas (ya establecidas por el grupo de trabajo) se utilizaron como explantes para el establecimiento de cultivos *in vitro* de *Gomphrena globosa*. Dichos explantes (3 explantes por frasco) se inocularon en medio semisólido de composición salina y orgánica Murashige & Skoog suplementado con vitaminas (Murashige & Skoog, 1962), con un pH de 5.8, suplementado con 30g/L de sacarosa y 1.8 g de fitagel. Se sometieron a un periodo de inducción de plántulas por 30 días bajo condiciones controladas de luz y temperatura ($25 \pm 2^\circ \text{C}$).

7.2 Selección de los genes de estudio y diseño de oligonucleótidos para su amplificación

A partir de una revisión bibliográfica se identificaron las enzimas que participan en la síntesis de fenilpropanoides (PAL, C4H, 4CL, C3H, CCR Y HQT). Las secuencias de los genes correspondientes y del gen control (actina) se obtuvieron en las bases de datos de GenBank y UniProt. Los registros de dichas secuencias se almacenaron y se categorizaron en una base de datos. Para cada registro se recopiló la secuencia de nucleótidos y proteína (dependiendo de su disponibilidad) y además la siguiente información: nombre del gen, número de acceso de GenBank, nombre de la proteína codificada, número de acceso de Uniprot, especie, conglomerado (si el gen pertenece a uno), longitud del gen y longitud de la proteína (Solano *et al*, 2007). En el caso de los que no se encontraron registros sobre las enzimas de interés o del gen control para *G. globosa*, se realizaron análisis de búsqueda de homología con secuencias homólogos u ortólogos en búsqueda de regiones hiper-conservadas alineando las secuencias mediante MEGA7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2017).

Se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada secuencia, y para el gen control de acuerdo con los siguientes parámetros: Temperatura de fusión, contenido de GC (aproximadamente 50%), longitud del oligonucleótido (18-20 pb), tamaño del producto de amplificación y formación de estructuras secundarias. El diseño se realizó manualmente y se validaron las secuencias utilizando como herramienta Oligoanalyzer.

7.3 Inducción de estrés en plántulas de *Gomphrena globosa*

Después de cuatro semanas de crecimiento de los cultivos de plántulas, se sometieron a elicitación con metil jasmonato (MeJA 25 y 50 μM de concentración final) (Montes Palmeros, 2017) por 3, 6, 12, 18 y 24 horas, adicionando dichas concentraciones al medio de cultivo presente y manteniendo las demás condiciones (luz y temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$).

Las plántulas se elicitaron aplicando en torundas de algodón, previamente esterilizadas, las concentraciones respectivas de MeJA. Las torundas de algodón se colocaron cerca de la pared interna del frasco contenedor, para asegurar que la volatilización del elicitor cubra todo el volumen de la parte aérea de las plántulas. La aplicación del elicitor se realizó con micropipetas que utilizaron puntas estériles, cuidando la esterilidad del medio.

El diseño de experimentos a utilizar consistió en un diseño factorial (Tabla 10) con dos factores: la concentración de MeJA con 3 niveles (control, 25 y 50 μM) y el tiempo de elicitación con 6 niveles (control, 3, 6, 12, 18 y 24 h), realizando la toma de muestras por cuadruplicado. Se evaluó el efecto del estrés respecto a las plantas sin elicitar añadiendo al medio de cultivo etanol 4.5 mM (concentración final) como control.

El material obtenido de la elicitación se separó en parte aérea (hoja y tallo) y raíz, y se colocaron en sobres de papel aluminio para almacenarlas en el congelador para la extracción de fenoles y flavonoides. Las plántulas se liofilizaron para determinar el peso seco y facilitar su molienda

Tabla 10. Diseño de experimentos de la cinética de elicitación con plántulas de *G. globosa*

Tiempo (h)	Concentración de MeJA (μM)		
	Control	25	50
0	0.1, 0.2, 0.3	-	-
3	3.1, 3.2, 3.3	3.4, 3.5, 3.6	3.7, 3.8, 3.9
6	6.1, 6.2, 6.3	6.4, 6.5, 6.6	6.7, 6.8, 6.9
12	12.1, 12.2, 12.3	12.4, 12.5, 12.6	12.7, 12.8, 12.9
18	18.1, 18.2, 18.3	18.4, 18.5, 18.6	18.7, 18.8, 18.9
24	24.1, 24.2, 24.3	24.4, 24.5, 24.6	24.7, 24.8, 24.9

7.4 Extracción de compuestos fenilpropanoides

La extracción se llevó a cabo utilizando biomasa de plántulas, separando la parte aérea de la raíz de *Gomphrena globosa* utilizando la metodología reportada por Silva y colaboradores en 2012, con una relación de 30 mg por cada 1.5 mL de agua destilada por 5 minutos, en baño de agua hirviendo. Las muestras se sonicaron por 30 minutos a temperatura ambiente bajo condiciones de oscuridad, seguida de una centrifugación a 1000 rpm con una temperatura de 4 °C durante 10 minutos. El pellet se desechó y el sobrenadante se liofilizó y almacenó a 4°C.

7.5 Cuantificación de compuestos fenilpropanoides

La cuantificación de compuestos fenilpropanoides se llevó a cabo mediante la técnica de Folin-Ciocalteu. Para calcular la cantidad de fenoles totales en las muestras se realizó una curva de calibración de ácido gálico en concentraciones de 0-1000 µg/mL, expresando los resultados en equivalentes de ácido gálico (EAG) por extracto seco (ES) y biomasa seca (BS). (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004). Las muestras de *G. globosa* se cuantificaron a partir de una concentración de 16 mg/mL de extracto seco, colocando en un tubo 150 µL de agua desionizada, 2.5 µL de muestra, y 10 µL de reactivo Folin-Ciocalteu dejándolo reposar 10 min, después se agregó 30 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20% (p/v), incubándolo a 37 °C por 15 min para después enfriar por 15 min en baño de hielo y leyendo su absorbancia a 750 nm por triplicado (Méndez, 2017).

Los flavonoides se calcularon a partir de una curva de calibración de quercetina en concentraciones de 0-150 µg/mL, expresando los resultados en equivalentes de quercetina (EQ) por extracto seco (ES) y biomasa seca (BS) (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004). Las muestras de *G. globosa* se cuantificaron a partir de una concentración de 16 mg/mL de extracto seco, colocando en un tubo 35 µL de muestra, 140 µL de agua desionizada reposando 6 min a temperatura ambiente, después se agregó 10.5 µL de nitrato de sodio (NaNO₃) al 5% y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente, después se adicionó 10.5 µL de cloruro de aluminio (AlCl₃) al 10%, 70 µL de hidróxido de sodio 1M (NaOH) y 84 µL de agua desionizada, reposando por 30 min a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 490 nm por triplicado (Cruz, 2018).

7.6 Extracción de ADN

Se utilizó el kit Direct PCR Master para la extracción de ADN a partir de tejido de *G. globosa*. Se preparó buffer de extracción de ADN 1X diluyendo el buffer 10X con agua grado PCR. Se colocó una alícuota de 50 μ L de buffer de extracción de ADN 1X en un tubo de 1.5 mL. Se tomó una pequeña pieza de tejido (aproximadamente 2-3 mm en diámetro). Se agregó el tejido en el tubo y se mezcló en el vortex brevemente, se incubó 3 min a temperatura ambiente para permitir la lisis del tejido y la liberación del ADN, finalmente se centrifugó 5 min a 10 000 rpm. El sobrenadante se almacenó a -20 °C para su posterior análisis (Jena Bioscience GmbH, 2018).

7.7 Ensayo de PCR

Para la amplificación se preparó un Master Mix de acuerdo a la Tabla 11, la muestra y los oligonucleótidos fueron los últimos componentes añadidos a la reacción. Las temperaturas de alineamiento (T_m) utilizadas en el programa de amplificación correspondieron a la T_m promedio del oligonucleótido directo y reverso de cada gen de las enzimas seleccionadas para su análisis, el gradiente de temperaturas utilizado se muestra en la Tabla 12, las temperaturas en negritas son las T_m promedio. Posteriormente las reacciones se incubaron en el termociclador Applied Biosystems modelo Veriti 96 Well Thermal Cycler (Tabla 13). Una vez terminado el programa las muestras se almacenaron a -20°C.

Tabla 11. Master Mix para ensayo de amplificación

Componentes	Concentración	Volumen (μ L)
Master PCR Direct	2X	10.0
Oligo directo	10 μ M	0.5
Oligo reverso	10 μ M	0.5
Muestra	50-250 ng	2.0
Agua grado PCR		7.0

Tabla 12. Gradiente de temperaturas para ensayo de amplificación

Gen	Temperaturas de alineamiento (°C)		
	56	58	60
PAL	56	58	60
C4H	52	54	56
4CL	56	58	60
CCR	56	58	60
HQT	56	58	60
C3H	52	54	56

Tabla 13. Programa de amplificación de oligonucleótidos

	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1X
Desnaturalización	95	20 s	
Alineamiento	Tabla 12	30 s	35X
Elongación	72	30 s	
Elongación final	72	2 min	1X

7.8 Electroforesis en gel de agarosa

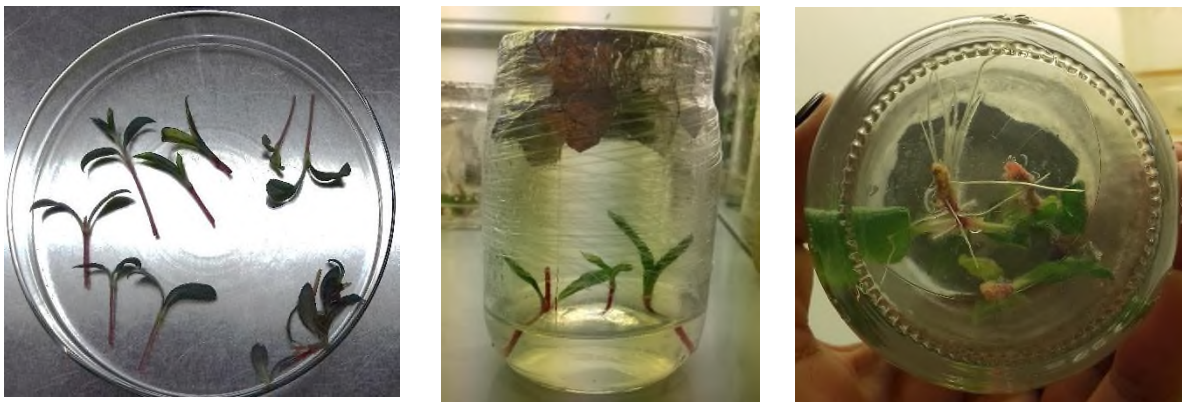
Para verificar la amplificación de los productos, se analizaron en gel de agarosa al 1.5 % aplicando un campo eléctrico de 130 v por 35 min. Después de terminado el campo eléctrico se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio al 1% por 2 min, después se enjuagó con agua destilada y se reveló en el fotodocumentador. Después se aplicó el campo eléctrico 5 min más y se reveló nuevamente en el fotodocumentador (Sambrook & Russell, 2001).

8. Resultados y discusión

8.1 Propagación de cultivos de plántulas *in vitro* de *Gomphrena globosa*

Se ha seguido un protocolo de micropropagación previamente establecido en el grupo de trabajo para la propagación de plántulas de *G. globosa*, sin la adición reguladores de crecimiento. Se han obtenido plántulas a través de la respuesta de organogénesis (hojas, tallos y raíces), libres de contaminantes como resultado del método de micropropagación (Figuras 7a, b y c). Esto con el fin de tener la biomasa suficiente para los experimentos de elicitación.

Las plántulas mostraron una generación de raíz entre los 3 a 7 días de micropropagación, dependiendo de la edad del explante inicial utilizado; esto demuestra la importante capacidad de regeneración de los explantes de *G. globosa* hasta formar un órgano diferente al utilizado para propagar. Las plántulas mostraron elongación del tallo, buen desarrollo foliar y en algunos casos la generación de más de un brote en el tallo, además de que las raíces generadas presentaron buena longitud. Lo anterior permitió que a partir de las 4 semanas después de la siembra de los explantes, ese material se utilizará para continuar propagando y realizar la cinética de elicitación con MeJA.



a)

b)

c)

Figura 7. Plántulas de *G. globosa* en medio Murahige & Skoog semisólido. Desarrollo de los explantes utilizados para la propagación en los primeros 7 días a partir de su siembra. **a)** explantes utilizados para la micropropagación, **b)** explantes con 5 días de crecimiento, **c)** explantes de 7 días de crecimiento.

