



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CULTIVO *in vitro* DE RAÍCES ADVENTICIAS DE *Gomphrena globosa* PARA LA PRODUCCIÓN DE BETALAÍNAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS

PRESENTA

JUAN CARLOS MARTÍNEZ GUTIÉRREZ

Para obtener el grado

Maestro en Biotecnología

Director de Tesis

Dra. Jacqueline Capataz Tafur

Co-Director de Tesis

Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Agosto, 2019



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2019/MBt/047
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 3 de mayo de 2019

C. JUAN CARLOS MARTÍNEZ GUTIÉRREZ
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.

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	UNPA	Presidente
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Vocal
Dr. Lemuel Pérez Picaso	UNPA	Secretario
Dr. Enrique Villalobos Amador	UNPA	1er Suplente
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre	Cátedras CONACYT Universidad Autónoma de Aguascalientes	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

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



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

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

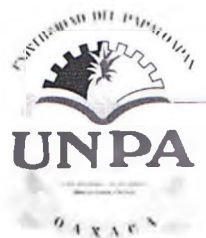


C.c.p. Dra. Jaqueline Capataz Tafur – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefe de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

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



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2019/238
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 12 de julio 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. Juan Carlos Martínez Gutiérrez**, matrícula **16140007**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Cultivo *in vitro* de raíces adventicias de *Gomphrena globosa* para la producción de betalainas y compuestos fenólicos**" 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, chí jí jú



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

C.c.p. C. Juan Carlos Martínez Gutiérrez

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en los Laboratorios de Cultivo de Células Vegetales y Análisis Instrumental de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec bajo la dirección de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur y la codirección del Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo. Se contó con la asesoría del Dr. Adolfo López Torres para el análisis químico mediante UHPLC.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento del proyecto CB-CONACyT N° 18395, e INFRA 255514 y es parte de la investigación enmarcada dentro del proyecto Cátedras-CONACyT "3212 Estudio integral de plantas medicinales para la producción y estandarización de fitoextractos". Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de becario 610340 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131.

AGRADECIMIENTOS

Nunca he tenido la oportunidad de agradecer a las personas que me rodean y en especial a mi familia y amigos y decirles lo importantes que son en cada una de mis metas en la vida. Por eso, mediante estas líneas deseo expresarles mi más sincero agradecimiento por su apoyo incondicional:

A mi esposa e hijo por haberme apoyado día a día, les agradezco toda la abnegación, amor y cariño que me han brindado, pues han hecho que hasta los grandes problemas parezcan pequeños.

A mis padres, hermanos y tíos quienes siempre me han apoyado y demostrado su aprecio sincero.

A mis directores de tesis, la Dra. Jacqueline y el Dr. Paul por la confianza y el apoyo que me brindaron en el desarrollo de este trabajo, por los buenos consejos y sugerencias que recibí de ellos. A la Dras. Yenni y Ariana, así como los Drs. Enrique y Adolfo por las sugerencias brindadas a lo largo de la realización de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo en el laboratorio de CCV, Angel, Abril, Daniel, David, Frank, Betsaida, Atzin, Javier y Laura por su apreciable amistad.

A todos quiero decirles una vez más ¡muchas gracias!

Pero sobre todas las cosas *¡le doy las gracias a DIOS!*

DEDICATORIA

¡A mi querida familia!

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTE TRABAJO

Martínez Gutierrez J.C, Sánchez-Ocampo P. Capataz-Tafur J. Efecto de los métodos de cultivo sobre la biomasa de raíces de *Gomphrena globosa* y la acumulación de compuestos bioactivos. IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología, 03-06 de diciembre de 2017, Tlaxcala, México.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES.....	7
2.1 <i>Gomphrena globosa</i> L.....	7
2.2 Descripción y usos.	7
2.3 Estudios fitoquímicos y actividad biológica de <i>G. globosa</i>	9
2.4 Betalaínas	12
2.4.1 Características químicas.	12
2.4.2 Funciones en las plantas.....	13
2.4.3 Actividad biológica.....	13
2.4.4 Biosíntesis y factores que influyen en la biosíntesis.....	14
2.5 Compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides y fenilpropanoides.....	17
2.5.1 Características químicas.	17
2.5.2 Funciones en las plantas.....	18
2.5.3 Actividad biológica.....	19
2.3.4 Biosíntesis y factores que influyen en la biosíntesis.....	20
2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de raíces adventicias para la producción de metabolitos secundarios.....	21
2.7 Cultivo de raíces u órganos <i>in vitro</i> como fuente de betalaínas, compuestos fenólicos y flavonoides.	23
2.8 Antecedentes de cultivo <i>in vitro</i> de <i>G. globosa</i>	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo General	27
5.2 Objetivos Específicos	27
6. METODOLOGÍA.....	28
6.1 Material Vegetal.	28
6.2 Cultivo de raíces en medio sólido.....	28
6.3 Obtención de cultivo de raíces en medio líquido.	28

6.4 Crecimiento, conductividad eléctrica y consumo de sacarosa.	29
6.4.1 Crecimiento celular y conductividad eléctrica	29
6.4.2 Índice de crecimiento.....	29
6.4.3 Determinación de sacarosa residual.	29
6.5 Parámetros cinéticos.	30
6.5.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación.....	30
6.5.2 Determinación de los rendimientos biomasa/sustrato y producto/biomasa.	30
6.6 Efecto de la concentración de IBA y sacarosa en el crecimiento de raíces y producción de compuestos bioactivos de <i>G. globosa</i>	31
6.6.1 Efecto de la concentración del ácido indol butírico (IBA).....	31
6.6.2 Efecto de la concentración de sacarosa.....	31
6.6 Análisis químico de compuestos bioactivos.....	32
6.6.1 Extracción y cuantificación Betalainas.	32
6.6.2 Fenoles totales y Flavonoides.	33
6.6.3 Cuantificación de compuestos bioactivos por HPLC.	34
6.7 Análisis estadístico.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Efecto de los métodos de cultivo sobre la biomasa de raíces adventicias y la acumulación de compuestos bioactivos.	35
7.2 Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y compuestos bioactivo en raíces de <i>G. globosa</i> en medio líquido.....	36
7.3 Efecto de la concentración de IBA en el crecimiento celular y producción de compuestos bioactivos	38
7.4 Efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento celular y producción de compuestos bioactivos	41
7.5 Detección de compuestos bioactivos por HPLC.....	50
8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIONES	60
10. REFERENCIAS	61
9. ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Usos de <i>G. globosa</i>	9
Tabla 2. Principales metabolitos secundarios de <i>G. globosa</i>	10
Tabla 3. Actividad biológica de algunas especies del género <i>Gomphrena</i>	12
Tabla 4. Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de betalaínas.....	17
Tabla 5. Actividad biológica de compuestos fenólicos de <i>G. globosa</i>	19
Tabla 6. Factores optimizados en cultivos de raíces adventicias para la producción de metabolitos secundarios.....	23
Tabla 7. Cultivos de raíces adventicias productores de betalaínas y compuestos fenólicos.....	24
Tabla 8. Cultivo <i>in vitro</i> de algunas especies pertenecientes a la tribu <i>Gomphreneae</i>	25
Tabla 9. Comparación de variables del cultivo de raíces adventicias en medio sólido y líquido a 20 días de edad.....	36
Tabla 10. Comparación entre la producción de compuestos fenólicos y betalaínas en medio B5 y MS.....	37
Tabla 11. Parámetros cinéticos en cultivo de raíces de <i>G. globosa</i> a diferentes concentraciones de ácido indol butírico.....	41
Tabla 12. Parámetros cinéticos en cultivo de raíces de <i>G. globosa</i> a diferentes concentraciones de sacarosa e IBA a 9.9 µM.....	45
Tabla 13. Parámetros cinéticos en cultivo de raíces de <i>G. globosa</i> a diferentes concentraciones de sacarosa e IBA a 49.3 µM.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de <i>G. globosa</i>	8
Figura 2. Fórmula general de la betalaína.....	12
Figura 3. Estructura química de betalaínas.....	13
Figura 4. Ruta de biosíntesis de betalaínas.....	16
Figura 5. Ruta biosintética de compuestos fenólicos vía shikimato y mevalonato. ...	20
Figura 6. Cultivo <i>in vitro</i> de raíces adventicias de <i>G. globosa</i>	35
Figura 7. Inducción de raíces adventicias <i>in vitro</i> de <i>G. globosa</i> en medio líquido. ..	36
Figura 8. Cinética de crecimiento de raíces adventicias de <i>G. globosa</i>	37
Figura 9. Raíces adventicias de <i>G. globosa</i> cultivadas en medio líquido B5 suplementado con IBA a diferentes concentraciones.	38
Figura 10. Cinética de crecimiento y conductividad eléctrica de raíces de <i>G. globosa</i>	39
Figura 11. Producción de fenoles totales, flavonoides y betalaínas en raíces adventicias de <i>G. globosa</i> cultivadas en medio líquido B5 con distintas concentraciones de ácido indol butírico (IBA)..	40
Figura 12. Raíces adventicias de <i>G. globosa</i> cultivadas en medio líquido B5 suplementado con 9.9 µM de IBA a diferentes concentraciones de sacarosa a 21 días de cultivo.	42
Figura 13. Cinética de crecimiento y conductividad eléctrica de raíces de <i>G. globosa</i> con (IBA 9.9 µM) con diferentes concentración de sacarosa.	43
Figura 14. Producción de fenoles totales, flavonoides y betalaínas en raíces adventicias de <i>G. globosa</i> cultivadas en medio líquido B5 con (IBA 9.9 µM) a diferentes concentraciones de sacarosa.....	44
Figura 15 Raíces adventicias de <i>G. globosa</i> cultivadas en medio líquido B5 suplementado con 49.3 µM de IBA a diferentes concentraciones de sacarosa a 21 días de cultivo.	46
Figura 16. Cinética de crecimiento y conductividad eléctrica de raíces de <i>G. globosa</i> con (IBA 49.3 µM) con diferentes concentración de sacarosa	47

Figura 17. Producción de fenoles totales, flavonoides y betalaínas en raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido B5 con distintas concentraciones de sacarosa suplementado con (IBA 49.3 μ M) 49

Figura 18. Cromatograma de HPLC (280 nm) de extractos acuosos de cultivos *in vitro* raíces adventicias de *G. globosa*. 51

RESUMEN

Los cultivos de raíces adventicias de plantas medicinales son una fuente de metabolitos secundarios de importancia farmacéutica. *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae) contiene compuestos bioactivos, tales como compuestos fenólicos, flavonoides y betalaínas que posee actividad anticancerígenas y antioxidantes. Se estableció un cultivo de raíces adventicias de *G. globosa* utilizando explantes asépticos de raíces provenientes de plantulas *in vitro*. Se evaluó el efecto de medio sólido y líquido, diferentes tipos de medio de cultivo, concentración de la auxina ácido indol butírico (IBA) y sacarosa para determinar sus efectos en el aumento de la biomasa y la acumulación de fenoles totales, flavonoides y betalaínas en las raíces adventicias de *Gomphrena globosa*. Se encontró que las raíces cultivadas en medio líquido incrementaron 3.0 veces la biomasa y 9.5 veces la acumulación de compuestos fenólicos en comparación al medio sólido. El medio Gamborg B5 (B5) favoreció el crecimiento y producción de compuestos fenólicos y betalaínas en comparación al medio Murashige y Skoog (MS). A 9.9 μM de IBA se alcanzó una biomasa máxima de 15.28 g P.S/L y de compuestos fenólicos de 18.9 mg E.A.G/g ES, 1.8 veces y 1.12 veces mayor al del control, respectivamente. Mientras que la producción de betalaínas fue máxima a 49.3 μM de IBA (5.14 mg E.A/g E.S), 1.43 veces mayor producción en comparación al control. Sin embargo, la producción de flavonoides fue máxima en tratamiento control alcanzando 0.863 mg E.Q/g E.S. Al evaluar la concentración de sacarosa con IBA a 9.9 μM , se encontró que a 40 g L⁻¹ de sacarosa indujo el mayor desarrollo y crecimiento de raíces adventicias de *G. globosa* (15.34 g P.S/L), mientras que con sacarosa 50 g L⁻¹ de sacarosa se presentó la mayor acumulación de compuestos fenólicos (26.52 mg E. A.G/ g E. S). Por otro lado, con la concentración de IBA 49.3 μM y sacarosa 30 g L⁻¹ indujo una mayor acumulación de betalaínas (4.72 mg E.A/ g E.S) y de fenoles (17.23 mg E.A.G/g ES). En general, las mejores condiciones para la producción de compuestos fenólicos, flavonoides y betalaínas en cultivos de raíces adventicias de *G. globosa* fueron en medio B5 suplementado con 49.3 μM de IBA y 30 g L⁻¹ de sacarosa.

ABSTRACT

The adventitious root culture of medicinal plants is a source of secondary metabolites of pharmaceutical importance. *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae) contains a bioactive compound, such as phenolic compounds, flavonoids and betalains that possess anticancer and antioxidant activity. A culture of adventitious roots of *G. globosa* was established using aseptic explants of roots from *in vitro* seedlings. The effect of solid and liquid medium, different type of culture medium, concentration of indole butyric acid auxin (IBA) and sucrose were evaluated to determine their effects in the increase of biomass and the accumulation of total phenols, flavonoids and betalains in the adventitious roots of *G. globosa*. It was found that the races cultivated in liquid medium increased 3.0 times the biomass and 9.5 times the accumulation of phenolic compounds compared to the solid medium. The Gamborg B5 medium (B5) favored the biomass and production of phenolic compounds and betalains compared to the Murashige and Skoog (MS) medium. A 9.9 μM IBA was reached at a maximum biomass of 15.28 g P.S/L and phenolic compounds of 18.9 mg E.A.G/g ES, 1.8 times and 1.12 times that of the control, respectively. While the production of betalains was highest at 49.3 μM of IBA (5.14 mg E.A/g E.S), 1.43 times higher production compared to the control. However, flavonoid production was maximal in control treatment reaching 0.863 mg E.Q / g E.S. When evaluating the sucrose concentration with IBA at 9.9 μM , it was found that at 40 g L⁻¹ of sucrose the highest development and growth of adventitious roots of *G. globosa* (15.34 g PS / L) was induced, while with sucrose 50 g L⁻¹ sucrose showed the highest accumulation of phenolic compounds (26.52 mg E. A.G/ g E. S). On the other hand, with the concentration of IBA 49.3 μM and sucrose 30 g L⁻¹ induced a greater accumulation of betalains (4.72 mg E.A /g E.S) and of phenols (17.23 mg E.AG/ g E.S). In general, the best conditions by the production of phenolic compounds, flavonoids and betalains in adventitious root culture of *G. globosa* were in B5 medium supplemented with 49.3 μM IBA and 30 g L⁻¹ sucrose.