Los segmentos nodales generalmente son explantes adecuados para la micropropagación de diversas especies vegetales, a través de la regeneración directa múltiple de brotes, por tener meristemas activos, además de que la fidelidad clonal puede mantenerse (Attaran *et al*, 2017).

La regeneración de plantas a partir de células individuales y explantes es un proceso clave en la manipulación genética y el estudio de la expresión genética. Para lograr esto, es necesaria una fuente de células y tejidos genéticamente homogéneos. Los cultivos micropropagados son una fuente ideal de células y tejidos homogéneos y son útiles para la propagación de plantas que resultan de experimentos de variación genética (Attaran *et al*, 2017).

La propagación a partir de explantes nodales ha sido reportada con una alta tasa de éxito por autores como Anis y colaboradores en 2003, donde obtuvieron un 80% de emergencia de brotes en medio MS suplementado con BAP (6-benzilaminopurina por sus siglas en inglés), NAA (ácido naftalenacético por sus siglas en inglés), aspargina y glutamina y 80% de enraizamiento de los brotes cultivados en medio MS suplementado con NAA en cultivos *in vitro* de *Morus alba* L. A partir de segmentos nodales de *Terminalia bellirica* cultivados en medio MS suplementado con BAP, kinetina e IAA (ácido indolacético por sus siglas en inglés) se logró la mejor multiplicación de brotes, y para el mejor enraizamiento se utilizó medio con la mitad de la concentración de medio MS suplementado con IBA (ácido indolbutírico con sus siglas en inglés) (Phulwaria *et al*, 2012). Los segmentos nodales utilizados para micropropagación utilizados por Shekhawat y colaboradores en 2015 mostraron la mejor multiplicación utilizando medio MS con BAP y cinetina, y la mitad de la concentración de medio MS suplementado con IBA fueron las mejores condiciones de enraizamiento reportadas por estos autores.

A diferencia del protocolo utilizado en este trabajo, para la propagación de *G. globosa*, Shekhawat y colaboradores en 2015, requirieron una mezcla de fitohormonas en el medio para regenerar plántulas a partir de los explantes utilizados. Aunque sus trabajos se llevaron hasta la aclimatación de las plántulas obtenidas, y el objetivo de la propagación que aquí se empleó fue obtener el material suficiente para los experimentos de elicitación; es importante recalcar que los explantes de *G. globosa* no requirieron fitohormonas para generar plántulas, el medio MS suplementado con vitaminas otorgó las condiciones suficientes para tal sistema. Esto resulta de gran beneficio para la actual investigación ya que la aplicación de reguladores

de crecimiento en los medios de cultivo genera cambios a nivel metabólico que puedan interferir en los experimentos de elicitación.

8.2 Cinética de elicitación con MeJA en plántulas de *Gomphrena globosa*

Después de transcurrido el tiempo de elicitación, las plántulas de las unidades experimentales utilizadas, no mostraron diferencias fisiológicas respecto a los controles, ni daño en sus tejidos (Figura 8), esto es similar a lo reportado por González en 2017 y Montes en 2017, donde evaluaron el efecto del MeJA a concentraciones de 25, 50 y 100 μM durante 24, 72 y 120 h en cultivos de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana*, al no encontrar cambios fisiológicos aparentes a las 24 h de exposición con MeJA a sus diferentes concentraciones.

Otros autores también reportan resultados similares al nuestro, tal es el caso de Moreno y colaboradores en 2009, quienes evaluaron la modulación ecológica de la defensa de plantas vía control de citocromos por sensibilidad a jasmonatos en *Arabidopsis*, encontrando que a las concentraciones de MeJA a las que fueron expuestas plantas transformadas y no transformadas (50 y 450 μM) al exponerse por 5 segundos por inmersión, no se observó inhibición del crecimiento, pero si indujeron respuestas en la producción de fenoles y en la expresión de genes de defensa.

Las unidades experimentales de dicho análisis constaron de los frascos que contenían 3 explantes cada uno (48 unidades experimentales en este análisis).



Figura 8. Cinética de elicitación con MeJA en plántulas de *G. globosa*. La imagen muestra el material elicitado desde las 3 hasta las 24h que duró el experimento. **a)** Corresponde al control sin elicitar, **b)** frasco elicitado con MeJA 25 μ M y **c)** corresponde al frasco elicitado con MeJA 50 μ M.

8.3 Cuantificación de fenoles totales y flavonoides de las muestras elicidadas

El MeJA ha sido ampliamente utilizado para inducir la producción de metabolitos secundarios, sobre todo de compuestos que protejan al sistema del estrés oxidativo, como los fenoles. La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo como se describió en el capítulo 7.9. Los perfiles de acumulación de fenoles totales (Figura 9a, 9b y Figura 10a, 10b) y flavonoides en parte aérea (Figura 11a, 11b) se describen a continuación.

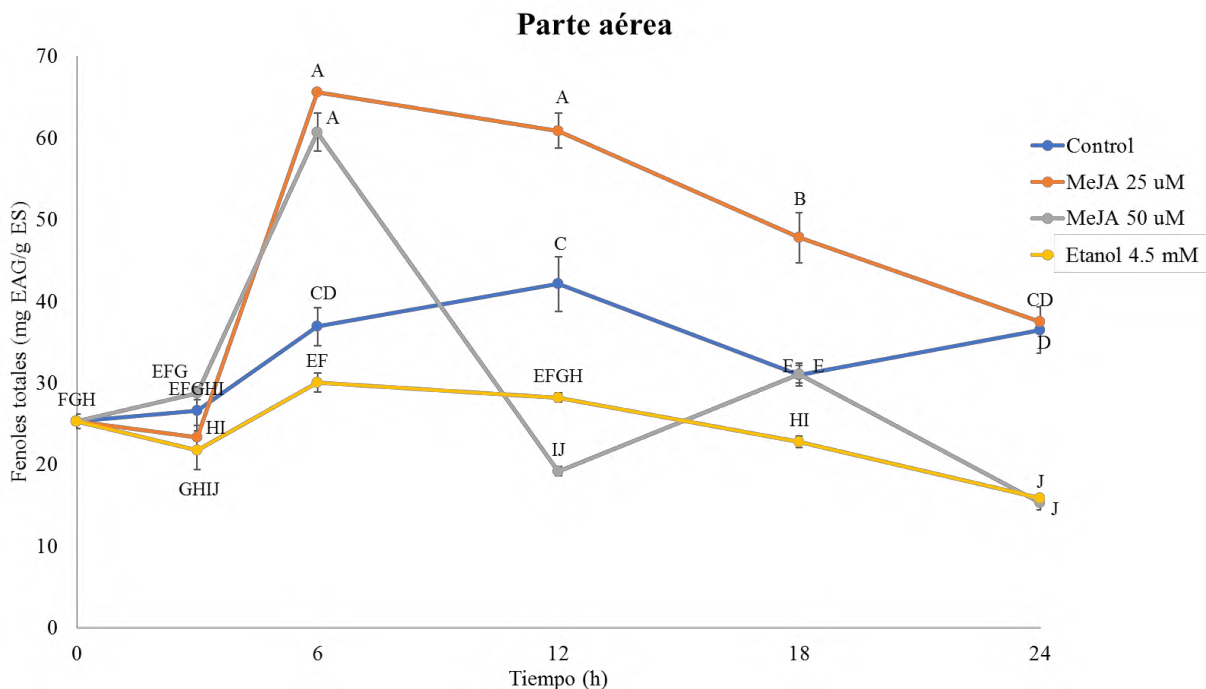


Figura 9a. Producción de fenoles totales en parte aérea de *G. globosa* durante 24 h de exposición al elicitor. Las letras diferentes indican las familias de significancia determinadas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La elicitación por 3 h con MeJA 25 y 50 μM no tuvo efecto significativo en la producción de fenoles totales, al compararse con el control sin elicitar. La acumulación de fenoles totales en la parte aérea en el presente trabajo se favoreció al exponerse con MeJA 25 μM , puesto que a las 6 h se incrementaron los fenoles totales 2.59 veces (65.58 mg EAG/g ES) comparado con lo obtenido al inicio del experimento (25.277 mg EAG/g ES) y 1.78 veces comparado al control a las 6 h (36.902 mg EAG/g ES) después de exponerse con el elicitor (Figura 10a). En la exposición con MeJA 25 μM a las 12 h (60.902 mg EAG/g ES) y con MeJA 50 μM a las 6 h (60.694 mg EAG/g ES), se observó el mismo efecto, puesto que se

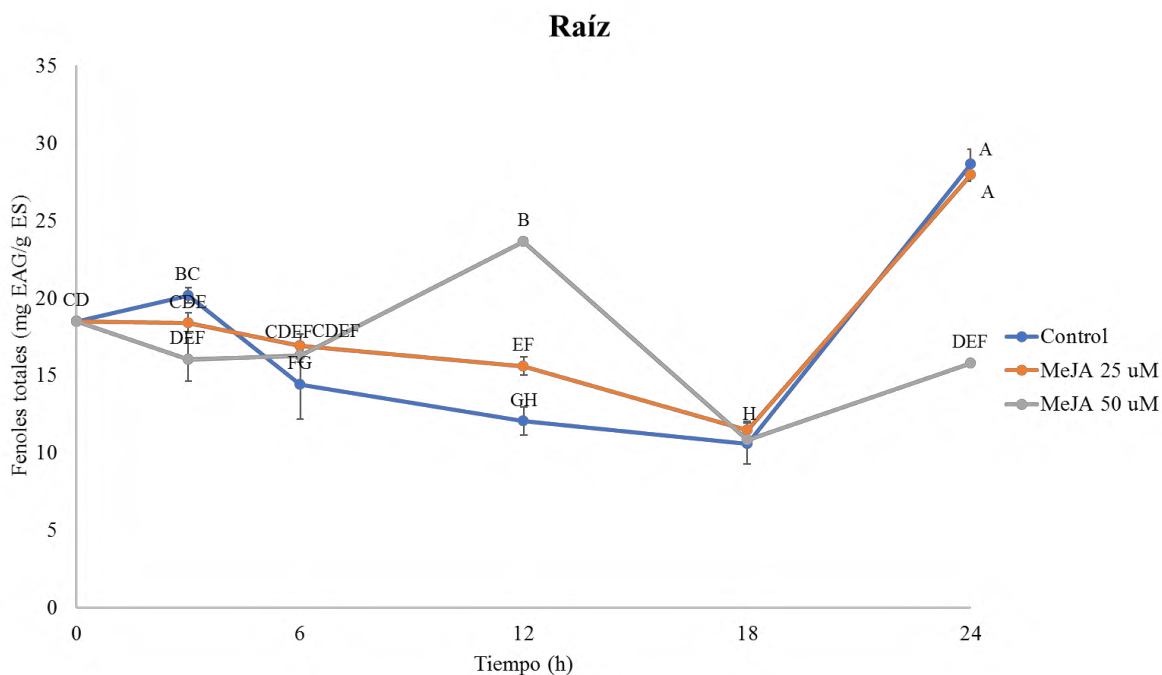
alcanzó un incremento de 1.44 veces más respecto al inicio del experimento y 1.64 veces más respecto al control a las 6 y 12 h (42.131 mg EAG/g ES) de exposición con el elicitor.

Aunque el análisis múltiple de medias (Tukey, $p < 0.05$) muestra que la mayor producción de fenoles totales fue a las 6 y 12 h transcurridas del experimento, después de 18 h de la elicitación con MeJA 25 μM (47.798 mg EAG/g ES), se logró incrementar 1.54 veces más fenoles totales respecto al control a las 18 h (30.985 mg EAG/g ES). Esto se encuentra dentro del rango obtenido en la mayor producción de fenoles totales (MeJA 25 μM por 6 y 12 h, MeJA 50 μM por 6h). La exposición por 24 h con MeJA 50 μM no incrementó la cantidad de fenoles totales, al tener la misma cantidad que el control a las 24 h. La aplicación de MeJA 25 μM por 24 h (37.485 mg EAG/g ES) no ejerció efecto significativo, al tener la misma cantidad de fenoles totales que el control a las 24 h (36.465 mg EAG/g ES), 50 μM de MeJA resultó en la inducción de la menor cantidad de fenoles totales en el experimento (15.277 mg EAG/g ES).