1. INTRODUCCIÓN

La planta *Gomphrena globosa* L. es una especie perteneciente a la familia Amaranthaceae, la cual comprende más de 2400 especies (Tranam *et al.* 2014) esta familia se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios, los cuales son sustancias de interés en la industria de los alimentos cosmética, textil, farmacéutica y en la producción de pigmentos. Uno de estos metabolitos son las betalaínas, ampliamente usadas a nivel industrial como pigmentos, sin embargo, las referencias muestran que también exhiben propiedades biológicas entre las que destacan su actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena (Khan, 2016; Gandía-Herrero *et al.* 2016). Entre las principales betalaínas a las que se ha atribuido actividad antiinflamatoria esta la gomfrenina (Lin *et al.* 2010). Así mismo, estudios realizados en diversos sistemas en *G. globosa* en la universidad del Papaloapan (Méndez-Sánchez, 2017; Cruz-Velasco, 2017) revelan la presencia de compuestos fenólicos, a los cuales según referencias se les ha atribuido actividad antioxidante (Silva *et al.* 2012). Por otra parte, los cultivos de órganos y tejidos vegetales pueden sintetizar y acumular estos metabolitos secundarios; a este respecto los sistemas de cultivo *in vitro* de raíces representan una alternativa para la producción de estos. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre producción y obtención de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos *in vitro* de raíces de *G. globosa*.

Por lo tanto, es necesario desarrollar métodos alternativos para obtener la mayor producción de compuestos fenólicos y betalaínas. Una alternativa mediante la cual se puede incrementar la producción de biomasa y metabolitos secundarios es mediante el uso los reguladores de crecimiento como el ácido indol 3 butírico (IBA), en este sentido, el uso exógeno reguladores de crecimiento y la concentración de sacarosa son una herramienta clave cuando se desea incrementar la producción de dichos metabolitos secundarios (Jiang *et al.* 2005). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia del IBA y la concentración de sacarosa en la producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivo *in vitro* de raíces de *G. globosa*.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Gomphrena globosa* L.

Gomphrena globosa es una planta perteneciente a la familia de las *Amaranthaceae*, a la clase *Magnoliopsida* y al orden *Caryophyllales*. Esta familia fue descrita por A. L. Jussieu en 1789, la cual comprende 176 géneros y 2400 especies. Dentro de estas podemos encontrar plantas herbáceas, arbustos y árboles (Tranam *et al.* 2014). Es originaria de países sudamericanos entre los que destacan Brasil, Panamá, Costa Rica, Guatemala y Colombia. Sin embargo, por ser característica de clima tropical crece favorablemente en el sur y sureste del territorio mexicano, así como a lo largo del litoral, desde el nivel del mar hasta 2600 m sobre el nivel de este. Es una familia cosmopolita que se puede encontrar desde regiones tropicales hasta templadas (Gilman & Howe 2014). Algunas especies se pueden encontrar en zonas tropicales de América, India, África y Australia, así como en regiones subtropicales y templadas, (Siqueira, 1995; Sharma, 1993).

La familia *Amaranthaceae* se clasifica en cuatro tribus: *Celosieae*, *Achyrantheae*, *Braylineae* y *Gomphreneae*. Dentro de la tribu *Gomphreneae* se encuentran el género *Alternanthera*, *Iresine*, *Gomphrena*, entre otros (Tranam *et al.* 2014). El género *Gomphrena* comprende 120 especies.

2.2 Descripción y usos.

G. globosa es ampliamente conocida como amaranto globo, siempre viva, perpetua, amarantina y amaranto redondo. Puede alcanzar 75 cm de altura, posee brácteas de color magenta, rosado, púrpura, rojo y blanco (Figura 1). Sus flores crecen agrupadas en inflorescencias esféricas durante primavera y verano, es tolerante al calor y la humedad, de tal manera que los cultivos se realizan con total exposición al sol.

Su multiplicación es por semillas que se siembran hacia finales de invierno y principio de primavera y su tiempo de germinación es de 14 días a 18 °C. Se utiliza ampliamente

en jardinería como planta de ornato, en la elaboración de coronas fúnebres, altares y floreros.

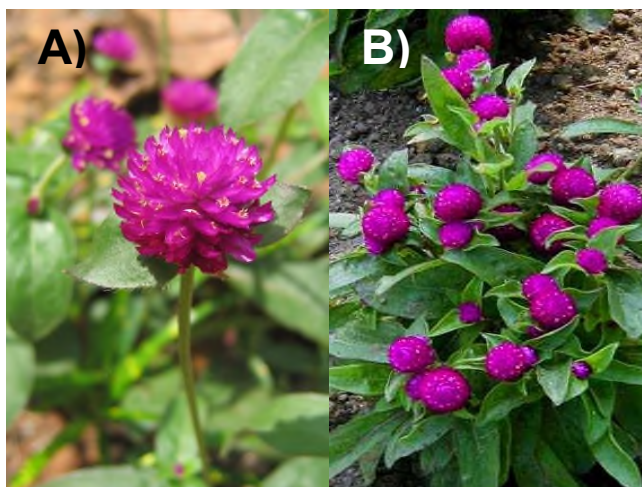


Figura 1. Imagen de *G. globosa*. A) Inflorescencias. B) Planta silvestre con inflorescencias(www.gardening.cornell.edu).

Los miembros de este género presentan una gran importancia por su valor nutritivo y son ampliamente usados en el tratamiento de diversas enfermedades (Salvador *et al.* 2012). Algunas plantas de esta familia tienen importancia económica como hierbas medicinales o vegetales en varias partes del mundo (Mroczek, 2015).

Entre sus principales usos medicinales se encuentran las hojas como antimaláricas; toda la planta para estimular la sudoración y curar la fiebre; las hojas y las flores se usan como emolientes y para controlar la salivación sangrosa, así como para curar el dolor de garganta.

También se ha usado para tratar el asma bronquial en niños, la disminución de gases y la diarrea, como analgésico y tónico (Babu *et al.* 2012). Es usada además para tratar problemas urinarios y de la próstata (Lans, 2007). Por otra parte, en Nigeria y otros países se ha empleado para tratar varias enfermedades de la piel, así como las causadas por parásitos y otros agentes infecciosos como el agente causal de la gangrena (Muhammad *et al.* 2013). Se ha usado también para tratar problemas respiratorios asociados con los niños tales como: ronquera, tos, bronquitis y como

expectorante. En América Latina y el Caribe se ha empleado para reducir el colesterol elevado y la ictericia.

Se puede considerar a *G. globosa* como una planta usada para diversos fines entre los que se pueden mencionar su uso medicinal, ornamental, como colorante entre otros. En el Tabla 1 se muestran algunos de los principales usos de *G. globosa*.

Tabla 1. Usos de *G. globosa*.

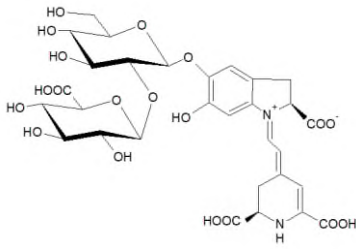
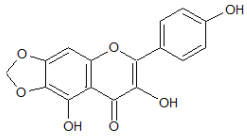
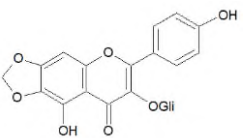
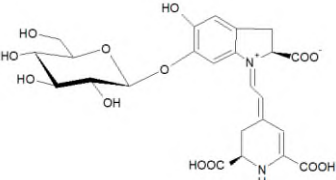
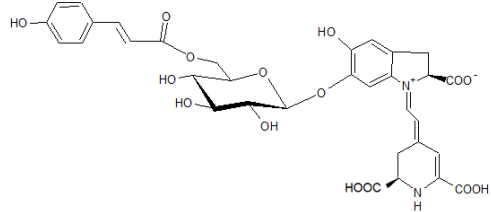
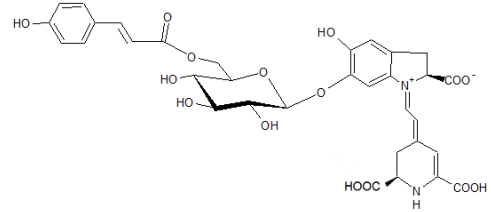
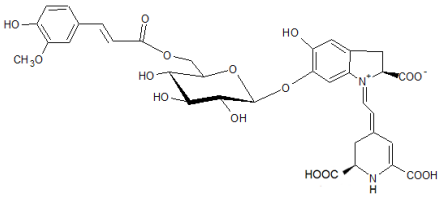
Uso	Explante	Referencia
Colorante	Inflorescencias	Cai <i>et al.</i> 2006
Fertilizante	Planta entera	Wang <i>et al.</i> 2009
Farmacológico	Hojas	Tranam <i>et al.</i> 20014
Alimento	Hojas	Radji & Kokou, 2014

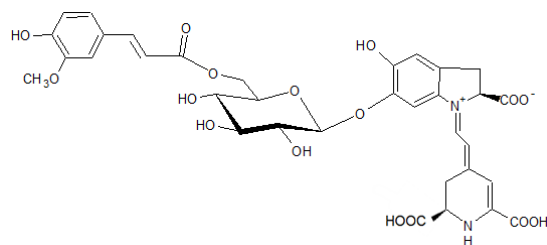
2.3 Estudios fitoquímicos y actividad biológica de *G. globosa*.

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos orgánicos producto del metabolismo secundario de las plantas entre estos se encuentran alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos a los cuales se les ha atribuido la actividad medicinal de las plantas. Su producción y/o acumulación se produce como parte de la respuesta de defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos a las plantas. Estas sustancias químicas no nutritivas han protegido a las personas de diversas enfermedades. Los metabolitos secundarios son el fundamento para el desarrollo de fármacos, así como de la industria farmacéutica.

Los análisis fitoquímicos previos en partes aéreas (hojas, tallos, inflorescencias) de *G. globosa* han demostrado la presencia de betacianinas (gomfrenina I y II, isogomfrenina I, II y III y Sinapoil-gomfrenina I y II) (Silva *et al.*, 2012)., hidroxicinamamidas, flavonoides, flavonas, flavonoles, saponinas, alcaloides, cumarinas, azúcares reductores (Arcanjo *et al.* 2010., Savithramma *et al.* 2012). y triterpenos (Dinda *et al.* 2004). En la Tabla 2 se muestran algunos de los principales metabolitos secundarios encontrados en estudios fitoquímicos de *G. globosa*.

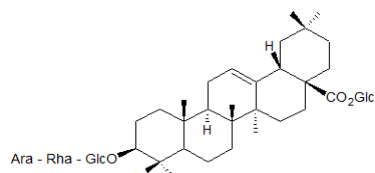
Tabla 2. Principales metabolitos secundarios de *G. globosa*.

Metabolito (estructura química)	Nombre	Referencia
	Isoamarantina	Piattelli & Minale 1964; Salvador <i>et al.</i> 2012.
	3,4-5-trihidroxi-6-7-metilenodioxiflavonol	Bouillant <i>et al.</i> 1978; Salvador <i>et al.</i> 2012.
	4-5-dihidroxi-6-7-metilenodioxiflavonol-3-O-β-D-glucosa	Chong. <i>et al.</i> 1981 Salvador <i>et al.</i> 2012.
	Gomfrenina II	Heuer <i>et al.</i> 1992; Salvador <i>et al.</i> 2012.
	Gomfrenina III	Heuer <i>et al.</i> 1992; Salvador <i>et al.</i> 2012.
	Gomfrenina IV	Heuer <i>et al.</i> 1992; Salvador <i>et al.</i> 2012.
	Gomfrenina V	Heuer <i>et al.</i> 1992; Salvador <i>et al.</i> 2012.



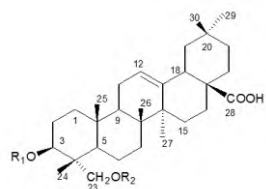
Gomfrenina VI

Heuer *et al.* 1992;
Salvador *et al.*
2012.



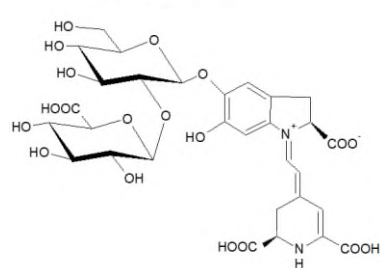
Gomfrenósido

Yada *et al.* 1998;
Salvador *et al.*
2012.



Oleano Triterpénico

Chang *et al.* 2000.



Amarantina

Cai & Sun, 2001;
Salvador *et al.*
2012.

Las plantas medicinales son los recursos biológicos más ricos de la medicina tradicional; así como de suplementos alimenticios, nutracéuticos, industrias farmacéuticas y entidades químicas para drogas sintéticas (Ncube *et al.* 2008). Estas son fuente rica en metabolitos secundarios ampliamente utilizados para combatir y curar diversas dolencias (Savithamma *et al.* 2012).

A algunos metabolitos secundarios se les ha atribuido la actividad biológica de *G. globosa*, entre las que se encuentran actividad antimalárica, antimicrobiana, diuréticas, antipirética, antioxidante. Otros reportes indican que también posee actividad gastroprotectora, hepatoprotectora anticancerígena, estrogénica y de efecto cardiovascular (Upadhyaya & Saikia, 2011). En el Tabla 3 se muestra la actividad biológica de algunas especies del género *Gomphrena*.

Tabla 3. Actividad biológica de algunas especies del género *Gomphrena* (Salvador *et al.* 2012).

Especie	Actividad Biológica
<i>G. globosa</i>	Antimicrobiana, anticancerígena y citotóxica
<i>G. celosioides</i>	Antimicrobiana, analgésico y anticancerígena
<i>G. macrocephala</i>	Tóxico para moluscos y <i>Artemia salina</i>
<i>G. perennis</i>	Antimicrobiana, analgésico y propiedad anticancerígena

2.4 Betalaínas

2.4.1 Características químicas.

El término betalaína fue introducido por Mabry y Dreiding en 1968. Son pigmentos vacuolares en cuya estructura contienen nitrógeno. Así que estos compuestos son de naturaleza ácida, que presentan varios grupos carboxilos (Figura 2).

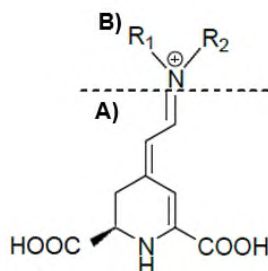


Figura 2. Fórmula general de la betalaína. A) Ácido betalámico presente en todas las moléculas de betalaínas. B) La estructura puede representar a betacianinas o betaxanthininas dependiendo de la identidad de los residuos (Khan 2015).

Las betalaínas son derivados del ácido betalámico [4- (2-oxoetilideno) 1,2,3,4-ácido tetrahidropiridin-2,6-dicarboxílico]. La condensación de esta estructura con aminas y/o sus derivados generan betaxanthininas amarillas (del latín: beta = remolacha, griego: xanthos = amarillo) y por otra parte la condensación del ácido betalámico con ciclodopa [ciclo-3- (3,4-dihidroxifenilalanina)] o sus derivados de glucosilo dan lugar a betacianinas violetas (del latín: beta = remolacha, griego: kyaneos = azul) (Khan, 2015).

Las betacianinas son estructuras que presentan algunas variaciones en los grupos acilos y restos de azúcar mientras que las betaxanthinas exhiben restos de dihidropiridinas mostrando conjugados con aminas y aminoácidos (Figura 3).

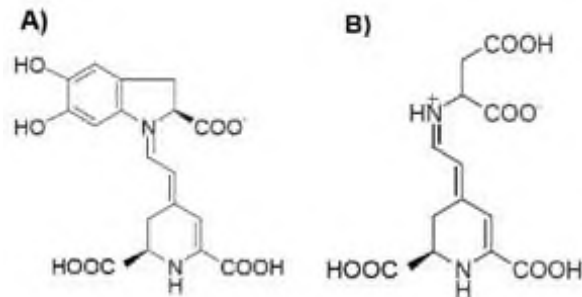


Figura 3. Estructura química de betalainas. **A)** Betanidina (ejemplo de betacianinas). **B)** Miraxanthina II (ejemplo de betaxanthinas) (Strack *et al.* 1993).

2.4.2 Funciones en las plantas.

La función de las betalainas en las plantas es diversa: están implicadas en la propagación de plantas a través de la transferencia de polen o la dispersión de semillas indigeribles por animales que son atraídos por el color de las flores y frutas (Stintzing *et al.* 2004) sin embargo, en ocasiones funcionan como una señal repelente para disuadir a los herbívoros; se encargan de proteger el tejido contra la dañina radiación ultravioleta (UV) (Niveyro *et al.*, Shao *et al.* 2013). También de aumentar la resistencia a patógenos y mejorar la defensa contra virus; proporcionan una mayor tolerancia a estrés por calor; como osmorreguladores del conjunto de aminoácidos de betaxanthinas, entre otras funciones (Graca, 2018).

2.4.3 Actividad biológica.

Las betalainas, particularmente la gomfrenina de tipo rojo-violeta, betacianinas y amarillo betaxanthinas, tienen una fuerte actividad antioxidante en comparación con los estándares tradicionales como son el ácido ascórbico, la rutina y la catequina. Su estructura química les confiere su actividad antioxidante: la capacidad de captar

radicales libres aumenta con la cantidad de grupos hidroxilo y grupos imino y disminuye con más glucosilación de agliconas en la molécula. La capacidad de atrapar radicales libres, como los radicales libres de peróxido (ROO) u óxido nítrico (NO), por algunos las betacianinas también depende del número de hidroxilos (Taira *et al.* 2015). Poseen también actividad antiinflamatoria dado que la lipoxigenasa (LOX) y la ciclooxigenasa (COX) son enzimas que están involucradas en la conversión de ácido araquidónico a mediadores inflamatorios, leucotrienos y prostaglandinas, que son mediadores antiinflamatorios (Kanner *et al.* 2001).

En diferentes estudios, la betanina y el extracto de remolacha roja rico en betalaína han inducido la enzima de fase II quinina reductasa. Esta actividad está relacionada con el efecto hepatoprotector de estos pigmentos (Szaefer *et al.* 2014). Además, los extractos de *Amaranthum tricolor* que contienen betalaínas tienen el potencial de reducir el colesterol en sangre, niveles de triglicéridos y LDL lipoproteínas de baja densidad, aumentando el nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL), teniendo así un elevado potencial de prevenir trastornos cardiovasculares (Gengatharan *et al.* 2015). Por otra parte, la actividad antimalárica del extracto de amaranto rico en betanina de *Amaranthus spinosus* en ratones se ha atribuido a la capacidad de estos pigmentos para quelar los cationes internos Ca^{2+} , Fe^{2+} y Mg^{2+} bloqueando así el transporte intracelular de colina del parásito (Hilou *et al.* 2006). Se han encontrado otros atributos *in vitro* e *in vivo* para betalaínas tales como antidiabético, antitumoral y como regulador de las disfunciones metabólicas (Reddy *et al.* 2015).

2.4.4 Biosíntesis y factores que influyen en la biosíntesis.

Las reacciones iniciales de la biosíntesis de las betalaínas fueron elucidadas mediante experimentos de marcaje isotópico con tirosina y 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). Demostrándose así que el esqueleto completo de tirosina era incorporado en el ácido betalámico y ciclo-DOPA (Liebisch *et al.*, 1969; Fischer y Dreiding, 1972). La Figura 4 muestra la ruta de biosíntesis de betalaínas. Éste incluye tres enzimas fundamentales: tirosinasa, DOPA 4,5-dioxigenasa y betanidina glucosiltransferasa. La ruta se inicia por

la hidroxilación de tirosina a DOPA y la oxidación posterior de ésta a su oquinona, mediante la acción de la enzima tirosinasa, utilizando oxígeno molecular. La ciclación espontánea conduce a ciclo-DOPA (leuko-DOPAcromo), proponiéndose que éste reaccionase entonces con una molécula de ácido betalámico por condensación para formar betanidina (Piattelli, 1981; Schliemann *et al.* 1998). Este compuesto puede ser considerado como la unidad estructural de la mayoría de las betacianinas y es transformado en betanina por una betanidina-5-O-glucosiltransferasa (Vogt *et al.* 1999; Hans *et al.* 2004). Posteriores glicosilaciones y/o acilaciones, principalmente con ácidos hidroxicinámicos, pueden conducir a oligoglicósidos acilados de betanidina. Una condensación de ácido betalámico con aminoácidos, análoga a la experimentada con ciclo-DOPA en las betacianinas, ha sido propuesta como etapa clave en la síntesis de betaxantinas (Schliemann *et al.* 1999), siendo ambas espontáneas.

En la ruta propuesta para la biosíntesis del ácido betalámico (Figura 4), éste se sintetiza a partir de DOPA por acción de la enzima DOPA 4,5- dioxigenasa (Chang *et al.*, 1974). Esta enzima abre el anillo aromático para formar 4,5-seco-DOPA que recicla espontáneamente por condensación intramolecular formando ácido betalámico.

Entre las principales betacianinas que se han reportado se encuentran la betanina, amarantina, gomfrenina y bougainvilleina (Strack *et al.* 2003) pertenecientes al orden Caryophyllales, en donde se encuentra la familia Amaranthaceae (Cai *et al.* 2005). El color de la betacianinas no depende del pH, pero en presencia de oxígeno tienen mayor estabilidad a pH entre 5.5 a 5.8 (Tanaka *et al.* 2008; Khan 2015). Sin embargo, la producción de betacianinas se ve ampliamente afectada por factores ambientales como es el estímulo de luz, dado que la síntesis de estas está regulada por fitocromos (Sakuta, 2014), así como por la temperatura y la actividad de agua (Khan 2015). No obstante, la biosíntesis de betacianinas también se ve afectada por factores fisiológicos como son la oxidación y las cascadas de señalización de Ca²⁺ (Khan & Giridhar, 2015).

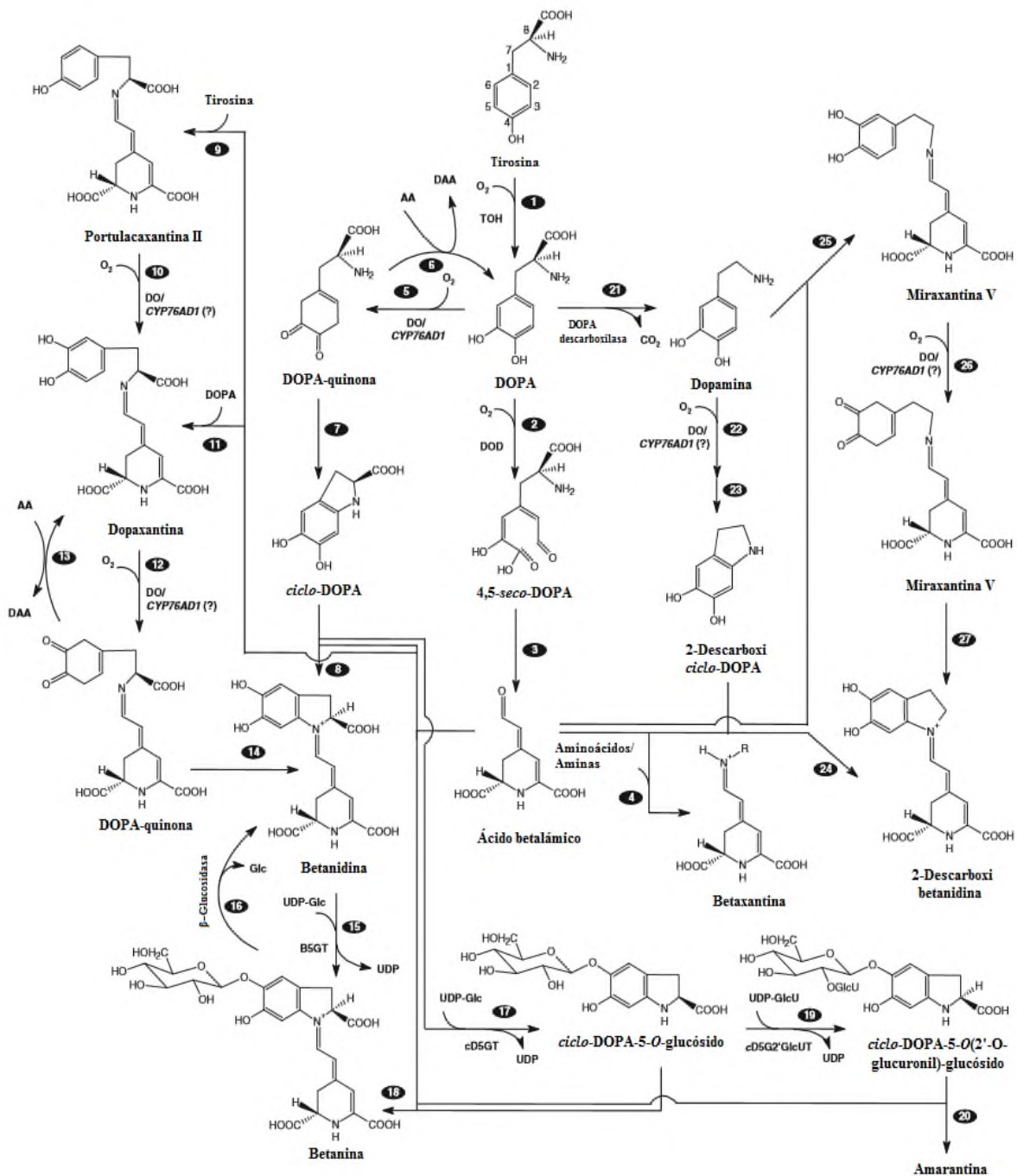


Figura 4. Ruta de biosíntesis de betalínas. Reacciones 3, 7, 14, 23, 27 ciclación espontánea; reacciones 4, 8, 9, 11, 18, 20, 24, 25-espontánea de condensación de base de Schiff; B5GT-betanidin-5-O-glucosiltransferasa; B6GT-betanidin-6-Oglucosiltransferasa; cD5GT-ciclo-DOPA-5-O-glucosiltransferasa, cD6GT-ciclo-DOPA-6-O-glucosiltransferasa, cD5G20GlcUT-ciclo-DOPA-5-glucosa-20-O-glucuroniltransferasa, DO-difenol oxidasa; DOD-DOPA dioxigenasa; Glc-glucosa; TOH-tirosina hidroxilasa; UDP-uridina-50-difosfato (Khan & Girdha, 2015).

Por otro lado, los reguladores de crecimiento son de gran importancia puesto que también afectan la producción de betacianinas, como sucede con BAP (6-bencil amino purina), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), IAA (ácido indol-3-acético) (Khan & Giridhar, 2015), KIN (6- furfuryl amino purina), ANA (ácido naftalenacético), GA3 (ácido giberélico) y ácido abscísico (Sakuta, 2014), como se puede apreciar en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de reguladores de crecimiento en la producción de betalainas.

Regulador de crecimiento	Concentración	Planta	Metabolito	Referencia
IAA	4.5 µm	<i>Portulaca sp.</i>	Betacianinas	Bhuiyan <i>et al.</i> 2002
2,4 D KIN	0.5 mg/L 0.1-1.0mg/L	<i>B. vulgaris</i>	Betaxanthinas	Trejo <i>et al.</i> 2008
BAP	1.0 mg/L	<i>Z. decandra</i>	Betacianinas	Radfar <i>et al.</i> 2012
IBA KIN	0.5 mg/L 1.0 mg/L	<i>Z. decandra</i>	Betacianinas	Radfar <i>et al.</i> 2012
2,4 D KIN	0.5 mg/L 0.02 mg/L	<i>G. globosa</i>	Betacianinas	Méndez 2017

2.5 Compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, flavonoides y fenilpropanoides.

2.5.1 Características químicas.

Los compuestos fenólicos en plantas son moléculas producto del metabolismo secundario de estas, los cuales pueden actuar como antioxidantes, lo que se relaciona con sus propiedades redox, que pueden jugar un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres (Alviano *et al.* 2008; Duros *et al.* 2008). Pueden clasificarse de la siguiente manera:

- a. Ácidos fenólicos: son compuestos polifenólicos no flavonoides de dos tipos principales: ácidos benzoicos y derivados del ácido cinámico sobre la base de C1-C6 y columnas vertebrales C3-C6.

- b. Flavonoides: Compuestos que tienen la estructura general C₆-C₃-C₆. En donde C₆ del anillo A y B son de naturaleza fenólica. Este grupo se puede subdividir en antocianinas, flavon-3-oles, flavonas, flavanonas, chalconas y flavonoides.
- c. Fenilpropanoides: son compuestos que tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide (un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos). Ejemplos: ácido trans-cinámico, ácido p-cumárico, y sus derivados como el ácido cafeico. Las lactonas son otro tipo de fenilpropanoides (o "ésteres cíclicos"), también llamadas cumarinas, las cuales poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano está ciclado. Un ejemplo es la umbeliferona (una cumarina simple).

2.5.2 Funciones en las plantas.

Los fenoles son metabolitos secundarios de gran importancia en el crecimiento y reproducción de las plantas. La producción de compuestos fenólicos está ligada como respuesta a factores ambientales (Ghasemzadeh, 2011). En el reino vegetal se conocen más de 8000 estructuras fenólicas, y debido a su gran diversidad y variedad de polifenoles en las plantas, existen varias clasificaciones de acuerdo a su fuente de origen, función biológica y estructura química. Los compuestos fenólicos son moléculas que pueden actuar como antioxidantes, es decir, juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres expresados bajo condiciones de estrés en una planta buscando asegurar la supervivencia de la misma. Actúan como protectores de la radiación ultravioleta y forman pigmentos antocianinas, flavonas y flavonoles). Intervienen como reguladores de interacciones entre plantas y microorganismos. Pueden atraer polinizadores (Alviano *et al.* 2008; Meot-Duros *et al.* 2008).