Al compararse las muestras elicidadas con el control de solvente (etanol 4.5 mM) se presentó un incremento de 1.07 veces más con MeJA 25 μM y 1.32 veces más con MeJA 50 μM a las 3 h de exposición. También se observó el mayor aumento a las 24 h (15.902 mg EAG/g ES) de elicitación con MeJA 25 μM (2.36 veces más), y a las 6 h (30.048 mg EAG/g ES) con MeJA 50 μM (2.02 veces). Transcurridas las 12 h del experimento (28.173 mg EAG/g ES), el MeJA 25 μM logró incrementar 2.16 veces respecto al control con etanol, mientras que MeJA 50 μM no incrementó la cantidad de fenoles totales al ser comparado con el control con etanol. El efecto observado a las 18 h (22.756 mg EAG/g ES), corresponde al incremento de 2.10 y 1.36 veces con MeJA 25 y 50 μM respectivamente, sin embargo, con MeJA 50 μM la cantidad de fenoles totales fue similar al control.

En resultados obtenidos de las muestras de raíz (Figura 11a), cabe mencionarse que la cantidad de biomasa obtenida fue suficiente sólo para la determinación de fenoles totales. La elicitación por 3h con MeJA 25 y 50 μM no incrementó la cantidad de fenoles totales. Después de 6 h de exposición con MeJA 50 μM se pudo incrementar 1.13 veces la cantidad de fenoles totales, y 1.64 veces a las 12 h después de iniciado el experimento. Con MeJA 25 μM se logró un incremento de 1.18 veces a las 6 h respecto al control sin elicitar, 1.30 veces respecto al control sin elicitar a las 12 h, a las 18 y 24 h no se observaron diferencias

significativas entre las muestras elicidadas y el control, al igual que a las 18 h de elicitación con MeJA 50 μM . Se observó también que con MeJA 50 μM en 24 h no se incrementó la cantidad de fenoles totales respecto al control, incluso fue menor que el control. La máxima producción de fenoles totales se dio a las 24 h del control sin elicitar y con MeJA 25 μM .

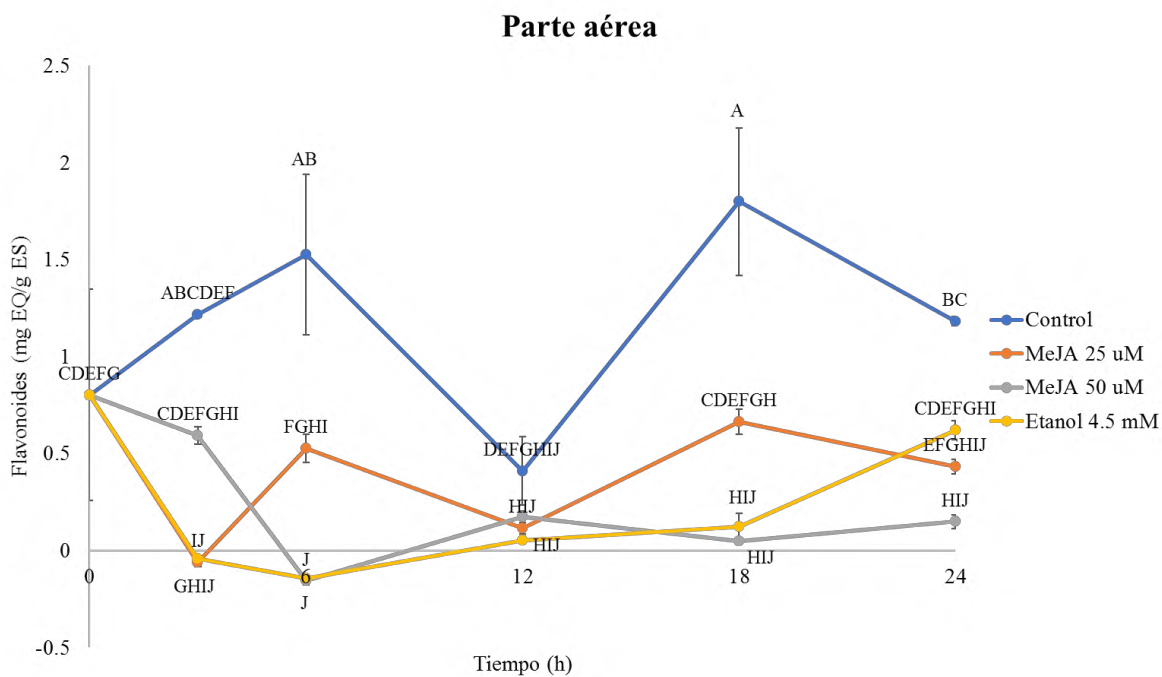


ES Extracto seco **EAG** Equivalentes de Ácido Gálico

Figura 10a. Producción de fenoles totales en raíz de *G. globosa* durante 24 h de exposición al elicitor. Las letras diferentes indican las familias de significancia determinadas por la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La producción de flavonoides en la parte aérea no se favoreció por la elicitación con MeJA 25 y 50 μM (Figura 12a) al compararse con las muestras sin elicitar, no obstante, al ser comparadas con el control solvente (etanol 4.5 mM), se observó un incremento de 3.67 veces más a partir de las 6 h de exposición con MeJA 25 μM (0.528 mg EQ/g ES), ya que la elicitación por 3 h con MeJA 25 μM no ejerció efecto en la cantidad de flavonoides, pero con MeJA 50 μM se logró un incremento de 14.51 veces a las 3 h de elicitación (0.595 mg EQ/g ES). Se logró también incrementar 2.15 veces más a las 12 h con MeJA 25 μM (0.114 mg EQ/g ES) y 3.30 veces con MeJA 50 μM (0.175 mg EQ/g ES), en cambio a las 18 h con MeJA 25 μM se logró un incremento de 5.49 veces más de flavonoides (0.664 mg EQ/g ES),

sin alcanzar un incremento a las 24 h con MeJA 25 μ M, ni con MeJA 50 μ M a las 6, 18 y 24 h de exposición con dicho elicitor.



EQ equivalentes de Quercetina

Figura 11a. Producción de flavonoides en parte aérea de *G. globosa* durante 24 h de exposición al elicitor.

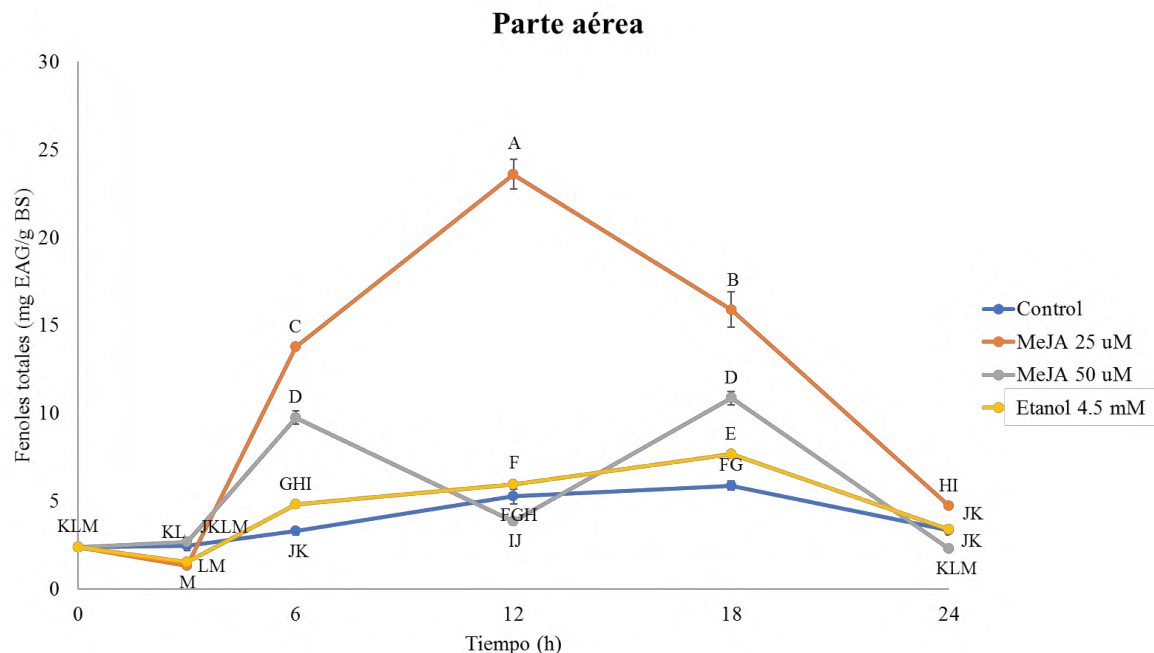


Figura 9b. Producción de fenoles totales en parte aérea de *G. globosa* durante 24 h de exposición al elicitor

Al analizar los resultados del experimento de elicitación con relación a biomasa seca, la mejor producción de fenoles totales en parte aérea (Figura 10b) se dio a las 12 h de exposición con MeJA 25 μ M (23.594 mg EAG/g BS), donde se incrementó 4.49 veces más respecto al control sin elicitar, seguido de un incremento de 2.71 veces más a las 18 h de elicitación (15.900 mg EAG/g BS), a las 6 h con MeJA 25 μ M se incrementó 4.20 veces, a las 18 h con MeJA 50 μ M se incrementó 1.85 veces la cantidad de fenoles (10.854 mg EAG/g BS). Aunque estadísticamente la cantidad de fenoles totales a las 6 y 18 h con MeJA 50 μ M fue similar, a las 6 h se presentó el mayor incremento (2.97 veces, 9.740 mg EAG/g BS). Después de 24 h de elicitación con MeJA 25 μ M se incrementó 1.41 veces el contenido de fenoles totales (4.704 mg EAG/g BS) y a las 3 h de elicitación con MeJA 50 μ M se incrementó 1.09 veces los fenoles totales (2.671 mg EAG/g BS), mientras que con MeJA 25 μ M a las 3 y MeJA 50 μ M a las 12 y 24 h no hubo diferencias significativas en el contenido de fenoles totales al compararse con el control sin elicitar.

El contenido de fenoles totales al compararse con el control solvente (etanol 4.5 mM) se produjo un incremento de 1.75 veces a las 3 h con MeJA 50 μ M, 2.87 veces a las 6 h con MeJA 25 μ M y 2.03 veces con MeJA 50 μ M. Después de 12 h se logró un incremento de

3.96 veces con MeJA 25 μM , sin embargo, con MeJA 50 μM no hubo algún aumento. La elicitación con MeJA 25 μM después de 18 h incrementó 2.08 veces el contenido de fenoles totales, y con MeJA 50 μM se incrementó 1.05 veces; y al final del experimento (24 h) se incrementó 1.37 veces con MeJA 25 μM , mientras que con MeJA 50 μM no se incrementó el contenido de fenoles totales.

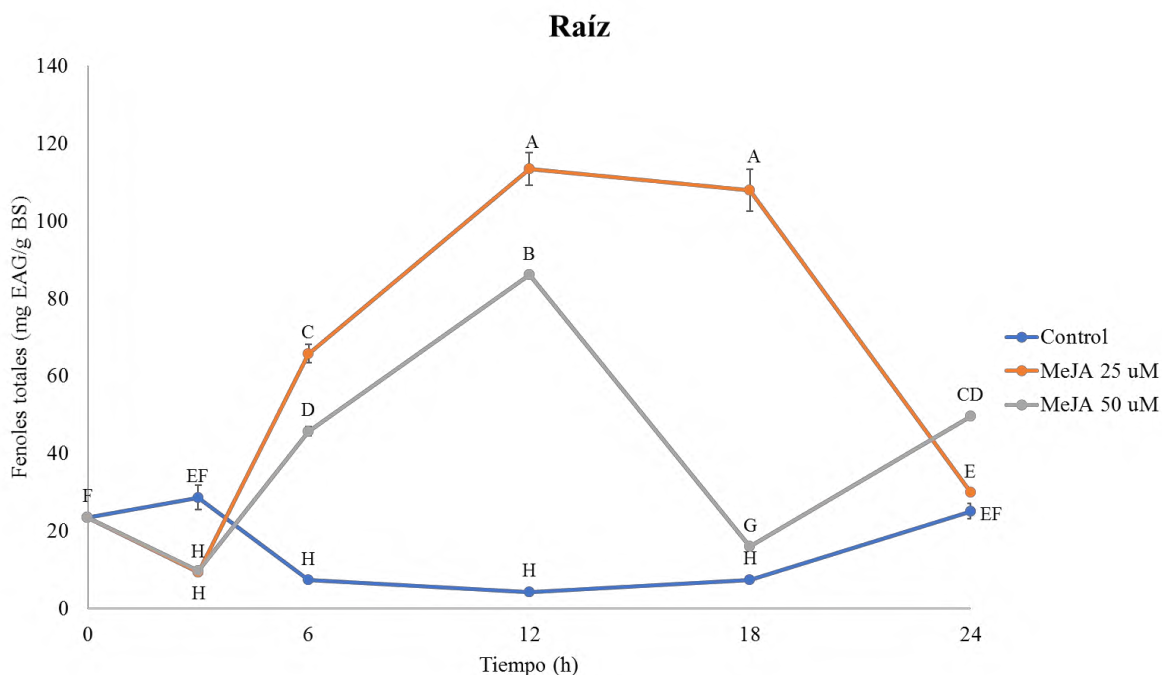


Figura 10b. Producción de fenoles totales en raíz de *G. globosa* durante 24 h de exposición al elicitor.