2.5.3 Actividad biológica.

La producción de fenoles está relacionada con condiciones desfavorables en el cultivo (Matkowski, 2008), sin embargo, son de gran importancia por su actividad antioxidante. Esta actividad ha sido ampliamente estudiada en diversas plantas, entre las que se encuentran especies pertenecientes a la familia *Amaranthaceae*.

Los compuestos fenólicos son moléculas que pueden actuar como antioxidantes, lo que se relaciona con sus propiedades redox, que pueden jugar un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres (Alviano *et al.* 2008; Meot-Duros *et al.* 2008). Previenen enfermedades del corazón (Hoye *et al.* 2008; Wijngaard *et al.* 2009; Jin y Mumper, 2010), poseen actividad antiinflamatoria (Zhang *et al.* 2011; Mohanlal *et al.*, 2013), anticancerígena (Slivova *et al.* 2005; Ramos, 2008; Pieme *et al.* 2010; Sawadogo *et al.* 2012), hipoglucemiante (Kusirisin *et al.* 2009) (Sawadogo *et al.* 2012), antifúngica (Singh *et al.* 2014), antihipertensiva (Skeggs *et al.* 1956).

La Tabla 5 muestra algunas otras actividades biológicas de los compuestos fenólicos presentes en *G. globosa*.

Tabla 5. Actividad biológica de compuestos fenólicos de *G. globosa*.

Metabolitos	Actividad biológica	Referencia
Fenólicos	Antiinflamatoria (condiciones inflamatorias crónicas en los ovarios)	Andrade <i>et al.</i> 2012;
Flavonoides	Hepatoprotectora	Salvador <i>et al.</i> 2012
Flavonoides	Anticancerígena (carcinoma de Ehrlich)	Muhammad <i>et al.</i> 2013
Cumarinas	Efecto cardiovascular (disminuye la hipertensión)	Muhammad <i>et al.</i> 2013
Flavonoides	Coagulante de la sangre.	Muhammad <i>et al.</i> 2013

2.6 Cultivo *in vitro* de raíces adventicias para la producción de metabolitos secundarios.

En las plantas superiores, el sistema radicular está compuesto de raíces primarias, laterales y adventicias. Los explantes derivados de tejido foliar, hipocotílico, nodal y radicular estimulan la formación de raíces adventicias y laterales, respectivamente.

Las raíces adventicias *in vivo* se originan en el parénquima del floema y, por lo tanto, no están asociadas con raíces primarias o secundarias (Lovell & White, 1986). Las raíces adventicias y laterales son las raíces posembrionarias, en contraste con las raíces primarias embrionarias. Las raíces adventicias y laterales cubren la mayor parte del sistema radicular y pueden cambiar la arquitectura del sistema radicular en respuesta a los cambios en el ambiente, como los cambios en la disponibilidad de nutrientes o agua (López-Bucio *et al.*, 2003; Li *et al.* 2009)). Se ha establecido que la auxina es transportada y acumulada en los extremos basales y desempeña un papel estimulante en la formación de raíces adventicias (Maldiney *et al.*, 1986, Label *et al.* 1989). En consecuencia, los explantes, en condiciones apropiadas, producen raíces adventicias que dan como resultado un nuevo sistema de raíces y una planta completa. Las raíces adventicias pueden surgir espontáneamente o ser inducidas por factores ambientales y químicos (Barlow, 1986). El estudio de la formación de raíces adventicias es importante para comprender y controlar el desarrollo de la raíz y la propagación vegetativa. La mayoría de las investigaciones sobre enraizamiento adventicio se han centrado en los eventos fisiológicos y bioquímicos relacionados con la iniciación de la raíz, el desarrollo y varias vías metabólicas que implican la biosíntesis de metabolitos secundarios específicos, aunque en las plantas estos fitoquímicos pueden almacenarse en otros órganos (Dewick 2002).

En cultivo *in vitro*, el desarrollo del cultivo de raíces resulta tanto de la formación de raíz laterales como de su elongación. Las raíces laterales se originan del primordio de la raíz, luego hay crecimiento del primordio y emergencia (Ermel *et al.* 2000; Li *et al.* 2009). El crecimiento de la punta es lineal y puede ser medido en unidades de longitud por tiempo. En el cultivo de raíces el incremento en biomasa exponencial resulta de la

formación de la raíz lateral y un consecuente incremento exponencial en el número de puntas alargadas (Dodds & Roberts, 1985).

Existen dos tipos principales de cultivos de raíces. El primero, son los cultivos de raíces adventicias o “no transformadas”, éstas son obtenidas de forma tradicional con o sin regulador de crecimiento (auxina). Las auxinas que se usan son: ácido indolbutírico (IBA) y ácido 3-indolacético (IAA). La respuesta a las auxinas es el efecto en la elongación, la estimulación de la formación de las raíces laterales y la liberación del etileno estimulada por la auxina (Fukaki *et al.* 2007; Ivanchenko *et al.* 2008). Las raíces adventicias pueden ser inducidas *in vitro* a partir de diversos explantes, incluyendo las hojas, las raíces, el tallo, el peciolo, etc., y diversos factores como las auxinas, el óxido nítrico y la luz han demostrado afectar la morfogénesis de las raíces adventicias (Kim *et al.* 2003; Tewari *et al.* 2008; Baque *et al.* 2010).

El segundo tipo de cultivos de raíces son las “transformadas” o “raíces peludas”, las cuales resultan de la infección y la posterior transformación genética de tejidos vegetales por el patógeno bacteriano del suelo: *Agrobacterium rhizogenes*. La transformación ofrece células que proliferan hacia el crecimiento de raíz. En cualquiera de los dos tipos de cultivo, las raíces se obtienen por la inoculación de las puntas en medio líquido, éstas pueden obtenerse de las raíces de las plántulas germinadas *in vitro* o de raíces inducidas de otro tejido de la planta, callos o agregados celulares (Dodds & Roberts, 1985).

El cultivo de raíces *in vitro*, por su grado de especialización y organización celular pueden sintetizar y/o acumular metabolitos secundarios de interés farmacológico, representando una alternativa a la extracción directa de la planta (Matkowski, 2008; Lubbe & Verpoorte, 2011), por ello han sido motivo de estudio algunos factores que influyen en la producción de dichos metabolitos, como son: el tamaño del inóculo, medio basal, fuente de carbono, en especial la concentración de sacarosa, el uso de reguladores de crecimiento o hasta el uso de elicitores (Qu *et al.* 2011) (Tabla 6).

Tabla 6. Factores optimizados en cultivos de raíces adventicias para la producción de metabolitos secundarios.

Especie vegetal	Inóculo	Medio basal	Fuente de carbono	RCV	Metabolito (s)	Referencia
<i>Echinacea angustifolia</i>	10 g L ⁻¹	0.5 MS con 5:25 mM amonio/nitrato	50 g L ⁻¹ sacarosa	2 mg L ⁻¹ IBA	Fenoles	Wu <i>et al.</i> 2006
<i>Angelica gigas</i> Nakai	6 g L ⁻¹	0.5 SH	40 g L ⁻¹ sacarosa	--	Piranocumarinas	Xu <i>et al.</i> 2009
<i>Withania somnifera</i>	10 g L ⁻¹	0.5 MS	20 g L ⁻¹ sacarosa	0.5 mg L ⁻¹ IBA	Withanólido A	Murthy & Praveen, 2013
<i>Morindia citrifolia</i>	15 g L ⁻¹	1.5 MS	10 g L ⁻¹ sacarosa	5 mg L ⁻¹ IBA	Antraquinonas, fenoles y flavonoides	Baque <i>et al.</i> 2014
<i>Panax ginseng</i>	5 g L ⁻¹	0.5 MS	50 g L ⁻¹ sacarosa	5 mg L ⁻¹ IBA	Ginsenósidos	Murthy <i>et al.</i> 2014
<i>Polygonum multiflorum</i>	5 g L ⁻¹	MS	50 g L ⁻¹ sacarosa	2 mg L ⁻¹ IBA	Fenoles y flavonoides	Lee <i>et al.</i> 2015
<i>Eurycoma longifolia</i>	5 g L ⁻¹	0.75 MS	30 g L ⁻¹ sacarosa	9 mg L ⁻¹ IBA	Fenoles y Flavonoides	Lulu <i>et al.</i> 2015

ANA: ácido 1-naphthaleneacético, B5: Gamborg's B5, BAP: 6-bencilaminopurina, IBA: ácido indol 3-butírico, MS: Murashige & Skoog SH: Schenk & Hidebrandt

2.7 Cultivo de raíces u órganos *in vitro* como fuente de betalaínas, compuestos fenólicos y flavonoides.

Los reportes acerca de la producción de betalaínas, compuestos fenólicos y flavonoides en cultivos de raíces adventicias en Amarantáceas son escasos particularmente en el género *Gomphrena*. En el Tabla 7 se muestran algunas referencias de la producción de dichos metabolitos en cultivo de raíces adventicias en varias especies vegetales.

Tabla 7. Cultivos de raíces adventicias productores de betalainas y compuestos fenólicos.

Especies vegetales	Metabolito	Concentración obtenida (mg/g E.S)	Referencia
<i>Beta vulgaris</i>	Betaxantina y betacianinas	26.2 y 16	Pavlov <i>et al.</i> 2005
<i>Echinacea purpurea</i>	Fenoles	19.21	Chun-Zhao <i>et al.</i> 2006
<i>Morinda citrifolia</i>	Fenoles y flavonoides	29.46 y 60.23	Baque <i>et al.</i> 2009
<i>Hypericum perforatum L.</i>	Fenoles y flavonoides	55.25 y 42.61	Cui <i>et al.</i> 2010
<i>Oldenlandia umbellata L.</i>	Fenoles	24.33	Saranya & Siril 2018

2.8 Antecedentes de cultivo *in vitro* de *G. globosa*.

A pesar de que existen escasos estudios de cultivo *in vitro* en el género *Gomphrena* se han reportado varios estudios dentro de la tribu *Gomphreneae*. En el Tabla 8 se muestra algunas de las especies reportadas en donde se ha realizado cultivo *in vitro*.

En relación con cultivos de raíces o inducción de estas en cultivo *in vitro*, los reportes también son escasos. Mercier *et al.* (1992) reportaron que los brotes de *G. officinalis* mostraron una producción masiva de raíces en medio MS suplementado con sacarosa y 10 gL⁻¹ de IBA en 15 días.

En el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan (Méndez, 2017), observó la formación de raíces en plántulas de *G. globosa* en medio MS y/o B5 sin reguladores de crecimiento y la inducción de rizogénesis en explantes de hipocotilos en medio B5 usando 0.02 mgL⁻¹ de ANA y 01 mg L⁻¹ de KIN y con el medio MS bajo dos combinaciones de ANA y KIN (0.02 mg L⁻¹:0.1 mg L⁻¹ y de 0.1 mg L⁻¹:1.0 mgL⁻¹), todas estas raíces fueron de color blanco y con alto grado de oxidación, lo que conllevó a la muerte de los cultivos.

Tabla 8. Cultivo *in vitro* de algunas especies pertenecientes a la tribu *Gomphreneae*.

Especie	Explante	Cultivo obtenido	Condiciones de cultivo	Finalidad de cultivo	Referencia
<i>G. macrocephala</i>	Semilla	Plántulas	MS, sacarosa y fitagel	Micropropagación	Moreira <i>et al.</i> (2000)
<i>G. globosa</i> L.	Semilla	Callo con regeneración parcial de órganos (raíz y brotes) y sin regeneración	MS, sacarosa, mio-inositol, tiamina, agar, BAP, NAA, GA ₃ .	Micropropagación	Ghaffar <i>et al.</i> (2007)
<i>A. sessilis</i>	Hojas	Callo, brotes y raíces	sacarosa, 2, 4-D, BAP, IAA, IBA	Producción de pigmentos	Singh <i>et al.</i> (2009)
<i>A. philoxeroides</i>	Segmentos nodales	Plántulas	MS, sacarosa, tirosina, agar	Producción de pigmentos	Kleinowski <i>et al.</i> (2014)
<i>A. brasiliana</i> , <i>A. philoxeroides</i> , <i>A. sessilis</i> , y <i>A. tenella</i>	Segmentos nodales	Plántulas	MS, sacarosa, agar e inositol.	Micropropagación	Reis <i>et al.</i> (2015)
<i>G. globosa</i>	Semilla	Plántulas	MS (4.4 gL ⁻¹), Sacarosa y Phytigel	Micropropagación	Méndez (2017)
<i>G. globosa</i>	Hipocótilos de plántulas <i>in vitro</i>	Callos friables	B5, sacarosa, 2,4D, KIN (0.5 mgL ⁻¹)	Fenoles (ácido ferúlico) y Betalaínas	Méndez (2017)
<i>G. globosa</i>	Callos friables	Suspensiones celulares	B5, sacarosa, 2,4D, KIN (0.5 mgL ⁻¹)	Fenoles (ácido ferúlico) y Betalaínas	Méndez (2017)
<i>G. globosa</i>	Semillas sintéticas a partir hipocótilos	Plántulas	MS (4.4 gL ⁻¹), Sacarosa y Fitagel.	Fenoles, Flavonoides y Betalaínas	Cruz (2017)
<i>G. globosa</i>	-	Plántulas bajo estrés con MeJA	MS (4.4 gL ⁻¹), Sacarosa y Fitagel.	Fenoles, Flavonoides y Betalaínas	Urdiana (2019)
<i>G. globosa</i>	Tallos a partir plántulas <i>in vitro</i>	Raíces transformadas	MS (4.4 gL ⁻¹), Sacarosa y Fitagel.	Fenoles, Flavonoides y Betalaínas	Cohetero (2019)

MS: Murashige & Skoog, B5: medio Gamborg, BAP: xxx; ANA: xxx; KIN: xxx; 2,4D: xxx; MeJA: metil jasmonato

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas han sido usadas ampliamente por el hombre como alimento, colorantes, saborizantes y en la medicina tradicional debido a que producen una gran gama de compuestos bioactivos. *Gomphrena globosa* acumula principalmente betalaínas y compuestos fenólicos. Las betalaínas han sido utilizadas por la industria como pigmentos y presentan actividad biológica tales como antiinflamatoria, anticancerígena, hepatoprotectora y de efecto cardiovascular. Por otro lado, los compuestos fenólicos tienen gran relevancia por su poderosa actividad antioxidante frente a la sobreproducción de radicales libres con la capacidad de inducir distintos padecimientos que conllevan al daño celular como el cáncer, diabetes, Parkinson y Alzheimer.