El mayor contenido de fenoles totales en raíz (Figura 11b) se presentó a las 12 y 18 h posteriores a la exposición con MeJA 25 μM con un incremento de 27.40 veces (113.379 mg EAG/g BS) y 14.84 veces (107.902 mg EAG/g BS) respectivamente. Con MeJA 50 μM , después de 12 h se logró un incremento de 20.79 veces (86.008 mg EAG/g BS), con MeJA 50 μM (45.690 mg EAG/g BS), 2.18 veces después de 18 h, y 1.98 veces con MeJA 50 μM a las 24 h (49.562 mg EAG/g BS). La exposición con MeJA 25 μM a las 3 y 24 h, y con MeJA 50 μM a las 3 h, no ejerció efecto significativo en el contenido de fenoles totales.

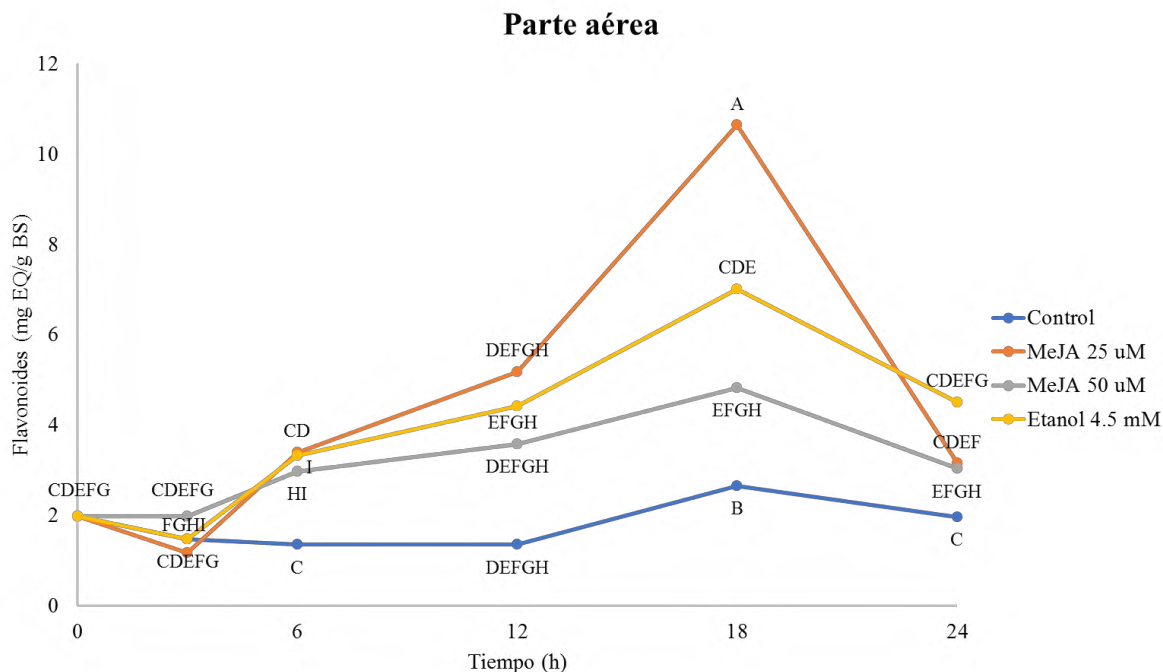


Figura 11b. Producción de flavonoides en parta aérea de *G. globosa* en 24 h de exposición al elicitor.

Se incrementó 2.53 veces el contenido de flavonoides (Figura 12b) a partir de las 6 h de elicitación con MeJA 25 μ M (3.394 mg EQ/g BS) y con MeJA 50 μ M 2.21 veces (2.971 mg EQ/g BS) respecto al control sin elicitar; a las 12 h con MeJA 25 μ M se incrementó 3.85 veces (5.176 mg EQ/g BS), y con MeJA 50 μ M 2.67 veces (3.581 mg EQ/g BS). Después de 18 h de elicitación se observó la mayor cantidad de flavonoides (10.638 mg EQ/g BS) con MeJA 25 μ M, logrando un incremento de 4.02 veces, y con MeJA 50 μ M 1.82 veces (4.816 mg EQ/g BS); mientras que al final del experimento se incrementó 1.61 veces (3.146 mg EQ/g BS) con MeJA 25 μ M y 1.55 veces con MeJA 50 μ M (3.026 mg EQ/g BS).

Es posible que las respuestas descritas anteriormente se deban a que el MeJA funja como molécula señal y active la síntesis de genes involucrados en el metabolismo secundario (Zhao, Davis, & Verpoorte, 2005), además de la probable generación de ROS (especies reactivas de oxígeno por sus siglas en inglés), ya que este mecanismo ha sido detallado y comprobado por diversos autores (Ali *et al*, 2005; Dučaiová *et al*, 2016) y por ende resulte en la acumulación de metabolitos secundarios del tipo antioxidante (fenoles).

En términos generales, la producción de flavonoides fue baja, incluso en las muestras elicidadas, esto tal vez esté relacionado con la edad del material (4 semanas), ya que en nuestro equipo de trabajo se ha reportado la presencia de cantidades similares de flavonoides en material de 3 meses (Cruz, 2018). Otra posible causa, es el tiempo de exposición al elicitor no haya sido suficiente para llegar a estimular la producción de flavonoides significativamente, puesto que otros autores han evaluado el efecto del MeJA en tiempos que van desde 3 hasta 21 días, logrando aumentos considerables respecto a sus controles (Ali *et al*, 2007: Pérez *et al*, 2011: Ali *et al*, 2015: Dučaiová *et al*, 2016: Attaran *et al*, 2017), no obstante debe mencionarse que el tiempo de exposición de este estudio está definido principalmente para detectar cambios en los niveles de expresión de las enzimas mencionadas anteriormente, que normalmente no exceden las 72 h de exposición.

Contrastando los resultados con los obtenidos previamente en el equipo de trabajo, Aguilar en 2018 reportó 21.92 mg EAG/g E.S. y 0.072 mg EQ/g E. S., de fenoles totales y flavonoides respectivamente en extracto acuoso de la parte aérea de plantas silvestres de *G. globosa*. Respecto a los resultados en cultivos *in vitro*, Méndez en 2017 obtuvo la máxima cantidad de 23.53 mg EAG/g E. S., de fenoles totales en callos, 8.72 mg EAG/g E. S., en células en matraz y 5.95 mg EAG/g E. S., en células en reactor. Cruz en 2018 al cuantificar fenoles totales obtuvo 6.18 mg EAG/g E. S., para raíces de plántulas *in vitro* y 8.29 mg EAG/g E. S., para raíces de plántulas a partir de semillas sintéticas de 3 meses. La parte aérea reportada por Cruz en 2018 presentó un contenido de 29.25 mg EAG/g E. S. en plántulas *in vitro* y 46.58 mg EAG/g E. S. en plántulas a partir de semillas sintéticas, ambas de 3 meses. Relacionado a flavonoides, Cruz reporta 0.14 mg EQ/g E. S. en raíces de plántulas *in vitro* y 0.17 mg EQ/g E. S. en raíces de plántulas de semillas sintéticas. La parte aérea contuvo 0.94 mg EQ/g E. S. en plántulas *in vitro* y 1.61 mg EQ/g E. S.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Montes en 2017, siendo MeJA 25 μ M, su mejor concentración de elicitor, logrando un incremento desde 1.54 veces hasta 2.44 veces desde las 6 h hasta las 120 h de exposición, en cultivos de plántulas *in vitro* de *S. rebaudiana*.

Otros autores que también han evaluado el efecto del MeJA como elicitor de compuestos fenólicos y han reportado resultados similares a lo obtenido en este trabajo, mostrando su máxima obtención de metabolitos de acuerdo con las siguientes condiciones. Ali y

colaboradores en 2007 elicitaron con MeJA 200 μM , raíces de *Panax ginseng* en medio líquido en reactor tipo *airlift*, encontrando que al día 9 se logró aumentar 1.6 veces más fenoles totales y 6.4 veces más de flavonoides respecto al control sin elicitor, estos resultados son similares a lo que se logró en el presente trabajo con MeJA 25 μM a las 6 h (1.78 veces más respecto al control sin elicitor, 2.36 veces más que el control con etanol 4.5 mM) en la acumulación de fenoles totales. Este efecto fue relacionado con el estrés oxidativo generado por el elicitor ya que, en la mayor acumulación de fenoles y flavonoides, se ve una reducción en la acumulación de H_2O_2 y grupos carbonilo en presencia del elicitor, además de que se incrementó la actividad de enzimas que participan en la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides. Al elicitar brotes de *Salvia officinalis* en medio líquido, se logró aumentar 1.6 veces más fenoles totales con MeJA 50 y 100 μM al día 5 respecto al control con etanol al 96% (Grzegorzczak & Wysokinska, 2009). Comprando estos resultados con lo logrado en este trabajo, la máxima producción de fenoles totales con MeJA 50 μM se observó a las 6 h posteriores a la exposición con el elicitor, puesto que se incrementó 1.44 veces más respecto al control sin elicitar y 2.16 veces más que el control con etanol 4.5 mM. Ellos mencionan que usando concentraciones micromolares de MeJA inducen cambios en la expresión de genes, y que el tiempo requerido para alcanzar el máximo nivel en la expresión de genes es diferente para cada ruta biosintética e incluso para cada compuesto (aunque esto no fue evaluado). Además de que el efecto negativo en el crecimiento de los brotes de *S. officinalis* se observó hasta el día 5 con MeJA 20 μM .

Por otro lado, brotes de *Brassica oleracea* en estado silvestre, elicitados con 10 μM de MeJA al día 7, lograron incrementar 1.23 veces más fenoles totales y 1.31 veces más de flavonoides respecto al control con etanol al 0.04%, según Pérez y colaboradores en 2011. Estos resultados son menores que lo que se obtuvo con MeJA 25 μM en apenas las 6 h transcurridas después de iniciado el experimento de este trabajo (1.78 veces más respecto al control sin elicitor y 2.18 veces más respecto al control con etanol 4.5 mM).

El tratamiento con MeJA induce la actividad de PAL, que es una enzima clave regulatoria del metabolismo de fenilpropanoides, y esto a su vez favorecería la expresión de genes de la biosíntesis de fenoles y provocando la acumulación de estos compuestos (Pérez *et al*, 2011). Krzyzanowska y colaboradores en 2012 al elicitar células en suspensión de *Mentha piperita*

con 100 μM por 24 h después de la aspersión, se lograron incrementar 1.81 veces más de ácido rosmarínico (derivado del ácido cafeico) respecto al control (etanol al 96%) al inicio de experimento, y 1.44 veces más respecto al control a las 24 h. La concentración más alta de elicitor utilizada en nuestro trabajo fue MeJA 50 μM , y el mayor incremento de fenoles totales se logró a las 6 h después de aplicarse el elicitor (1.64 veces más que el control sin elicitor, 2.02 veces más que el control con etanol 4.5 mM). Las células en suspensión de *Vitis vinífera* elicidadas con 20 mM de MeJA a las 48 h obtuvo un incremento de 1.4 veces más fenoles totales respecto al control sin elicitar, según lo reportado por Sák y colaboradores en 2014, lo cual es un poco menor al incremento logrado con MeJA 25 μM a las 6, 12 y 18 h, y con MeJA 50 μM a las 6 h después de aplicado el elicitor en el presente estudio.

La producción de fenoles esenciales puede depender del genotipo del material, sin embargo, la síntesis de estos compuestos se correlaciona con la respuesta a diferentes factores ambientales bióticos y abióticos. Los tejidos y células vegetales cultivados *in vitro* son más afectados por los elicitores y pueden responder más sensiblemente (Sák *et al*, 2014). En otro experimento, los brotes en medio líquido de *Exacum affine* elicitados con 100 μM de MeJA en combinación con fenilalanina al día 3, Skrzypczak y colaboradores en 2014 muestran que se logró un incremento de 1.6 veces más de fenoles totales respecto al control con etanol al 0.1%. Comparando esto con lo obtenido en nuestro estudio, se encuentran por debajo de lo obtenido por MeJA 50 μM , que fue nuestra concentración más alta de elicitor, en medio MS sólo suplementado con vitaminas. Estos autores concluyen que se consiguió un efecto benéfico por la adición simultánea del elicitor y el precursor, pero no sólo estos factores pueden influenciar la acumulación de ácidos fenólicos, sino también el estrés osmótico, tipo de medio de cultivo, reguladores de crecimiento y el modo de iluminación. Ali y colaboradores en 2015 reportaron que elicitando células en suspensión de *Artemisia absinthium* con 90 mM de MeJA reportan un incremento en el día 21 de 1.27 veces más fenoles totales y 1.39 veces más de flavonoides respecto al control sin elicitor. Aunque en el presente estudio no se logró incrementar la cantidad de flavonoides, con las dos concentraciones de MeJA entre las 6 y 12 h de exposición, se logró incrementar la cantidad de fenoles totales en mayor proporción que lo que reporta Ali y colaboradores en 2015. Estos autores sugieren que en bajas concentraciones de MeJA tienen un efecto promotor en la acumulación de flavonoides y fenoles comparado con el control, además de no observar

variaciones significativas entre el contenido de fenoles y flavonoides con la actividad antioxidante.

Al elicitar con MeJA 100 μ M por 48 h brotes de *Eryngium planum* en medio líquido, Kikowska y colaboradores en 2015 señalan que se logró incrementar 4.51 veces más fenoles totales respecto al control con etanol al 96%, lo cual es mucho mayor en comparación con lo obtenido en este trabajo en las 24 h que duró la cinética de elicitación. El mecanismo de inducción de elicitors bióticos o abióticos es por lo general activando la expresión de genes relacionados con la defensa, y los resultados de los autores indican que metabolitos específicos pueden ser modulados por la adición de un elicitor para estabilizar el cultivo de brotes, además de que el estrés osmótico creado por el contenido de sacarosa demostró que puede regular la producción de ácidos fenólicos.

Dučaiová y colaboradores en 2016 indican que las plántulas silvestres de *Matricaria chamomilla* elicidadas con 0.4 mM de MeJA por aspersión, transcurridas 48 h después de la aplicación se observó el incremento de 3.0 veces más fenoles totales y 1.9 veces más de flavonoides después de 24 h de la aspersión respecto al control asperjado con agua. El tipo de material utilizado en el presente estudio difiere del utilizado por Dučaiová *et al*, 2016, además de que la concentración del elicitor es mucho a mayor a la que se empleó en este trabajo, es por lo que es posible que el incremento alcanzado en fenoles totales haya sido mayor que lo alcanzado en nuestro estudio. En los diferentes tiempos posteriores a la aspersión en los que fue evaluado el efecto del MeJA, se incrementaron los niveles de las especies reactivas de oxígeno, encontrando los niveles máximos a las 24 y 48 h posteriores a la aspersión, consecuentemente el estrés oxidativo resulta en una fuerte acumulación de metabolitos antioxidantes como los fenoles (Dučaiová *et al*, 2016).

En 2017 Attaran y colaboradores señalan que al elicitar brotes en medio líquido de *Salvia virgata* con 100 μ M de MeJA al día 3, se obtuvo un incremento de 2.07 veces más fenoles totales y 1.46 veces más de flavonoides respecto al control con etanol al 96%. Estos incrementos corresponden a lo alcanzado en nuestro estudio después de exponer por 6 h con MeJA 25 μ M plántulas de *G. globosa*. De acuerdo con Attaran y colaboradores en 2017, las diferentes concentraciones de MeJA cambian la expresión de genes de enzimas clave en la vía metabólica de fenilpropanoides y derivados de tirosina; el tiempo requerido para alcanzar

el máximo nivel de la expresión de genes es diferente para cada ruta, incluso para cada compuesto.

8.4 Selección de genes de estudio

Después de la revisión bibliográfica sobre la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides, se determinó que las enzimas a seguir en sus niveles de expresión son fenilalanina amonio-liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (C4H), 4-cumaroato CoA ligasa (4CL), 4-cumaroato 3-hidroxilasa (C3H), como pasos limitantes para la síntesis de fenoles simples y precursores de flavonoides; cinamoil CoA reductasa (CCR) e hidroxicinamoil CoA: quinato hidroxicinamoil transferasa (HQT), como puntos de bifurcación en la producción de flavonoides (Dewick, 2002, Dixon *et al*, 2002, Kanehisa Laboratories, 2017). En la Tabla 14 se muestran los numeros de clasificación de las enzimas seleccionadas.

Tabla 14. Números de acceso a la información disponible de las enzimas de la ruta de fenilpropanoides

Enzima	No. de clasificación en BRENDA	No. de secuencias encontradas en GeneBank
PAL	4.3.1.24	12
C4H	1.14.13.11	7
4CL	6.2.1.12	12
C3H	1.14.13.36	1
CCR	1.2.1.44	10
HQT	2.3.1.133, 2.3.1.99	4

Debido a que no se encontró información acerca de las enzimas seleccionadas en nuestra planta de estudio, se hizo la búsqueda de secuencias de nucleótidos de las enzimas, en otras especies, a partir de lo obtenido por el número de clasificación en BRENDA, donde se reportaron diferentes especies en dónde ya se han obtenido las secuencias para dichas enzimas.

8.5 Diseño de oligonucleótidos para su amplificación

Al no encontrarse secuencias de nucleótidos reportadas para *Gomphrena globosa* de las enzimas seleccionadas ni para el gen control (actina), se hizo el alineamiento de secuencias de nucleótidos reportadas para otras especies de plantas utilizando el software MEGA7, en la Figura 7 se muestra un ejemplo de alineamiento con las secuencias de alta identidad típicamente seleccionadas para la enzima HQT (Kumar, Stecher, & Tamura, 2017). Una vez obtenidos los resultados de los alineamientos, se seleccionaron regiones de alta identidad de manera continua en el alineamiento de las secuencias para diseñar de manera manual los oligonucleótidos, con una longitud de entre 18-24 nucleótidos tanto para el sentido reverso como el directo.

Los oligonucleótidos seleccionados se ingresaron en Oligoanalyzer para validarlos y conocer los parámetros de las secuencias (%GC, Tm y formación de estructuras secundarias). Para hacer la selección final de los oligonucleótidos directo y reverso, se consideraron que entre las Tm hubiera una diferencia máxima de 5 °C, y un contenido de GC entre 40-60%. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16.

En el caso del gen de actina, el diseño de oligos se realizó a partir del alineamiento realizado en MEGA7 con secuencias de diferentes especies vegetales (Tabla 16), al no existir secuencias reportadas para el gen de actina en *Gomphrena globosa*. Mediante la herramienta bioinformática OligoAnalyzer, se validaron los oligonucleótidos diseñados y se seleccionaron los que se ajustaran a los parámetros de diseño anteriormente descritos.

Tabla 15. Números de acceso a las secuencias disponibles para el gen de actina

Número de acceso a GenBank	Especie vegetal
AF548026	<i>Stevia rebaudiana</i>
AF061018	<i>Scherffelia dubia</i>
X16280	<i>Oryza sativa</i>
AB047313	<i>Oryza sativa Japonica</i>
AF061019	<i>Coleochaete scutata</i>
HQ844002	<i>Celosia argéntea</i>
HQ656028	<i>Beta vulgaris</i>
AY074873	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AY093784	

Tabla 16. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de enzimas de la ruta de fenilpropanoides.

Gen	Oligonucleótidos 5' – 3'		Parámetros						
	Directo	Reverso	Longitud nucleótidos		Tm °C		%GC		F. E. S. E
PAL	TACATGGTGGTAACTTCCAAGG GA	ATCTTGGTTGTGTTGCTCTGCAC	24	23	57.7	58.2	45.8	47.8	NO
C4H	ATGACGGTCCCTTTCTTCAC	GTTGTCCTCGTTGATCTCTC	20	20	54.7	52.6	50	50	NO
4CL	CAAGTCGACGGTGAAAACCCCA AT	CTCTGTCATACCGTAACCCTGT	24	22	59.8	56	50	50	NO
C3H*	GGGTTGAAACTTGGAGCTTC	GACGAAATGATGCTTGACACC	20	21	54	54.3	50	47.6	NO
CCR	GAATTGGTACTGCTACGGGAAG	GGTAGGGATGGGGTACTC	22	18	55.4	53.7	50	51.1	NO
HQT	TGGAACCTCGAATCTTGACCTGG	CAGAGAAACCCCGCCACAGTTG AA	22	24	56.7	59.9	50	57.1	NO
Actina	CCT GCT ATG TAT GTC GCC AT	CAC CTT GAT CTT CAT GCT GC	20	20	54.7	54.1	50	50	NO

F. E. S. E. Formación de Estructuras Secundarias Estables

*Tomado de Palafox, *et al*, 2014

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	Group Name		
1. GQ847546.1_Lonicera_japonica_h		T T T C A A G T G T G G G G G A G T G T C T C T G G G A G T T G G G G T G C A T C A C A C	
2. DQ915589.1_Cynara_scolymus_hy		C T T C A A C T G T G G C G G G G T T T C T C T C G G G T G T G G C C T G C A C C A T A C	
3. DQ104740.1_Cynara_cardunculus_		T T T T A A A T G T G G T G G G G T C T C A C T G G G A G T T G G G A T G C A A C A T C A	
4. DQ915590.1_Cynara_cardunculus_		C T T C A A C T G T G G C G G G G T T T C T C T C G G G T G T G G C C T G C A C C A T A C	

Figura 12. Resultado del alineamiento de secuencias en MEGA7 para la enzima HQT.

Los oligonucleótidos diseñados y validados cumplen con los parámetros de diseño que se establecieron en la metodología, tal y como se muestra en la Tabla 16. En el caso particular de la enzima C3H, no se obtuvo información referente sobre secuencias de nucleótidos con el número de clasificación de BRENDA, sin embargo, Palafox, y colaboradores, en 2014 midieron niveles de expresión para esta enzima y reportan los oligonucleótidos utilizados para el experimento.

8.6 Pruebas de amplificación sobre ADN genómico

Se realizó un experimento de validación de los oligonucleótidos diseñados puesto que no habían sido utilizados para la amplificación y además fijar los parámetros que se emplearán en amplificaciones cuantitativas y semicuantitativas. Para tal experimento, se llevó a cabo el barrido de temperaturas para investigar que amplificaran en las T_m calculadas, verificando la amplificación en geles de agarosa como se describió en el capítulo 7.8.

De los 7 pares de oligonucleótidos diseñados y probados, sólo amplificaron 2 pares (C3H y HQT) con las condiciones establecidas en el capítulo 7.8, obteniendo bandas de entre 50 y 150 pb (Figura 13). Se esperaban fragmentos específicos de 150 pb de acuerdo al diseño usando como templado cDNA, pero dado que la amplificación se realizó sobre ADN genómico los fragmentos podían cambiar en tamaño.

Hasta el momento, los experimentos de validación de amplificación podrían considerarse iniciales y todavía deben hacerse ajustes a la cantidad de templado usado y probablemente investigar otros intervalos de temperaturas de alineamiento para descartar por completo la utilidad de los oligonucleótidos en próximos experimentos de medición de expresión génica antes de pensar en rediseño de los mismos; no obstante el escrutinio inicial de condiciones de amplificación dejó dos juegos de oligonucleótidos que amplifican de manera específica. Cabe recordar, que la mayoría de los oligonucleótidos reportados tuvieron que ser diseñados

por homología con secuencias reportadas en otras especies dado que no están reportadas aún para *G. globosa* específicamente.