En los últimos años se ha incrementado el interés comercial sobre las betalaínas y compuestos fenólicos, siendo necesario que se desarrollen estrategias biotecnológicas para incrementar su producción /o acumulación cubriendo así la necesidad de una fuente productora de estos metabolitos disponible en cualquier época del año. En cultivos de tejidos vegetales se ha demostrado que la adición de reguladores de crecimiento como el ácido indol butírico (IBA) y el efecto de la concentración de la fuente de carbono (sacarosa) favorece así la producción de metabolitos secundarios. Por lo tanto, el cultivo de raíces *in vitro* de *G. globosa* puede ser una alternativa para la producción de compuestos fenólicos y betalaínas los cuales pueden ser usados como principios activos de uso farmacéutico.

4. HIPÓTESIS

Los cultivos *in vitro* de raíces adventicias de *Gomphrena globosa* incrementarán la producción de betalaínas y compuestos fenólicos al ser tratados con diferentes concentraciones de ácido indol butírico (IBA) y sacarosa.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Establecer condiciones de cultivo y de estimulación que favorezcan el crecimiento y la producción de betalaínas y compuestos fenólicos en cultivos *in vitro* de raíces de *Gomphrena globosa*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto del medio MS y B5 para la inducción de raíces *in vitro* de *G. globosa* y caracterizar su comportamiento cinético.
2. Evaluar el efecto de la concentración de IBA en el crecimiento y la producción de compuestos fenólicos y betalaínas en cultivo de raíces de *G. globosa*.
3. Determinar el efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento y la producción de compuestos fenólicos y betalaínas en cultivo de raíces de *G. globosa*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Material Vegetal.

Se utilizaron cultivos de plántulas *in vitro* de *G. globosa* de 21 días de edad establecidas por Méndez (2017) en el laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan como fuente de explantes.

6.2 Cultivo de raíces en medio sólido.

Los cultivos *in vitro* de raíces adventicias se iniciaron a partir explantes de raíces de plántulas *in vitro* de *G. globosa*. Para ello, las raíces de plántulas fueron separadas y se transfiriendo 10 puntas de raíces de 1.0 cm de longitud, aproximadamente, de forma aséptica a placas de Petri ($\varphi \times h = 15 \text{ mm} \times 90 \text{ mm}$) con 20 mL en medio Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968). suplementado con 30 gL^{-1} de sacarosa sin fitorreguladores y 2.5 gL^{-1} de phytigel, como agente gelificante. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de esterilizar. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones de fotoperiodo 16h/8/h (luz/oscuridad) a $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 21 días.

Los pesos frescos y secos (P.F y P.S, respectivamente) de las raíces adventicias y la producción de compuestos bioactivos (betalaínas, compuestos fenólicos y flavonoides) se cuantificaron después de 21 días de cultivo.

6.3 Obtención de cultivo de raíces en medio líquido.

Los cultivos de raíces de *G. globosa* en medio líquido se establecieron inoculando 10 segmentos de puntas de raíces de aproximadamente de 1.0 cm de longitud. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y en medio Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968) suplementado con 30 gL^{-1} sacarosa sin fitorreguladores. Las raíces se subcultivaron cada 20 días durante 3 meses. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 110

rpm a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ bajo condiciones de fotoperiodo 16h/8/h (luz/oscuridad). y se le cuantificó su crecimiento celular cada 3 días durante 30 días.

6.4 Crecimiento, conductividad eléctrica y consumo de sacarosa.

6.4.1 Crecimiento celular y conductividad eléctrica.

La biomasa de las raíces se separó del medio de cultivo por filtración utilizando un embudo Buchner con un papel filtro (Whatman No. 1) la biomasa se colocó en tubos de 15 mL (marca Axigen) de peso conocido. Así se registró el peso fresco en cada muestra. Las muestras filtradas se liofilizaron a 0.133 mbar en liofilizadora (Freezone Labconco) durante 72 h hasta obtener el peso constante. El peso seco se obtuvo por diferencia entre el peso seco de la muestra más el tubo menos el peso del tubo. La conductividad eléctrica fue medida en el medio de cultivo utilizando un conductímetro.

6.4.2 Índice de crecimiento.

El índice de crecimiento (IC), se determinará mediante la ecuación:

$$IC = \frac{P_f}{P_i} \quad (1)$$

Donde:

IC= Índice de crecimiento

P_f = Valor del peso seco al final o toma de muestra durante el experimento

P_i = Valor del peso seco al inicio del experimento

6.4.3 Determinación de sacarosa residual.

La determinación de sacarosa residual se realizó por la metodología propuesta por (Dubois *et al.* 1956). La cantidad de azúcares totales se calculó utilizando una curva de calibración de sacarosa de 0-200 mg/L (Anexo 1). Para la cuantificación de azúcares totales en las muestras del medio de cultivo se diluyó con agua hasta alcanzar concentraciones menores a 200 mg/L. Posteriormente, a 1 mL de la solución

de medio se le adicionó 1 mL de fenol al 5 % y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado al 98 %. Después se dejó reposar la muestra durante 30 min y finalmente fue leída a una absorbancia de 490 nm

6.5 Parámetros cinéticos.

6.5.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación.

Para caracterizar el crecimiento de los cultivos, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial. Para esto, se realizó una gráfica de los logaritmos naturales de los valores de peso vs el tiempo de cultivo, en donde la región lineal se obtiene la pendiente de la recta, la cual corresponde a la velocidad de crecimiento (Qu *et al.* 2011). Posteriormente se calculó el tiempo de duplicación (t_d) teniendo como base la siguiente ecuación:

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

Donde:

t_d = tiempo de duplicación.

μ = velocidad específica de crecimiento en la fase exponencial.

6.5.2 Determinación de los rendimientos biomasa/sustrato y producto/biomasa.

El rendimiento biomasa/sustrato dado en g de biomasa producida por gramos de sustrato consumido ($Y_{X/S}$) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{X/S} = X/S \quad (3)$$

Donde:

X= biomasa generada

S= sustrato consumido.

Por otra parte, el rendimiento producto/biomasa dado en g de producto generado por biomasa generada ($Y_{P/X}$) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{P/X} = P/X \quad (4)$$

Donde:

P= producto generado.

X= biomasa producida.

6.6 Efecto de la concentración de IBA y sacarosa en el crecimiento de raíces y producción de compuestos bioactivos de *G. globosa*.

6.6.1 Efecto de la concentración del ácido indol butírico (IBA).

Se utilizaron matraz Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL para estudiar el efecto de la concentración de ácido indol butírico (IBA, 9.9, 24.6 y 49.3 μM) sobre el crecimiento de raíces adventicias y la acumulación de compuestos bioactivos. Para ello, se inocularon 1.0 g de peso fresco de raíces de 20 días de edad. Las condiciones de luz y temperatura se mantuvieron constante ($15.17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16h/8/h luz/oscuridad y $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente). Con agitación orbital de 110 rpm. La toma de muestra se realizó cada tercer día durante 30 d de cinética. El experimento se realizó por triplicado.

6.6.2 Efecto de la concentración de sacarosa.

Se utilizaron matraz Erlenmeyer de 125 mL con un volumen de trabajo de 25 mL para estudiar el efecto de las concentraciones de sacarosa (10, 20, 30, 40, 50 y 60 g L^{-1}) utilizando 30 g L^{-1} como control, sobre el crecimiento de raíces adventicias y la acumulación de compuestos bioactivos bajo las condiciones de IBA (2 y 10 μM)

Para ello, se inocularon 1.0 g de P.F de raíces de 20 días de edad. Las condiciones de luz y temperatura se mantuvieron constante ($15.17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16h/8/h luz/oscuridad y $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente). Con agitación orbital de 110 rpm. La toma de muestra se realizó cada tercer día durante 30 d de cinética. El experimento se realizó por triplicado.

6.6 Análisis químico de compuestos bioactivos

6.6.1 Extracción y cuantificación de betalaínas.

Para la extracción de betalaínas se realizó en base a lo reportado por Silva *et al.* (2012). Para ello, se realizó una extracción acuosa de 1 g de material de raíces de *G. globosa* liofilizado con 50 mL de agua durante 30 min a 400 rpm a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se centrifugó a $1000 \text{ g}/4^\circ\text{C}/10 \text{ min}$. El pellet se re-extrajo con 200 mL de agua. El extracto acuoso se filtró y se purificó con cloroformo (3 x 50 mL).

La cuantificación de betalaínas de los extractos se realizó en un espectro (UV/VIS) de nuestro extracto de una solución de 15 mg/mL de extracto seco y se leyó la absorbancia a 536 nm. Todas las muestras se leyeron por triplicado. La cantidad de betalaínas se expresó en equivalentes de amarantina (EA) y se calculó usando la ecuación 3 (Silva *et al.* 2012):

$$A_{\text{cd}} = A_{536} \text{PMV} / \epsilon \text{LPS} \quad (5)$$

Donde:

A_{536} : absorbancia obtenida para cada extracto.

PM: peso molecular (726.6 g/mol).

V: volumen de la solución del extracto.

ϵ : coeficiente de absorción molar ($5.66 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$).

L: longitud de trayectoria de la celda.

PS: peso seco del extracto

6.6.2 Extracción y cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

Para la extracción de fenoles y flavonoides se utilizó la metodología reportada por (Silva *et al.* 2012) con modificaciones Para ello, 5 g de biomasa liofilizada de *G. globosa* se extrajeron con 250 mL de agua durante 5 min en un baño de agua caliente. Luego se procede a sonicar las muestras durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se centrifugará a 10000 rpm/4°C/10 min. El pellet se descartará y el sobrenadante será liofilizado hasta sequedad y conservado a 4°C.

Para la determinación de fenoles totales, se empleó el método de Folin-Ciocalteu, que aprovecha la capacidad de los fenoles de unirse a radicales libres y de quelación de iones metálicos gracias a la estructura que poseen (anillo aromático con más de un grupo hidroxilo) (Singleton *et al.* 1974). La cantidad de fenoles totales se calculó utilizando una curva de calibración de ácido gálico de 0 - 1000 ppm (Anexo 2) y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (E.AG/ g PS) (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004).

La cantidad de los flavonoides se calculó utilizando una curva de calibración de quercetina de 0 - 150 ppm (Anexo 3) y los resultados se expresaron en equivalentes de Quercetina (EQ/ g PS). La cuantificación de flavonoides en los extractos se realizó en un espectro (UV/VIS), de la siguiente forma. Primero se agregó 300 µL del extracto, una solución de 15 mg/mL de extracto seco al cual se le adicionó 1.5 ml de agua desionizada, luego se adicionó 75 µL de nitrito de sodio al 5% dejando reposar por 6 min a temperatura ambiente, en seguida se agregaron 150 µL de tricloruro de aluminio al 10%, posteriormente se adicionó 500 µL de hidróxido de sodio 1M, finalmente se adiciono 2.5 mL de agua desionizada dejando reposar por 30 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 490 nm. Todas las muestras se realizaron por triplicado (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004).

6.6.3 Detección de compuestos bioactivos por HPLC.

Los análisis cromatográficos se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por (Ferrerres *et al.* 2011) con diferentes modificaciones. Brevemente, la separación se llevó a cabo en una columna Luna C18 (250 mm de longitud × 4.6 mm de diámetro, 5 µm de tamaño de partícula, Phenomenex, Macclesfield, UK). La fase móvil consistió en dos solventes: ácido acético al 1% (A) y metanol (B), iniciando con 20 % B y usando un gradiente hasta obtener 50 % a los 18 min, 80 % a los 19 min y 20 % a los 20 min. Se utilizó un flujo de 0.21 mL/min con una temperatura de 40 °C y un volumen de inyección de 10 µL. La adquisición de datos espectrales se llevó a cabo en un rango de 200 a 600 nm y se capturaron los cromatogramas a 280 nm para fenoles y flavonoides y 536 nm para betalaínas. Los análisis UHPLC-DAD se llevaron a cabo en un equipo Acquity Arc (Waters) equipado con bomba cuaternaria, desgasificador, auto muestreador, horno de columna y detector de arreglo de diodos. El sistema UHPLC-DAD fue controlado por el programa Empower 3 (Waters).

Se compararon los tiempos de retención de los picos encontrados en los cromatogramas de los diferentes extractos de los cultivos de raíces *in vitro* de *G. globosa* con diferentes estándares de compuestos fenólicos y flavonoides tales como el ácido clorogénico, el ácido ferúlico, el ácido gálico, el ácido cinámico, el ácido 3 – hidroxicinámico, el ácido 2 – hidroxicinámico, el ácido siríngico, el ácido protocatecuico y la quercetina. Para las betalaínas se utilizó como estándar amarantina.

6.7 Análisis estadístico.

Los datos se analizaron por Anova de una vía y se realizó prueba de comparaciones múltiples por Tukey, con un nivel de significancia del 5 % para todas las pruebas estadísticas. El análisis estadístico se desarrolló con el programa estadístico Minitab 17 versión 1.0.0.1.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de los métodos de cultivo sobre la biomasa de raíces adventicias y la acumulación de compuestos bioactivos.

Se obtuvieron cultivos de raíces adventicias en medio sólido y líquido en medio B5, y se procedió a comparar la biomasa, el contenido de compuestos fenólicos y betalaínas en los dos métodos de cultivo (Figura 6).

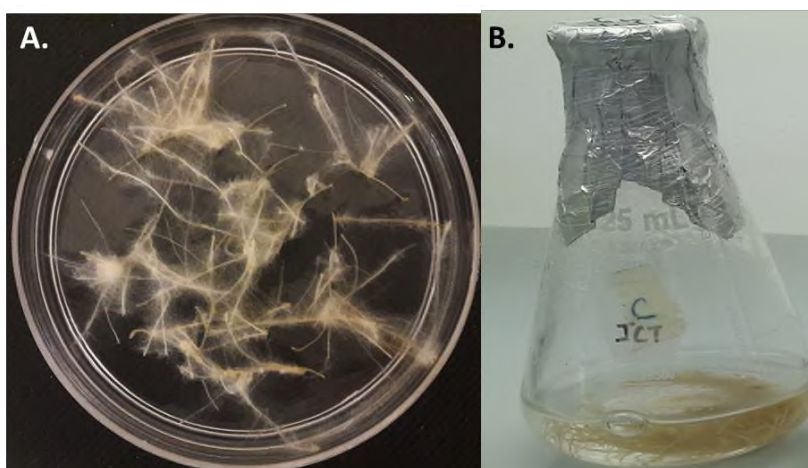


Figura 6. Cultivo *in vitro* de raíces adventicias de *G. globosa*. A. Raíces en medio sólido. B. Raíces en medio líquido.

Los estudios comparativos mostraron que la acumulación de biomasa y de compuestos fenólicos de las raíces adventicias fue mejor en los cultivos líquidos (matraz Erlenmeyer) que en el medio sólido. Después de 20 días de cultivo, el peso fresco (P.F) y peso seco (P.S) en los matraces fueron 4.8 veces y 3.0 veces más que en cultivo sólido, respectivamente, (Tabla 9). El contenido de compuestos fenólicos de las raíces crecidas en medio líquido fue 9.5 veces más al del medio sólido (185.03 y 17.69) mg/g P.S, mientras que en ambos métodos de cultivo no se detectó presencia de betalaínas.