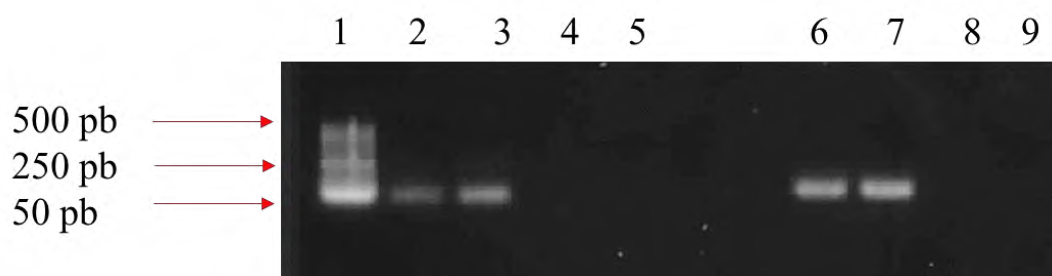


Figura 13. Gel de agarosa de amplificadores de oligonucleótidos en ADN. **1.** Marcador de peso molecular, **2.** HQT 58 °C, **3.** HQT 56 °C, **4.** Control s/ADN s/oligos, **5.** Control c/ADN s/oligos, **6.** C3H 56 °C, **7.** C3H 54 °C, **8.** Control s/ADN s/oligos, **9.** Control c/ADN s/oligos.

9. Conclusiones

Se comprobó un efecto positivo en la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides por la elicitación con MeJA en plántulas *in vitro* de *G. globosa*, sobre todo con la concentración más baja usada en el experimento: MeJA 25 μ M.

La elicitación con MeJA no tuvo efecto sobre el desarrollo fisiológico del material en el tiempo que duró el experimento con las concentraciones evaluadas.

Las condiciones de elicitación encontradas en este estudio podrían ser utilizadas en futuros experimentos de producción de compuestos fenólicos y flavonoides con actividad biológica.

Las condiciones de amplificación para cada juego de oligonucleótidos diseñados no permitieron corroborar su funcionamiento, bajo las condiciones probadas en este estudio, salvo en los casos de los juegos que amplificaban el fragmento de C3H y HQT.

10. Perspectivas

- Identificar y cuantificar los compuestos fenilpropanoides en las condiciones de elicitación y no elicitación por HPLC.
- Identificar y cuantificar betalaínas en las condiciones de elicitación y no elicitación.
- Evaluar la capacidad antioxidante en las condiciones de elicitación y no elicitación.
- Obtener secuencias específicas para *G. globosa* para realizar estudios de expresión de los genes propuestos en este estudio involucrados en la síntesis de fenilpropanoides.
- Evaluar la actividad enzimática de las enzimas seleccionadas como clave en la biosíntesis de fenilpropanoides.
- Correlacionar los niveles de expresión, acumulación de metabolitos y actividad enzimática para proponer un mecanismo de regulación y/o modificaciones a la ruta de biosíntesis de estos compuestos.

Bibliografía

- Aguilar Ramírez, J. J. (2018). *Actividad citotóxica y antioxidante de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de cáncer en Oaxaca*. San Juan Bautista Tuxtepec: Tesis de licenciatura. Universidad del Papalopan.
- Ali, M. B., Hahn, E.-J., & Paek, K.-Y. (2007). Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*, 12: 607-621.
- Ali, M., Abbasi, B. H., & Ali, G. S. (2015). Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 120: 1099-1106.
- André, A. C., Dias, D. A., Pereira, P. S., Abreu, L. C., & Franca, S. C. (2003). Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta in natura de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 22-24.
- André, C. M., Schafleitner, R., Legay, S., Lefèvre, I., Alvarado Aliaga, C. A., Nomberto, G., . . . Evers, D. (2009). Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. *Phytochemistry*, 70: 1107-1116.
- Andrés, R. C. (2011). *Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de Pleurotus ostreatus*. Arrosadía: Universidad Pública de Navarra.
- Anis, M., Faisal, M., & Singh, S. K. (2003). Micropropagation of Mulberry (*Morus alba* L.) Through *In vitro* Culture of Shoot tip and Nodal Explants. *Plant Tissue Culture*, 13(1): 47-51.
- Arcanjo, D. R., Sena, I. d., de Albuquerque, A. M., Neto, B. M., Santana, L. L., Silva, N. B., . . . Lopes Citó, A. d. (2011). Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and cardiovascular effects of *Gomphrena globosa* L. (Amaranthaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, (10): 2006-2010.
- Attaran Dowom, S., Abrishamchi, P., Radjabin, T., & Alireza Salami, S. (2017). Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. *Industrial Crops and Products*, 103: 81-88.
- Babu, G., P. A., C. R., & R. R. (2012). Phytochemical screening of *Gomphrena serrata* L. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, (7): 3396-3399.
- Biswas, M., S. D., & R. S. (2013). Betalains from *Amaranthus tricolor* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(5): 88-96.
- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68 (22-24): 2722-2735.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8): 2288-2294.

- Cai, Y.-Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 370-376.
- Calva Calva, G., & Pérez Vargas, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11): 1-16.
- Castrillón-Arbeláez, P. A., & Délano Frier, J. P. (2016). Secondary Metabolism in *Amaranthus* spp. — A Genomic Approach to Understand Its Diversity and Responsiveness to Stress in Marginally Studied Crops with High Agronomic Potential. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, 185-227.
- Chang, L., Chu, T., & Chu, C. (2012). Expectoant principle from *Gomphrena globosa* - structure determination of a new flavone glycoside. En I. E. Orhan, *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites* (págs. 55-56). Turkey: Bentham Science Publishers.
- Chaovanalikit, A., & Wrolstad, R. E. (2004). Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 69: 67-72.
- Corke, H., Cai, Y., & Sun, M. (2005). HPLC Characterization of Betalains from Plants in the *Amaranthaceae*. *Journal of Chromatographic Science*, 43: 454-460.
- Corke, H., Y.-Z. C., & M. S. (2005). Characterization and application of of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 370-376.
- Cruz Velasco, D. (2018). *Caracterización morfológica y de producción de metabolitos secundarios de plántulas in vitro obtenidas mediante semillas sintéticas de Gomphrena globosa L.* San Juan Bautista Tuxtepec: Tesis de Licenciatura. Universidad del Papaloapan.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. West Sussex: WILEY.
- Dinda, B., Ghosh, B., Arima, S., Sato, N., & Harigaya, Y. (2004). Phytochemical investigation of *Gomphrena globosa* aerial parts. *Indian Journal of Chemistry*, 43: 2223-2227.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M., & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence- a genomics perspective. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 3(5): 371-390.
- Dong, J., Wan, G., & Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology*, 148: 99-104.
- Dosumu, O. O., Onocha, P. A., Ajaiyeoba, E. O., & Ekundayo, O. (2005). Phytochemical Screening and Biological Activities of *Gomphrena celosioides* (C. Mart) Extracts. *Nigerian Society for Experimental Biology*, (2): 61-67.
- Dosumu, O. O., P. A., P. A., & O. E. (2010). Isolation of 3-(4-hydroxyphenyl) methylpropenoate and bioactivity evaluation of *Gomphrena celosioides* extracts. *EXCLI Journal*, 9: 173-180.
- Dučaiová, Z., Sajko, M., Mihalicova, S., & Repečak, M. (2016). Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. *Plant Growth Regulation*, 79: 81-94.
- Edwards, K. J. (2004). *Real-Time PCR: An Essential Guide*. Norfolk: Horizon Bioscience.

- Fank-de-Carvalho, S. M., Gomes, M. R., Silva, P. Í., & Bão, S. N. (2010). Leaf surfaces of *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae) from Cerrado biome. *BIOCELL*, 34 (1): 23-35.
- Ferreres, F., Gil Izquierdo, A., Valentao, P., & Andrade, P. B. (2011). Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-performance liquid chromatography diode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25: 3441-3446.
- Flores Roncancio, V. J., & Aleixo Pereira, M. d. (2009). El ácido abscísico acelera el desarrollo floral de solidago en días cortos. *Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín*, 62(1): 4835-4841.
- González Vergara, J. (2017). *Evaluación del efecto de elicitación con metil jasmonatos en cultivos de Stevia rebaudiana sobre los niveles de expresión de los genes SrDXS, SrIDI y SrKS1-1 de la ruta de biosíntesis de esteviósidos*. San Juan Bautista Tuxtepec: Tesis de Licenciatura. Universidad del Papaloapan.
- Grotewold, E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 1-875.
- Grzegorzczuk, I., & Wysokinska, H. (2009). The effect of methyl jasmonate on production of antioxidant compounds in shoot cultures of *Salvia officinalis* L. *herba polonica*, 55 (3): 238-243.
- Hamiduzzaman, & Zafrul Azam. (2012). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Gomphrena globosa* (L.). *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 183-185.
- Hamiduzzaman, M., Dey, A., Hossain, M., & Azom, Z. (2012). Investigation of Biological Properties of *Gomphrena globosa* (L.), Family: Amaranthaceae. *Journal of Pharmacy*, 5(8): 4230-4232.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6: 986-994.
- Hernandez, A., Vasallo, P. M., Torres, A., & Salido, E. (1994). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *NEFROLOGÍA*, 14 (2): 145-162.
- Heuer, S., Wray, V., Metzger, J. W., & Strack, D. (1992). Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. *Phytochemistry*, 31(5): 1801-1807.
- Hugget, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6: 279-284.
- Hurtado M., D. V., & Merino M., M. E. (1987). *Cultivo de tejidos vegetales*. México: Trillas.
- Ilyas, M., Tarnam, A., & Begum, N. (2013). Biological Potential and Phytopharmacological Screening of *Gomphrena* Species. *Global Journal of Pharmacology*, 7 (4): 457-464.
- Integrated DNA Technologies, Inc. (24 de Agosto de 2017). *Integrated DNA Technologies*. Obtenido de OligoAnalyzer 3.1: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- International Nucleotide Sequence Database Collaboration . (12 de Febrero de 2017). *NCBI*. Obtenido de GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

- Joy IV, R. W., Sugiyama, M., Fukuda, H., & Komamine, A. (1995). Cloning and Characterization of Polyphenol Oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiology*, 107: 1083-1089.
- Kanehisa Laboratories. (6 de Julio de 2017). *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Obtenido de KEGG: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00940
- Kikowska, M., Kedziora, I., Krawczyk, A., & Thiem, B. (2015). Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acids accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA*, 62 (2): 197-200.
- Kim, Y. S., Cho, J. H., Park, S., Han, J.-Y., Back, K., & Choi, Y.-E. (2011). Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum*. *Planta*, 233: 343-355.
- Kneer, R., Poulev, A., Olesinski, A., & Raskin, I. (1999). Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *Journal of Experimental Botany*, 50(339): 1553-1559.
- Krzyzanowska, J., Czubačka, A., Pecio, L., Przybys, M., Doroszewska, T., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2012). The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha x piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 108: 73-81.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (24 de Agosto de 2017). *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Obtenido de MEGA7: <http://www.megasoftware.net/home>
- Kuroda, M., Aoshima, T., Haraguchi, M., Young, M. C., Sakagani, H., & Mimaki, Y. (2006). Oleanane and taraxerane glycosides from the roots of *Gomphrena macrocephala*. *Journal of Natural Products*, 69(11): 1606-110.
- Kushwaha, A. K., Sangwan, N. S., Trivedi, P. K., Negi, A. S., Misra, L., & Sangwan, R. S. (2013). Tropine Forming Tropinone Reductase Gene from *Withania somnifera* (Ashwagandha): Biochemical Characteristics of the Recombinant Enzyme and Novel Physiological Overtones of Tissue-Wide Gene Expression Patterns. *PLoS ONE*, 8(9): 1-17.
- Lambert, E., Faizal, A., & Geelen, D. (2011). Modulation of Triterpene Saponin Production: *In Vitro* Cultures, Elicitation, and Metabolic Engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164: 220-237.
- Latha, S. T., & Rajendran, N. N. (2013). Apoptosis Effect Of Isolated Phenolic Secoiridoid Glucoside From Aerial Parts Of *Gomphrena Globosa* In A-431 cell Lines. *World Journal Pharmacy and Pharmaceutic Science*, 2(5): 38-29-3839.
- Lee, M., Jeong, J., Seo, J., Shin, C., Kim, Y., In, J., . . . Choi, Y. (2004). Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant Cell Physiology*, 45: 976-984.
- Lobo Roriz, C., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2015). Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chemistry*, 185: 16-24.