Tabla 9. Comparación de variables del cultivo de raíces adventicias en medio sólido y líquido a 20 días de edad.

Método de cultivo	Biomasa		Compuestos fenólicos (mg/g P.S)	Betalaínas (mg/g P.S)
	P.F (g L ⁻¹)	P.S (g L ⁻¹)		
Líquido	209.82±12.43 ^a	13.89±0.37 ^a	185.03±16.03 ^a	N.D.
Sólido	36.40±5.96 ^b	3.35±10.18 ^b	17.69±1.23 ^b	N.D.

P.F: peso fresco, P.S: peso seco; N.D: no detectado. Las letras iguales dentro de cada columna indican que hubo diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía (Tukey, $p < 0.05$) (n=3)

7.2 Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y compuestos bioactivo en raíces de *G. globosa* en medio líquido.

Las raíces adventicias se transfirieron a medio líquido MS y B5 sin regulador para evaluar su efecto en el crecimiento celular (Figura 7).

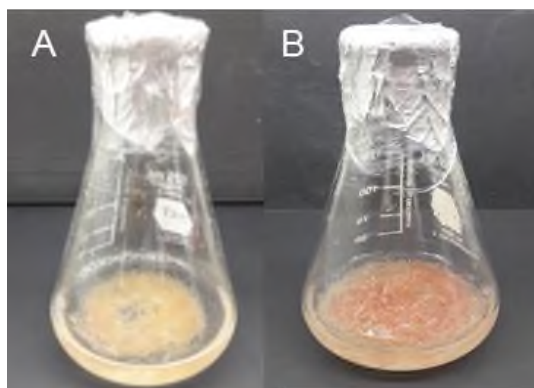


Figura 7. Inducción de raíces adventicias *in vitro* de *G. globosa* en medio líquido. A. Raíces en medio MS; B. Raíces en medio B5.

Se observó que los cultivos en medio MS presentaron un crecimiento lento, coloración pálida y raíces delgadas en comparación con las raíces cultivadas en medio B5 las cuales presentaron un crecimiento más rápido, con pigmentación púrpura y mayor grosor. Esto, hace notar que el medio de cultivo B5 favorece a un mejor desarrollo en las raíces de *G. globosa*.

Los cultivos de raíces alcanzaron la máxima producción de biomasa en el día 27, tanto en medio B5 y MS. Sin embargo, en el medio de cultivo B5 se presentó un mayor crecimiento que en medio MS (18.18 g L⁻¹ y 11.16 g L⁻¹, respectivamente), presentando

una fase de adaptación en medio B5 hasta el día 3, un crecimiento exponencial desde el día 6 hasta el día 27, a partir de la cual se presentó la fase de muerte. Por otra parte, en el medio MS se presentó una fase de latencia desde el día 0 hasta el día 21 tras lo cual se presentó la fase exponencial desde el día 21 hasta el día 27, seguido de la fase de muerte (Figura 8).

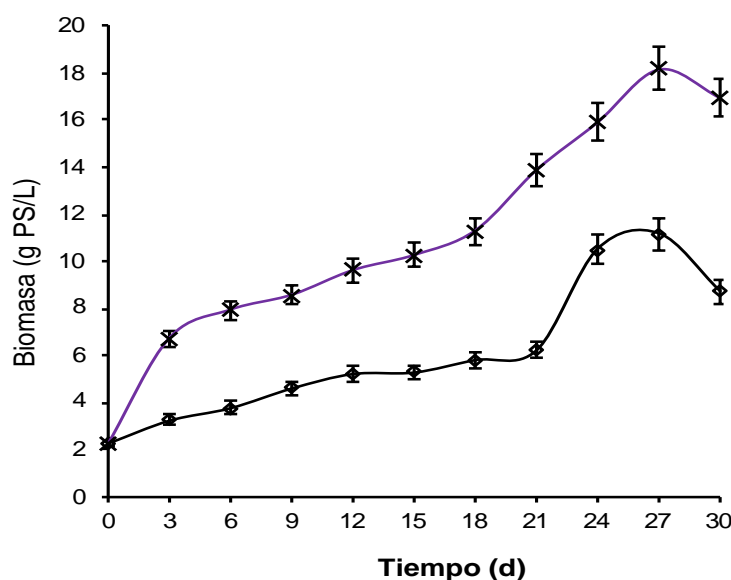


Figura 8. Cinética de crecimiento de raíces adventicias de *G. globosa*. (◇) Medio MS. (x) Medio B5. Los valores son la media \pm el error estándar ($n=3$).

Por otro lado, se observó el efecto de los medio B5 y MS en la producción de compuestos bioactivos como: betalaínas, compuestos fenólicos y flavonoides (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación entre la producción de compuestos fenólicos y betalaínas en medio B5 y MS

Medio de cultivo	Betalaínas (mg E.A/ g E.S)	Fenoles totales (mg E A.G/ g E.S)	Flavonoides (mg E.Q/ g E.S)
B5	3.58 \pm 0.25 ^a	16.85 \pm 0.16 ^a	0.86 \pm 0.15 ^a
MS	0.85 \pm 0.28 ^b	11.4 \pm 0.09 ^b	0.32 \pm 0.08 ^b

E.A: equivalente a amarantina, E.A.G: equivalente a ácido gálico. E.Q: equivalente a quercetina, E.S: extracto seco. Las letras iguales dentro de cada columna indican que hubo diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía (Tukey, $p<0.05$) ($n=3$)

La producción de betalaínas fue 0.76 veces mayor en medio B5 que en medio MS (3.58 mg E.A/ g E.S y 0.85 mg E.A/ g E.S, respectivamente). De forma similar, la

máxima producción de fenoles totales (16.85 mg E.A.G/ g E.S) y de flavonoides (0.86 mg E.Q/ g E.S) se obtuvo en el medio de cultivo B5 que en comparación al medio MS siendo de esto es 0.32 veces y 0.63 veces más que lo producido en medio MS, respectivamente.

7.3 Efecto de la concentración de IBA en el crecimiento celular y producción de compuestos bioactivos

Se evaluaron tres concentraciones diferentes de IBA (9.9, 24.6 y 49.3 μM), utilizando como control medio sin fitorregulador. A partir del séptimo día de cultivo se observó un cambio en la pigmentación de las raíces de *G. globosa*, crecidas en medio con regulador de crecimiento, las cuales cambiaron de amarillo a púrpura. (Figura 9).

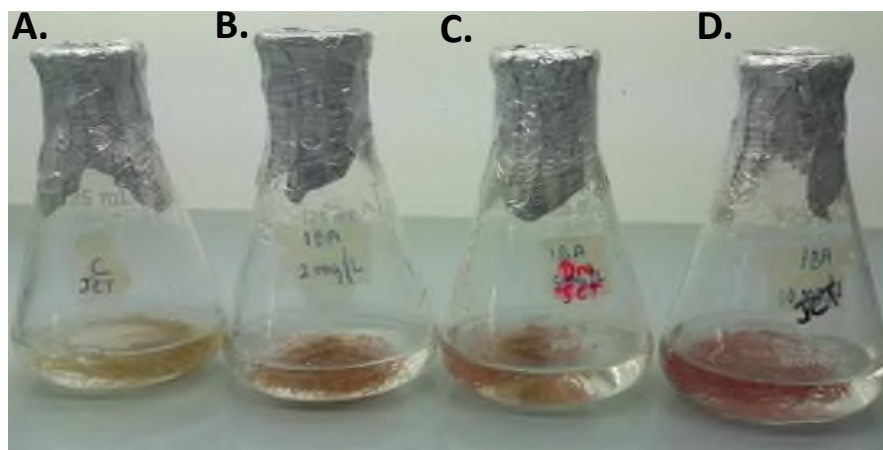


Figura 9. Raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido B5 suplementado con IBA a diferentes concentraciones. A) Control. B) IBA 9.9 μM . C) IBA 24.6 μM . D) IBA 49.3 μM .

En la Figura 10 se muestra la cinética de crecimiento de 30 días donde se observó que a mayor concentración de IBA hubo menor crecimiento. A 9.9 μM de IBA se alcanzó una biomasa máxima de 15.28 g P.S/L en el día 24 del cultivo, es decir 1.8 veces mayor ($p < 0.05$) al del control 10.55 g P.S/L. Sin embargo, el menor crecimiento (7.11 g P.S/L) se presentó con la concentración de 49.3 μM de IBA, 0.38 veces menor que el control.

Como medida indirecta del crecimiento celular se realizó un seguimiento de la conductividad eléctrica (Figura 10). Se observó un descenso en la conductividad eléctrica del medio de cultivo como respuesta al crecimiento de las raíces de *G. globosa*. El mayor descenso de conductividad se presentó con el tratamiento 9.9 μM de IBA. (0.39 mS cm^{-1}) (Figura 10 B).

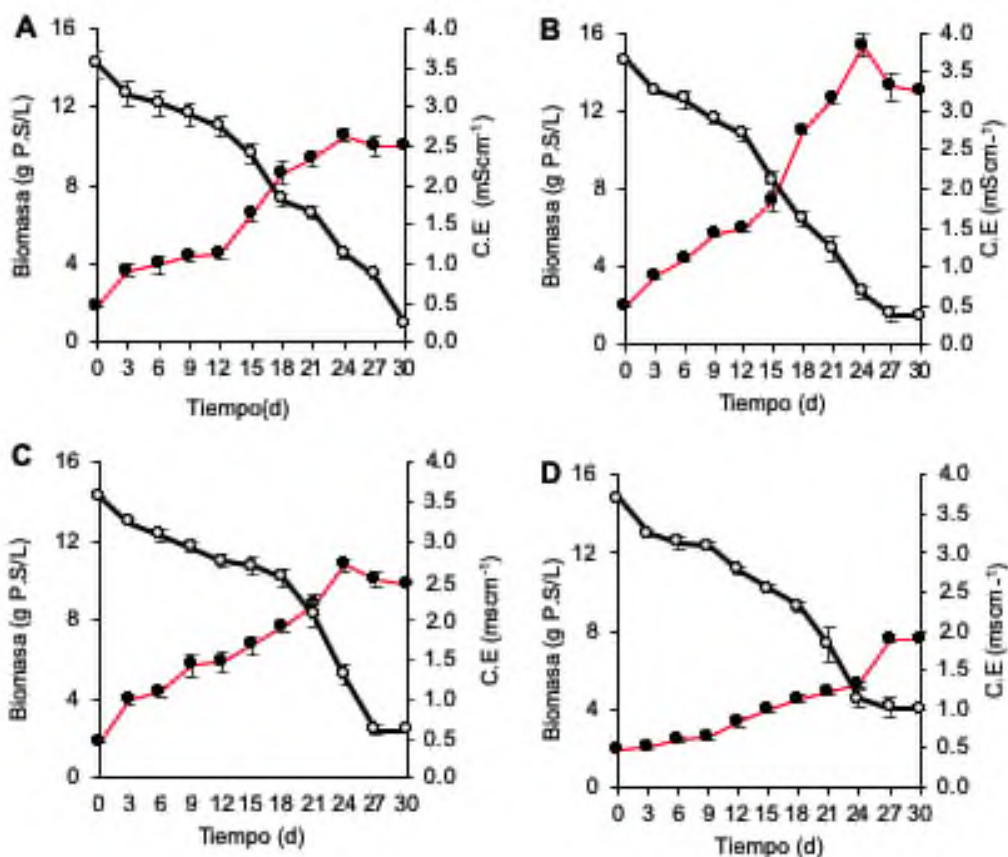


Figura 10. Cinética de crecimiento y conductividad eléctrica de raíces de *G. globosa*. A. Control, B. IBA 9.9 μM , C. IBA 24.6 μM y D. IBA 49.3 μM . (●) Biomasa y (○) Conductividad eléctrica. Los valores son la media \pm el error estándar ($n=3$).

La Figura 11 muestra la producción de compuestos fenólicos, flavonoides y betalainas. La mayor producción de compuestos fenólicos se presentó durante el día 24, con la concentración de 9.9 μM de IBA, presentando una producción de 18.9 mg E.A.G/g ES. Es decir 1.12 veces mayor que el control (16.8 mg E.A.G /g E.S) (Figura 11 A). Por otro lado, la mayor producción de flavonoides se presentó en el tratamiento control alcanzando 0.863 mg E.Q/g E.S en el día 28 y la menor de concentración registrada

corresponde a la concentración de 24.6 μM de IBA (0.38 mg E.Q/g E.S). Esto es 0.43 veces más concentración de flavonoides en el control que con el tratamiento con IBA (Figura 11 B). Así pues, mientras que la producción de flavonoides aumenta, la producción de fenoles disminuye para el control, lo cual se puede relacionar con una baja producción de raíces comparada con la concentración de IBA 9.9 μM . En la Figura 11 C se muestra que la mayor producción de betalaínas fue de 5.14 mg E.A/g E.S a la concentración de 49.3 μM de IBA en el día 30 del cultivo, esto fue 1.43 veces mayor producción en comparación al control (3.58 mg E.A/g E.S).