- Lobo Roriz, C., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos, B. C., & Ferreira, I. C. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research International*, 62: 684-693.
- Lobo Roriz, C., Barros, L., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., & Morales, P. (2017). Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena globosa* L. *Industrial Crops & Products*, 105: 29-40.
- McPherson, M. J., Hames, B. D., & Taylor, G. R. (2008). *PCR 2: A Practical Approach*. New York: Oxford University Press.
- Méndez Sánchez, L. I. (2017). *Producción de betalainas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de Gomphrena globosa L.* San Juan Bautista Tuxtepec: Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan.
- Montes Palmeros, M. (2017). *Plántulas micropropagadas de Stevia rebaudiana expuestas a metil jasmonato*. San Juan Bautista Tuxtepec: Tesis de Maestría. Universidad del Papaloapan.
- Moreno, J. E., Tao, Y., Chore, J., & Ballaré, C. L. (2009). Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Plant Biology*, 106 (12): 4935-4940.
- Mroginski, L. A., & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En L. A. Mroginski, & W. M. Roca, *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* (págs. 1-22). Cali: CIAT.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Ortiz, C. G., & Aquino, J. V. (1998). *Micropropagación vegetativa "in vitro" de aliso (Alnus acuminata)*. Cajamarca: ADEFOR.
- Palafox, C. H., Contreras Vergara, C., Muhlia Almazán, A., Islas Osuna, M., & González Aguilar, G. (2014). Expression and enzymatic activity of phenylalanine ammonia-lyase and p-coumarate 3-hydroxylase in mango (*Mangifera indica* 'Ataulfo') during ripening. *Genetics and Molecular Research*, 13(2): 3850-3858.
- Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Métraux, J.-P., & Broekaert, W. F. (1998). Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10: 2103-2113.
- Pérez Balibrea, S., Moreno, D. A., & García Viguera, C. (2011). Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chemistry*, 129: 35-44.
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. En S. A. Bustin, *A-Z of quantitative PCR* (págs. 87-112). La Jolla: International University Line.
- Phulwaria, M., Rai, M. K., Harish, Gupta, A. K., Ram, K., & Shekhawat, N. S. (2012). An improved micropropagation of *Terminalia bellirica* from nodal explants of mature tree. *Acta Physiology Plant*, 34: 299-305.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245: 154-160.

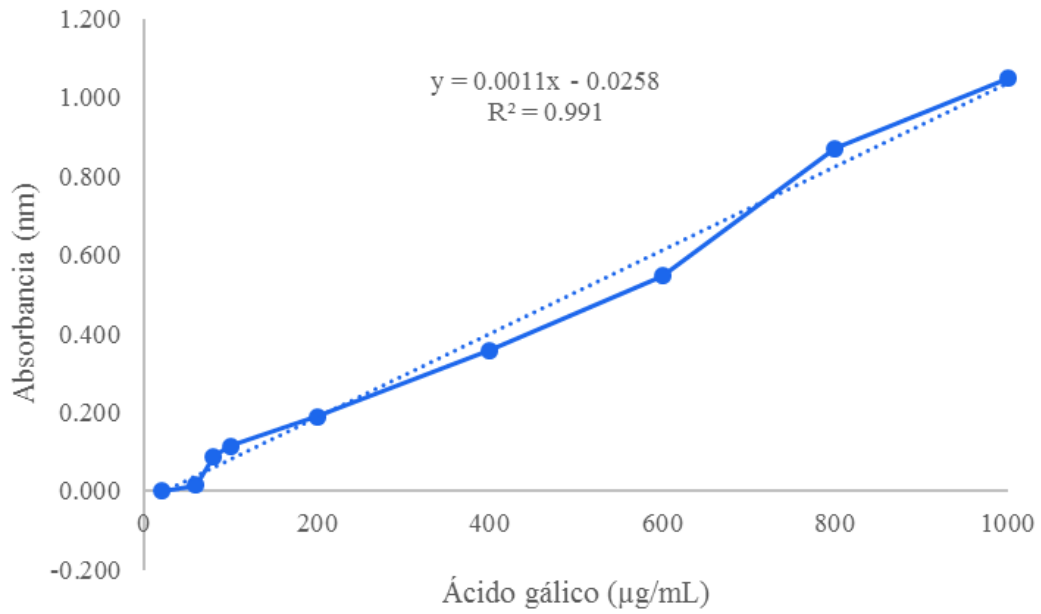
- Rocha S., P. J., & Leech, M. J. (2002). Regulación transcripcional de genes involucrados en la producción de alcaloides indol-terpenoides en plántulas de *Catharanthus roseus*. *REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA*, 4(2): 17-26.
- Sabater Jara, A. B. (2013). *Estudio de las Respuestas de Defensa Inducidas por Elicitores en Cultivos de Células Vegetales*. Murcia: Universidad de Murcia.
- Sák, M., Dokupilová, I., Mihálik, D., Lakatosova, J., Gubisová, M., & Kraic, J. (2014). Elicitation of phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. by *Phaeoemoniella chlamydospora*. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 13 (2): 162-171.
- Salvador, M. J., N. L., A. C., P. S., S. C., O. L., . . . D. A. (2012). Bioactive Chemical Constituents and Biotechnological Production of Secondary Metabolites in *Amaranthaceae* Plants, Gomphreneae Tribe. En *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites* (págs. 124-158). Campinas: Betham eBooks.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS.
- Sánchez del Pino, I., Borsch, T., & Motley, T. J. (2009). trnL-F and rpl16 Sequence Data and Dense Taxon Sampling Reveal Monophyly of Unilocular Anthered *Gomphrenoideae* (*Amaranthaceae*) and an Improved Picture of Their Internal Relationships. *Systematic Botany*, 34(1): 57-67.
- Sánchez del Pino, I., Flores Olvera, H., & Valdés, J. (1999). La familia *Amaranthaceae* en la flora halófila y gipsófila de México. *Anuales del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, 70 (1): 29-135.
- Sánchez Rojo, S., Cerda García Rojas, C. M., Esparza García, F., Plasencia, J., Poggi Varaldo, H. M., Ponce Noyola, T., & Ramos Valdivia, A. C. (2015). Long-term response on growth, antioxidant enzymes, and secondary metabolites in salicylic acid pre-treated *Uncaria tomentosa* microplants. *Biotechnology Letters*, 37(12): 2489-2496.
- Segretín, M. E. (10 de Febrero de 2017). *Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología*. Obtenido de ArgenBio: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>
- Sharma, S., & Grewal, R. K. (2014). *In vitro* Studies On The Antioxidant Activities Of Extracts From The Flowers Of *Gomphrena Globosa*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(3): 457-465.
- Shekhawat, M. S., Kannan, N., Manokari, M., & Ravindran, C. P. (2015). *In vitro* regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13: 209-214.
- Silva, L. R., Valentao, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A., . . . Andrade, P. B. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food Chemistry*, 135: 756-763.

- Skrzypczak Pietraszek, E., Slota, J., & Pietraszek, J. (2014). The influence of L-phenylalanine, methyl jasmonate and sucrose concentration on the accumulation of phenolic acids in *Exacum affine* Balf. f. ex Regel shoot culture. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA*, 61 (1): 47-53.
- Solano, J. M., Moreno, Z. S., Pachón, D. R., Castaño, D. M., & Gutiérrez, F. A. (2007). Diseño de oligonucleótidos para el estudio de genes celulolíticos y solventogénicos en cepas colombianas de *Clostridium* sp. (*CLOSTRIDIACEAE*). *Acta biológica Colombiana*, 12: 55-74.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., & Tonelli, C. (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, 24: 743-755.
- Suzuki, H., Reddy, M., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G. D., Huhman, D. V., . . . Dixon, R. A. (2005). Methyl jasmonate and yeast elicitor induce differential transcriptional and metabolic re-programming in cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 220: 696-707.
- Tanaka, Y., & Brugliera, F. (2008). Flower colour. In Flowering and its Manipulation. En C. Ainsworth, *Annual Plant Reviews, Volume 20* (págs. 201-239). Oxford: Blackwell Publishing.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54: 733-749.
- Technische Universität Braunschweig. (8 de Agosto de 2017). *The Comprehensive Enzyme Information System*. Obtenido de BRENDA: <http://www.brenda-enzymes.org/index.php>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (24 de Enero de 2018). Obtenido de Thermo Fisher Scientific Inc: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
- U.S. National Library of Medicine. (1 de Febrero de 2018). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de Primer-BLAST: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>
- UniProt Consortium. (12 de Febrero de 2017). *UniProtKB UniProt Knowledgebase*. Obtenido de UniProt: <http://www.uniprot.org/>
- Universidad Nacional de la Plata. (10 de Febrero de 2017). *REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNLP*. Obtenido de SEDICI: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5_-_Producci%C3%B3n_de_metabolitos.pdf?sequence=7](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5/_Producci%C3%B3n_de_metabolitos.pdf?sequence=7)
- Universidad Nacional de La Plata. (25 de Agosto de 2017). *REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNLP*. Obtenido de SEDICI: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/4_-_Cultivo_in_vitro.pdf?sequence=6
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., & Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid Genes in Petunia: Addition of a Limited Number of Gene Copies May Lead to a Suppression of Gene Expression. *The Plant Cell*, 2: 291-299.
- Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science*, 172: 861-875.

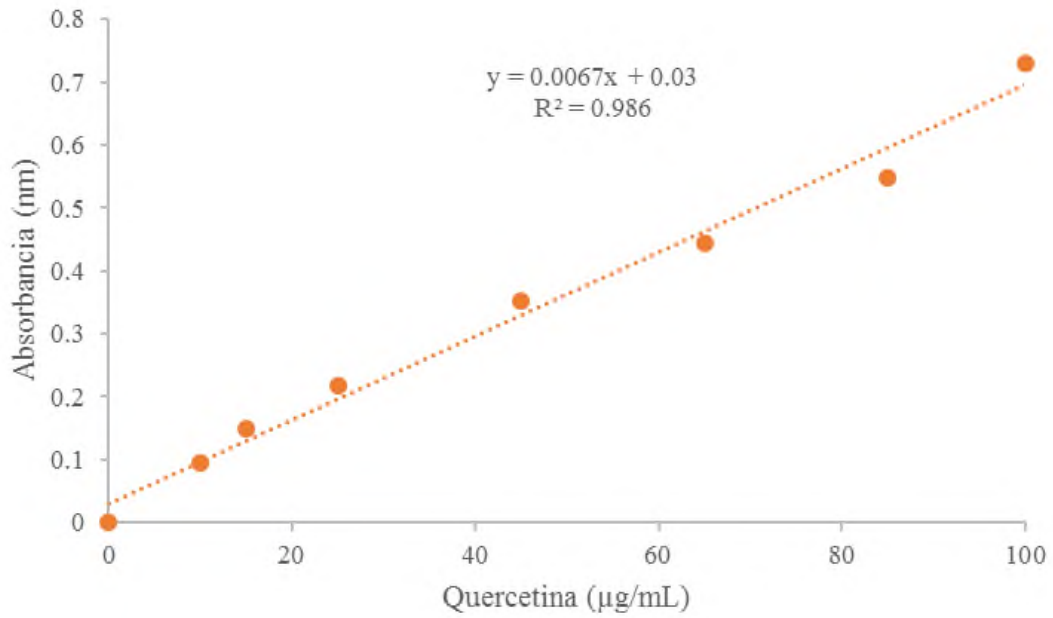
- Vázquez Flota, F., Hernández Domínguez, E., Miranda Ham, M. d., & Monforte González, M. (2009). A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus* *in vitro* cultures. *Biotechnology Letters*, 31: 591–595.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1): 2-20.
- Winkel, B. S. (2004). Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 85-107.
- Yendo, A. C., Costa, F. d., Gosmann, G., & Fett-Neto, A. G. (2010). Production of Plant Bioactive Triterpenoid Saponins: Elicitation Strategies and Target Genes to Improve Yields. *Molecular Biotechnology*, 46: 94-104.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Review. *Biotechnology Advances*, 23: 283-333.
- Zhao, M., Zhong, J., Liang, W., Wang, N., Chen, M., Zhang, D., . . . Jong, S. (2004). Analysis of squalene synthase expression during the development of *Ganoderma lucidum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14: 116-120.

ANEXOS

Anexo 1. Curva estándar de ácido gálico



Anexo 2. Curva estándar de quercetina



Anexo 3a. Agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95 % para fenoles totales en parte aérea (por g de extracto seco).