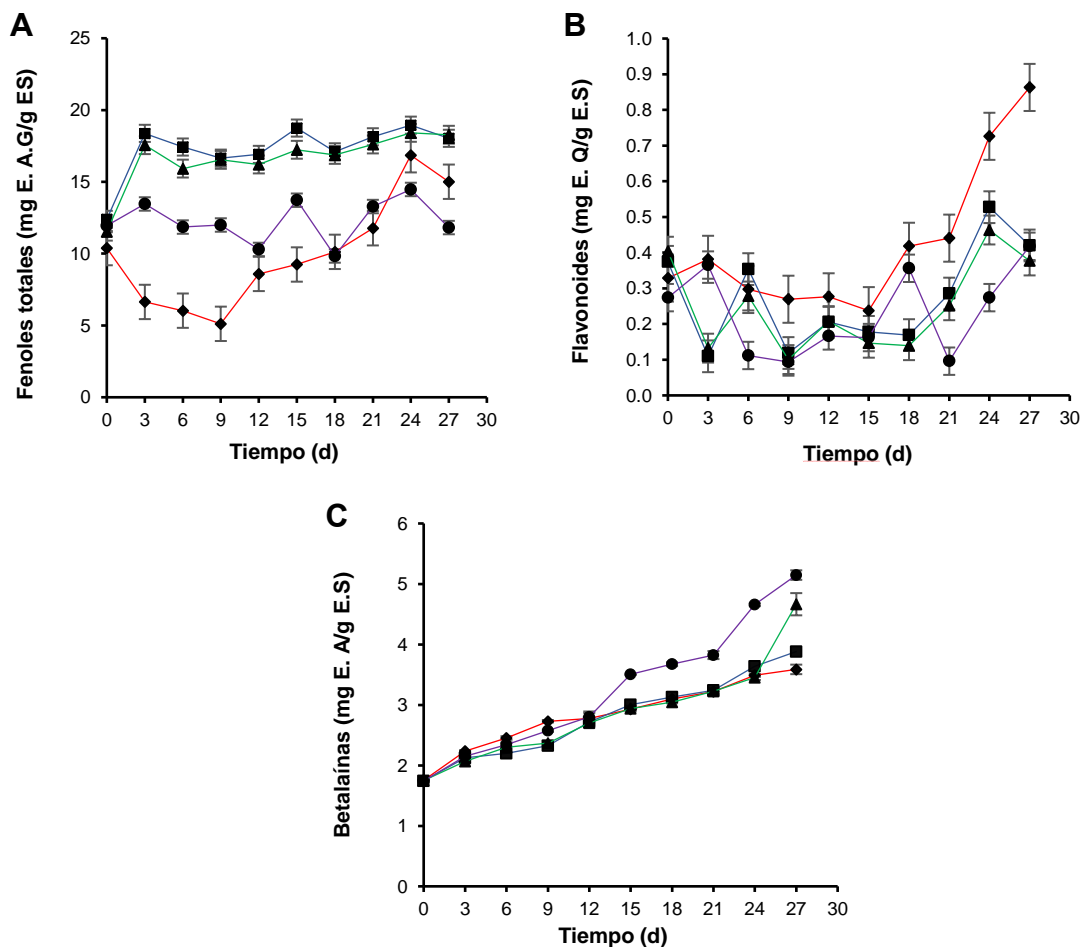


Figura 11. Producción de fenoles totales, flavonoides y betalaínas en raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido B5 con distintas concentraciones de ácido indol butírico (IBA). A. Fenoles Totales, B. Flavonoides y C. Betalainas). (♦) Control, (■) IBA 9.9 μM , (▲) IBA 24.6 μM , (●) IBA 49.3 μM . Los valores son la media \pm el error estándar ($n=3$).

A partir de las cinéticas obtenidas se calculó los parámetros cinéticos de las raíces de *G. globosa*: la velocidad específica de crecimiento, el tiempo de duplicación, el rendimiento biomasa/sustrato y la relación matemática entre el crecimiento y la conductividad eléctrica (Tabla 11).

Tabla 11. Parámetros cinéticos en cultivo de raíces de *G. globosa*. a diferentes concentraciones de ácido indol butírico.

[IBA] (μM)	μ (d^{-1})	t_d (d)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)			Ecuación crecimiento- conductividad
				Fenoles	Flavonoides	Betalainas	
0.0	0.068 \pm 0.00 ^b	10.14 \pm 0.3 ^b	0.31 \pm 0.0 ^b	0.73 \pm 0.0 ^a	0.045 \pm 0.00 ^a	0.20 \pm 0.03 ^c	b=3.719c+1.08
9.9	0.096 \pm 0.00 ^a	7.25 \pm 0.06 ^a	0.46 \pm 0.0 ^a	0.49 \pm 0.0 ^b	0.011 \pm 0.01 ^c	0.16 \pm 0.02 ^c	b=5.166c+0.29
24.6	0.040 \pm 0.00 ^c	17.15 \pm 0.23 ^c	0.29 \pm 0.02 ^c	0.76 \pm 0.06 ^a	0.006 \pm 0.00 ^d	0.32 \pm 0.07 ^b	b=3.656c+2.124
49.3	0.037 \pm 0.00 ^c	18.58 \pm 0.54 ^d	0.27 \pm 0.01 ^c	0.44 \pm 0.02 ^b	0.020 \pm 0.00 ^b	0.59 \pm 0.06 ^a	b=1.529c+0.827

μ =velocidad de crecimiento; t_d = tiempo de duplicación; $Y_{X/S}$ = rendimiento biomasa-sustrato; $Y_{P/X}$ = rendimiento producto-biomasa, Ecuación crecimiento-conductividad (b= biomasa; c= conductividad eléctrica). Las letras iguales dentro de cada columna indican que hubo diferencias estadísticamente significativas. ANOVA de una vía (Tukey, $p < 0.05$) (n=3)

El tratamiento con mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación fue con la concentración de 9.9 μM de IBA siendo 0.0956 d^{-1} y 7.25 d respectivamente. La relación matemática que expresa el incremento de biomasa acumulada en función del decremento de conductividad eléctrica en los cultivos de raíces de *G. globosa* a 9.9 μM de IBA es: b=5.166c+0.299 (Anexo 1 B).

Los cultivos de raíces expuestos a la concentración de IBA 9.9 μM consumieron mayor cantidad sacarosa, presentando un rendimiento ($Y_{X/S}$) de 0.46 g de biomasa/g de sustrato en el día 24 de cultivo, mayor al control en 0.3 veces 0.31 g de biomasa/ g de sustrato, seguido de la concentración de 25 μM de IBA (Tabla 11).

7.4 Efecto de la concentración de sacarosa en el crecimiento celular y producción de compuestos bioactivos

En un segundo experimento se evaluaron diferentes concentraciones de sacarosa (10, 20, 30, 40, 50 y 60 g L^{-1}) usando la condición (IBA 9.9 μM) la cual favoreció la acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides. Como control se utilizó 30 g L^{-1}

de sacarosa la cual indujo la mayor producción de biomasa y compuestos fenólicos, como se muestra en la Figura 12.

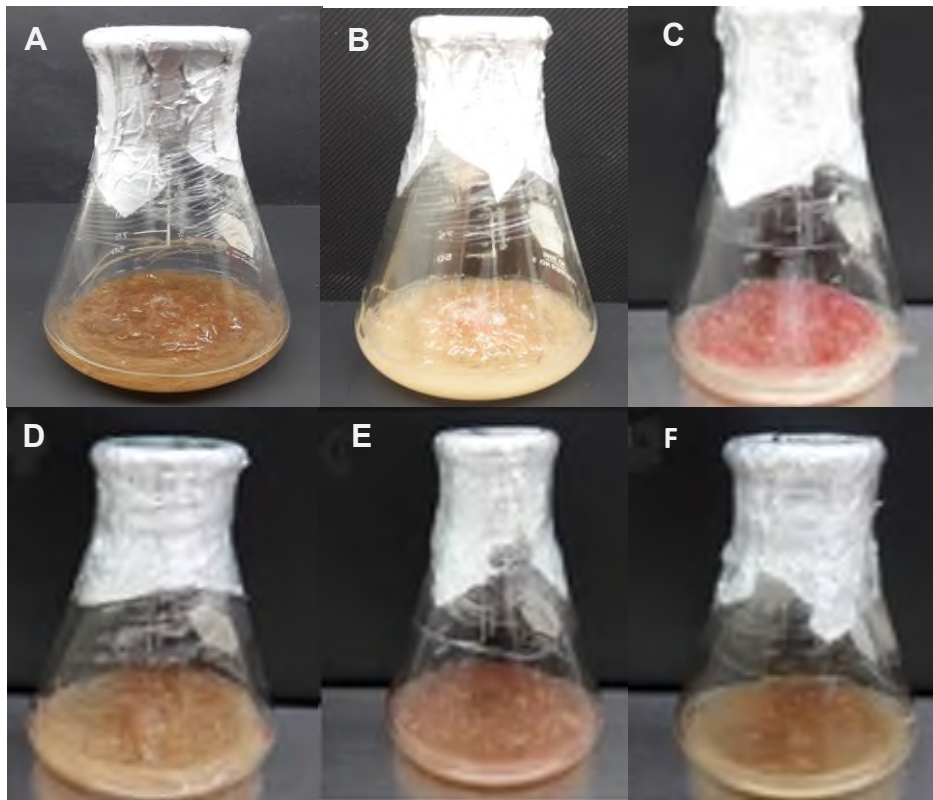


Figura 12. Raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido B5 suplementado con 9.9 μM de IBA a diferentes concentraciones de sacarosa a 21 días de cultivo. A. 10 g L^{-1} , B. 20 g L^{-1} , C. 30 g L^{-1} , D. 40 g L^{-1} , E. 50 g L^{-1} , F. 60 g L^{-1} .

En la Figura 13 se muestra la cinética de crecimiento donde se observó que el mayor crecimiento celular se presentó con una concentración de sacarosa de 40 g L^{-1} .

Durante los días 3 a 12 se presentó la fase de adaptación, en los días 12 a 24 la fase exponencial, seguida de la fase estacionaria en los días 24 a 27, seguida de una fase de muerte celular después del día 27. La biomasa máxima fue de 15.34 g P.S/L con concentración de sacarosa de 40 g L^{-1} en el día 27 del cultivo. Por otra parte, la concentración de 60 g L^{-1} , presentó el menor crecimiento (7.62 g P.S/L). A partir del día 21 comenzó a presentarse oscurecimiento en las raíces, particularmente con las concentraciones de 50 y 60 g L^{-1} de sacarosa. También se observó un descenso en la

conductividad eléctrica del medio de cultivo como respuesta al crecimiento de las raíces de *G. globosa* (Figura 13). El valor más bajo de conductividad eléctrica en las cinéticas de crecimiento se presentó con la concentración de 40 g L⁻¹ de sacarosa, siendo de 0.35 mScm⁻¹ (Figura 13B).

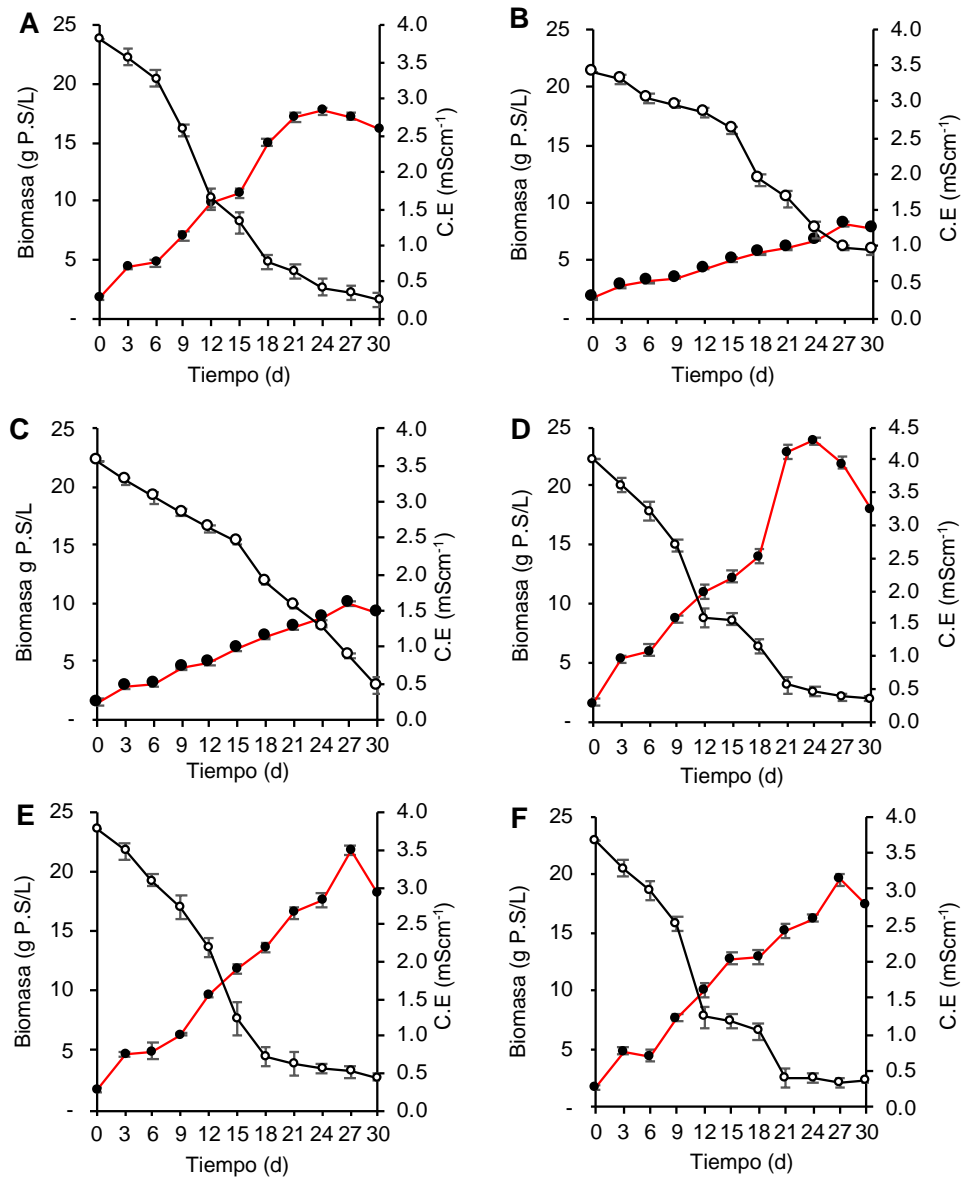


Figura 13. Cinética de crecimiento y conductividad eléctrica de raíces de *G. globosa* con IBA 9.9 μ M a diferentes concentraciones de sacarosa. A) Control, B) 10 g L⁻¹, C) 20 g L⁻¹, D) 40 g L⁻¹, E) 50 g L⁻¹ F) 60 g L⁻¹, donde (-●-) biomasa y (-○-) conductividad eléctrica. Los valores son la media \pm el error estándar ($n=3$).

Se observó que la máxima producción de compuestos fenólicos se presentó con la concentración de 50 g L⁻¹ de sacarosa en el día 24 siendo de 26.52 mg E. A.G/ g E. S, esto es 0.5 veces mayor al control (17.68 mg E.A.G/ g E.S) (Figura 14 A). La mayor producción de flavonoides se presentó en el día 27 de cultivo con la concentración control de sacarosa (30 g L⁻¹), produciendo 0.53 mg E.Q/ g E. S (Figura 14 B). Por otra parte, la producción y/o acumulación de betalaínas se incrementó en todas las concentraciones de sacarosa respecto al tiempo, presentándose la mayor producción en el día 30 de cultivo en la cinética control, esto es 3.67 mg E.A/ g E. S (Figura 14 C).