Muestra	N	Media	Agrupación
8	3	65.590	A
9	3	60.902	A
13	3	60.694	A
10	3	47.798	B
4	3	42.131	C
11	3	37.485	C D
3	3	36.902	C D
6	3	36.465	D
15	3	31.069	E
5	3	30.919	E
18	3	30.048	E F
12	3	28.694	E F G
19	3	28.173	E F G H
2	3	26.580	E F G H I
1	3	25.277	F G H
7	3	23.360	H I
20	3	22.923	H I
17	3	21.757	G H I J
14	3	19.173	I J
21	3	15.902	J
16	3	15.277	J

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tiempo

(h)	N	Media	Agrupación
6	12	48.31	A
12	12	37.59	B
18	12	33.19	B C
24	12	26.28	C
0	3	24.78	B C
3	12	23.49	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

MeJA

(uM)	N	Media	Agrupación
25	15	45.86	A
0	18	32.77	B
50	15	29.48	B C
70	15	20.99	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 3b. Agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95 % para fenoles totales en raíz (por g de extracto seco).

Muestra	N	Media	Agrupación
6	3	28.652	A
11	3	27.965	A
14	3	23.652	B
2	3	20.167	B C
1	3	18.486	C D
7	3	18.360	C D E
8	3	16.923	C D E F

13	3	16.277	C D E F
12	3	16.006	D E F
16	3	15.798	D E F
9	3	15.590	E F
3	3	14.402	F G
4	3	12.027	G H
10	3	11.465	H
15	3	10.798	H
5	3	10.590	H

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tiempo

(h)	N	Media	Agrupación
24	9	24.14	A
0	3	18.83	A B C
3	9	17.51	B
12	9	17.09	B
6	9	15.87	B C
18	9	10.95	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

MeJA

(uM)	N	Media	Agrupación
25	15	18.35	A
0	18	17.05	A
50	15	16.79	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 3c. Agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95 % para flavonoides en parte aérea (por g de extracto seco).

Muestra	N	Media	Agrupación
5	3	1.8003	A
3	3	1.5253	A B
2	3	1.2160	A B C D E F
6	3	1.1817	B C
1	3	0.8027	C D E F G
10	3	0.6637	C D E F G H
21	3	0.6197	C D E F G H I
12	3	0.5947	C D E F G H I
8	3	0.5280	F G H I
11	3	0.4330	E F G H I J
4	3	0.4110	D E F G H I J
14	3	0.1747	H I J
16	3	0.1490	H I J
20	3	0.1207	H I J
9	3	0.1143	H I J
19	3	0.0530	H I J
15	3	0.0485	H I J
17	3	-0.0410	G H I J
7	3	-0.0605	I J
18	3	-0.1443	J
13	3	-0.1567	J

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
18	12	0.68699	A
24	12	0.59583	A B
3	12	0.50564	A B
6	12	0.43808	A B
12	12	0.16908	B
0	3	0.04917	A B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

MeJA (uM)	N	Media	Agrupación
0	18	1.16096	A
25	15	0.29424	B
50	15	0.11333	B
70	15	0.06134	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 3d. Agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95 % para fenoles totales en parte aérea (por g de biomasa seca).

Muestra	N	Media	Agrupación
9	3	23.594	A
10	3	15.900	B
8	3	13.754	C
15	3	10.854	D
13	3	9.740	D
20	3	7.654	E
19	3	5.963	F
5	3	5.874	F G
4	3	5.254	F G H
18	3	4.793	G H I
11	3	4.704	H I
14	3	3.849	I J
21	3	3.392	J K
6	3	3.330	J K
3	3	3.276	J K
12	3	2.671	K L
2	3	2.454	J K L M
1	3	2.364	K L M
16	3	2.274	K L M
17	3	1.527	L M
7	3	1.316	M

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
18	12	10.0703	A
12	12	9.6651	A
6	12	7.8911	A
0	3	5.3055	A B
24	12	3.4251	B
3	12	0.7388	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

MeJA (uM)	N	Media	Agrupación
25	15	11.6781	A
50	15	5.7021	B
70	15	4.1088	B
0	18	3.2415	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 3e. Agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95 % para fenoles totales en raíz (por g de biomasa seca).

Muestra	N	Media	Agrupación
9	3	113.38	A
10	3	107.90	A
14	3	86.01	B
8	3	53.09	C
16	3	49.56	C D
13	3	45.69	D
11	3	29.83	E
2	3	28.53	E F
6	3	25.05	E F
1	3	23.47	F
15	3	15.85	G
12	3	9.68	H
7	3	9.19	H
5	3	7.27	H
3	3	7.22	H
4	3	4.14	H

Tiempo (h)	N	Media	Agrupación
12	9	67.842	A
0	3	53.399	A B
18	9	43.675	A
6	9	35.335	A B
24	9	34.814	A B
3	9	3.615	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

MeJA (uM)	N	Media	Agrupación
25	15	65.403	A
50	15	44.082	A
0	18	9.855	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 3f. Agrupación utilizando el método de Tukey con una confianza de 95 % para flavonoides en parte aérea (por g de biomasa seca).

Muestra	N	Media	Agrupación
---------	---	-------	------------

10	3	0.33400	A
5	3	0.22000	B
6	3	0.10800	C
3	3	0.09500	C
8	3	0.08500	C D
20	3	0.07767	C D E
2	3	0.07000	C D E F G
11	3	0.06467	C D E F
21	3	0.05967	C D E F G
12	3	0.05533	C D E F G
1	3	0.04867	C D E F G
14	3	0.02967	D E F G H
9	3	0.02833	D E F G H
4	3	0.02633	D E F G H
16	3	0.02133	E F G H
19	3	0.01400	E F G H
15	3	0.01100	E F G H
7	3	-0.00300	G H I
17	3	-0.01100	F G H I
13	3	-0.02233	H I
18	3	-0.05767	I

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tiempo			
(h)	N	Media	Agrupación
18	12	0.171013	A
24	12	0.063417	B
3	12	0.035221	B
6	12	0.025000	B
12	12	0.021004	B
0	3	0.007014	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

MeJA			
(uM)	N	Media	Agrupación
25	15	0.097939	A
0	18	0.095430	A
50	15	0.017925	B
70	15	0.003818	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4. Preparación de reactivos

- NaOH 2N

Componente	Cantidad
NaOH	8 g
Agua desionizada	100 mL

- EDTA 0.5 M pH 8 (ajustar pH con NaOH 2N)

Componente	Cantidad
EDTA	36.53 g
Agua desionizada	250 mL

- TAE 50X

Componente	Cantidad
TRIS base	60.5 g
Ácido acético glacial	14.275 mL
EDTA 0.5M pH 8	25 mL
Agua desionizada	210.725 mL

Anexo 5. Regiones homólogas para el diseño de oligonucleótidos

- PAL

	1310	1320	1330	1340	1350
AB300199.1	GGTGAGTGAC	AATCCTATGA	TCGATGTGC	CCGTGACAAG	GCATTACACG
AY879309.1	TGTCAATGAC	AACCCTTTGA	TTGATGTTC	GAGGAACAAG	GCCATTTCATG
AY986506.1	CGTCAACGAC	AACCCTTTGA	TTGATGTTC	AAGGAACAAG	GCTTTACATG
EF031063.1	AGTCAATGAC	AACCCTTTGA	TTGATGTTC	AAGGAACAAG	GCCTTGCATG
EF031064.1	AGTGAATGAT	AACCATTGA	TTGATGTTC	AAGGAACAAG	GCTTTACATG
FJ594466.2	GGTTAATGAT	AACCCTTTGA	TTGATGTTC	AAGGAACAAA	GCATTACATG
FJ603650.2	GGTGAATGAT	AATCCATTGA	TTGATGTTC	GAGGAATAAA	GCTCTACATG
GU456381.1	CGTGAACGAC	AACCATTGA	TCGACGTTC	AAGGAACAAA	GCCGTGCACG
HM114215.1	GGTCAATGAT	AACCCTTTGA	TTGATGTTC	AAGGAACAAG	GCTATTTCACG
X75967.1_v	TGTGAATGAT	AACCCTTTGA	TCGATGTTC	CAGGAACAAG	GCTCTACATG

- C4H

	560	570	580	590	600
HM062778.1	ATGACGGTCC	CCTTCTTCAC	CAACAAGTG	GTGCAGCAGA	ACCGCGCGGG
L38898.1_P	ATGACAGTAC	CTTTCTTTAC	GAACAAGTT	GTCCAGCAGT	ATCGATTTCGG
DQ211885.1	ATGACGGTCC	CTTTCTTCAC	CAACAAGTG	GTTCAGCAGT	ACCGCGGCGG
AY641731.2	ATGACGGTTC	CTTTTTTTAC	CAACAAGTG	GTGCAGCAGT	ACAGGTTTCGG
DQ485132.1	ATGACGGTTC	CGTTTTTTCAC	CAACAAGTT	GTGCAACGGA	ACAGAGAAGG
DQ485130.1	ATGACGGTTC	CGTTCTTCAC	CAACAAGTG	GTTCAGCAGA	ACAGAGAAGG
HM114216.1	ATGACAGTCC	CTTTCTTTAC	TAACAAGTT	GTCCAGCAGT	ATCGATTTGG
GU456382.1	ATGACTGTTC	CTTTCTTCAC	CAATAAGTA	GTCAATCAGT	ACAGGTATGG

- 4CL

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      810      820      830      840      850
EU616501.1 GGCCTGGTGT CCAGCGTTGC CCAGCAGGTC GATGGTGAAA ATCCCAATCT
HM990148.1 AGCTTGATCA CCAGCATCGC GCAGCAAGTC GACGGCGAAA ACCCCAATTT
KC576841.1 AGCTTGATCA CCAGCATCGC GCAGCAAGTC GACGGTGAAA ACCCTAATTT
JX548316.1 AGCTTCGTAA CCAGCGTCGC TCAACATGTT GGTGGAGACA ATCCCAACAT
EF685345.1 AGCTTTGTGA CAAGCGTTGC TCAGCAGGTG GACGGGGAAA ATCCCAACTT
DQ194356.1 AGCTTGATAT CGAGCGTGGC TCAACAAGTG GATGGAGAGA ACCCAAATTT
AY587891.1 AGCTTGATCA CCAGCATCGC GCAGCAGGTC GACGGCGAGA ACCCTAATTT

```

- CCR

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      360      370      380      390      400
AY149608.1 CTGGATTATC AGAGTTTGAG AGAAGCAATT TATGGCTGTG ACGGGGTTTT
AJ224986.1 CTTGATTATG AGTCTCTTAA AGAGGGTATT CAAGGGTGTG ACGGGTTTTT
AF217958.1 CTTGATTATG AGTCTCTTAA AGAGGCTATT CAAGGGTGTG ACGGGTTTTT
GQ450296.1 CTGGACTACG ACGCCATCTG CCGCGCCGTG GAGGGCTGCC ACGGCGTCTT
GQ450301.1 CTCGACCGGG CCAGCCTCCG CGCCGCCTTC GACGGCTGCG ACGGCGTCAT
DQ019126.1 CTAGACTATC AGAGTTTGAG AGAAGCAATT TATGGCTGTG ACGGGAGTTTT
DQ019125.1 CTTGATTATC AGAGTTTGCG TGAAGCAATC AATGGCTGTG ACGGGAGTTTT
AF278698.1 CTCGACTATG ATGCCATATG CGCCGCCGCC GAGGGCTGCC ACGGCGTGTT
GQ872418.1 CAGGACTACG AGGCTCTTAA AGCGGCGATC GATGGTTGCG ACGGCGTCTT
AY149607.1 CTCGACTACG ACGCCATCTG CGCCGCCGTC GAGGGCTGCC ACGGCGTGTT

```

- HQT

```

      .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      260      270      280      290      300
GQ847546.1 CTCTGGAAC TCGAATCTGGA CCTTGTGTC GGTCCGATCC ACATCCTAAC
DQ915589.1 ACCCACACCG AACCAGCGGC TATGGAACTC GAATCTTGAC TTGGTTGTTGG
DQ104740.1 GGCCCAACGG CGCCGCCAAC TTTTGTGATC CGAAGGTGAT GAAGGATTCGC
DQ915590.1 TTGCCGACGT TCTTGTTCG TTTTCCGA TGGCCGACG TCTGGTTAAC

```