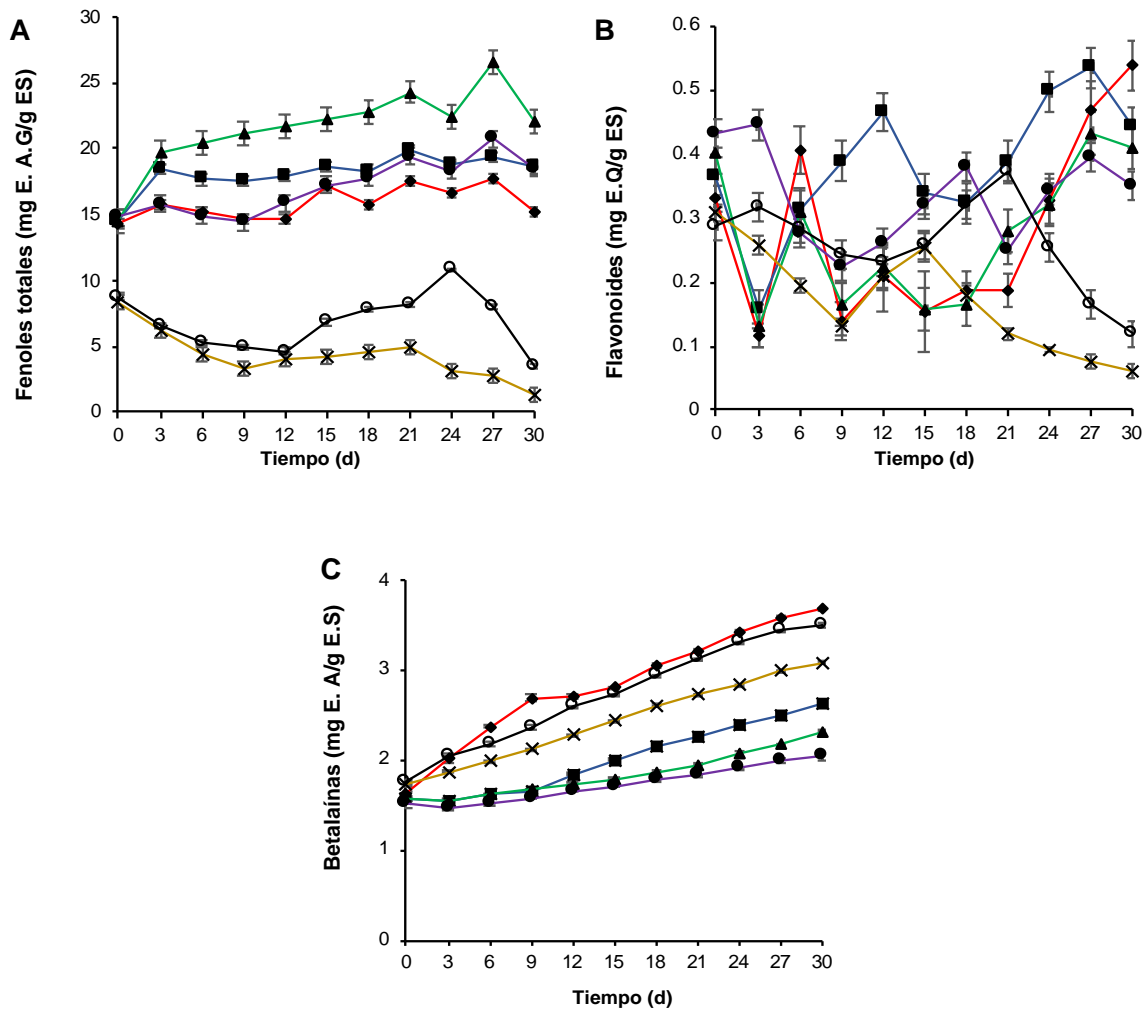


Figura 14. Producción de fenoles totales, flavonoides y betalaínas en raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido B5 con (IBA 9.9 μ M). **A.** Fenoles Totales, **B.** Flavonoides y **C.** Betalaínas). (♦) Control, (×) Sacarosa 10 g L⁻¹, (○) Sacarosa 20 g L⁻¹, (■) Sacarosa 40 g L⁻¹, (▲) Sacarosa 50 g L⁻¹ (●) Sacarosa 60 g L⁻¹. Los valores son la media \pm el error estándar ($n=3$).

En el Tabla 12 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos. El tratamiento con mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación fue con la concentración de 10 g L⁻¹ de sacarosa siendo 0.203 d⁻¹ y 3.42 d respectivamente. La relación matemática que expresa el incremento de biomasa acumulada en función del decremento de conductividad eléctrica en los cultivos de raíces de *G. globosa* a 30 g L⁻¹ de sacarosa es: $b=4.291c+1.098$ (Anexo 5).

Tabla 12. Parámetros cinéticos en cultivo de raíces de *G. globosa* a diferentes concentraciones de sacarosa e IBA a 9.9 μM.

[Sacarosa] (g L ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	t _d (d)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/X} (g/g)			Ecuación crecimiento- conductividad
				Fenoles	Flavonoides	Betalainas	
10	0.203 ^a	3.42 ^a	0.64 ^c	-0.53 ^d	-0.084 ^d	0.23 ^a	b= 4.118c+1.230
20	0.175 ^b	3.96 ^b	0.45 ^d	0.24 ^c	0.013 ^a	0.22 ^a	b= 2.839c+0.100
30	0.113 ^f	6.13 ^f	0.69 ^c	0.21 ^c	0.010 ^b	0.13 ^b	b= 4.291c+1.098
40	0.146 ^c	4.75 ^c	0.76 ^b	0.22 ^c	0.008 ^b	0.05 ^c	b= 5.444c+0.391
50	0.127 ^d	5.45 ^d	0.84 ^a	0.59 ^a	0.001 ^c	0.04 ^c	b= 4.782c+0.824
60	0.118 ^e	5.87 ^e	0.78 ^b	0.32 ^b	0.0006 ^d	0.03 ^c	b= 4.080c+1.701

μ= velocidad de crecimiento; t_d= tiempo de duplicación Y_{X/S} = rendimiento biomasa-sustrato; Y_{P/X} = rendimiento producto-biomasa; Ecuación crecimiento-conductividad (b= biomasa; c= conductividad eléctrica).

El mayor rendimiento de biomasa sustrato (Y_{X/S}: 0.84 g de biomasa/g de sustrato) se obtuvo con la concentración de 50 g L⁻¹ de sacarosa. Mientras que el menor rendimiento se presentó con la concentración de 20 g L⁻¹, esto es 0.45 g de biomasa/g de sustrato.

Se realizó un tercer experimento a diferentes concentraciones de sacarosa (10, 20,30, 40, 50 y 60 g L⁻¹) con el regulador IBA a 49.3 μM en la cual las raíces presentaron visualmente mayor pigmentación púrpura lo que sugiere la por esta razón se evaluaron diferentes concentraciones de sacarosa (Figura 15).

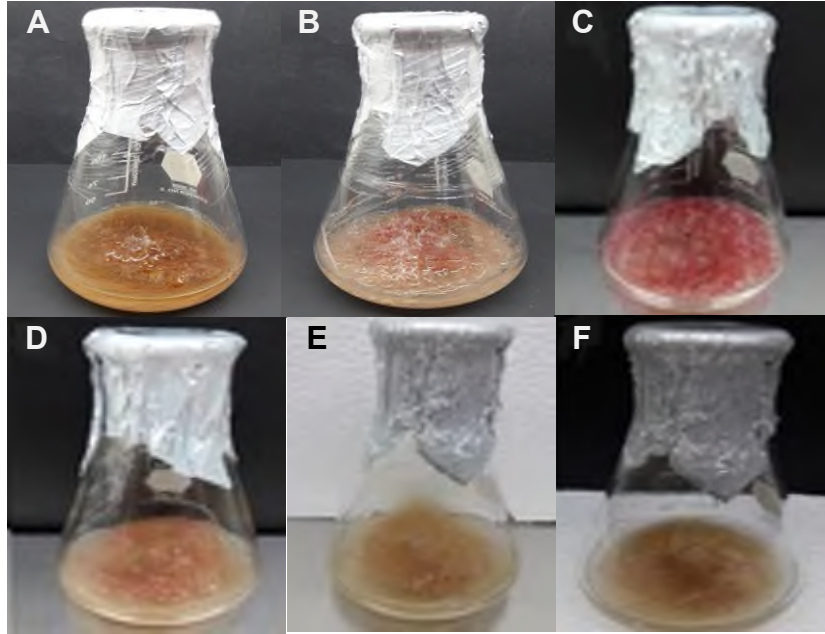


Figura 15. Raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido B5 suplementado con 49.3 μM de IBA a diferentes concentraciones de sacarosa a 21 días de cultivo. A. 10 g L^{-1} , B. 20 g L^{-1} , C. 30 g L^{-1} , D. 40 g L^{-1} , E. 50 g L^{-1} , F. 60 g L^{-1} .

En la Figura 16 se muestra la cinética de crecimiento de los cultivos raíces de *G. globosa*. Durante los días 3 a 12 se presentó la fase de adaptación, en los días 12 a 27 la fase exponencial, seguida de la fase estacionaria en los días 27 a 30, seguida de una fase de muerte celular después del día 30. La biomasa máxima fue de 8.62 g P.S/L con concentración de sacarosa de 30 g L^{-1} en el día 27 del cultivo. Por otra parte, la concentración de 60 g L^{-1} , presentó el menor crecimiento (6.38 g P.S/L). Se observó además que a partir del día 18 comenzó a presentarse oscurecimiento en las raíces, particularmente con las concentraciones de 50 y 60 g L^{-1} de sacarosa. Se observó un descenso en la conductividad eléctrica del medio de cultivo como respuesta al crecimiento de las raíces de *G. globosa*. El mayor descenso de conductividad se presentó en el tratamiento con concentración de 40 g L^{-1} de sacarosa (0.31 mScm^{-1}) (Figura 16 A).

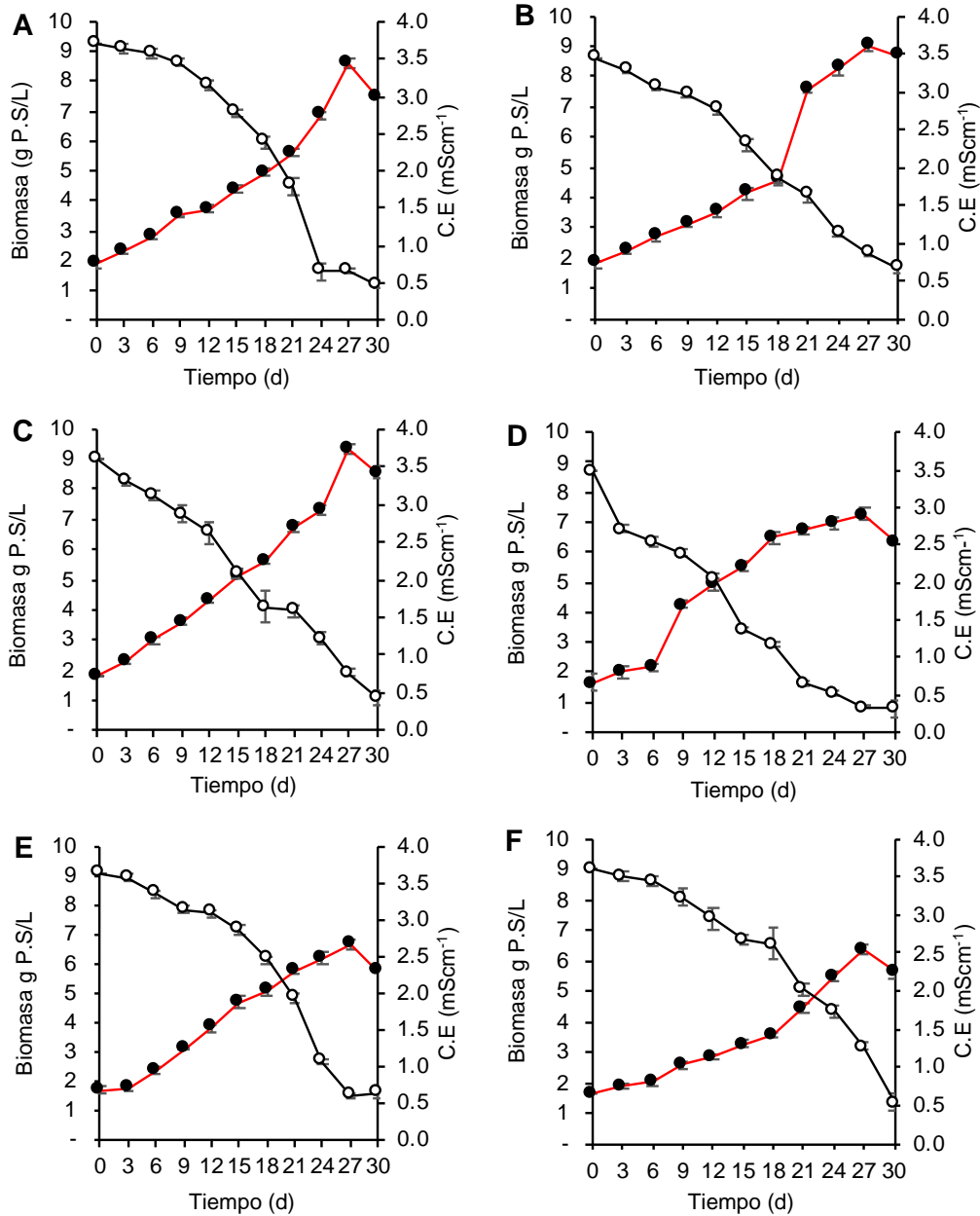


Figura 16. Cinética de crecimiento y conductividad eléctrica de raíces de *G. globosa* con (IBA 49.3 μM). Concentración de sacarosa A) Control, B) 10 g L⁻¹, C) 20 g L⁻¹, D) 40 g L⁻¹, E) 50 g L⁻¹ F) 60 g L⁻¹, donde (●) biomasa y (○) conductividad eléctrica. Los valores son la media \pm el error estándar de tres determinaciones. Análisis estadístico por Anova de 2 vías ($p < 0.05$), post prueba de Tukey.

A partir del día 4 comenzó a presentarse pigmentación rojiza en las raíces crecidas bajo la condición control, lo que sugiere probablemente la presencia de betalainas dado que *G. globosa* puede producir y/o acumular dicho metabolito. No obstante, las

raíces adventicias bajo el efecto de concentraciones de 50 y 60 g L⁻¹ de sacarosa presentaron un menor crecimiento. Debido a que las concentraciones elevadas de sacarosa pueden causar una condición de estrés que impiden el rápido desarrollo de las raíces de *G. globosa*.

Se observó que la mayor producción y/o acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y betalaínas se presentó en el tratamiento a 30 g L⁻¹ de sacarosa. Acumulando 17.23 mg E.A.G/g ES, en el día 27 de cultivo (Figura 17 A). Por otro lado, la mayor producción de flavonoides se presentó en la concentración 40 g L⁻¹ de sacarosa alcanzando 0.52 mg E.Q/g ES en el día 27. Esto es 0.08 veces más acumulación de flavonoides que el tratamiento con 30 g L⁻¹ de sacarosa (0.48 mg E.Q/g E.S) (Figura 17 B).

En la Figura 17 C se muestra que la mayor producción de betalaínas corresponde a la concentración de 30 g L⁻¹ de sacarosa con una producción de 4.72 mg E.A/ g E.S esto está en armonía con lo reportado en *B. vulgaris* (Bhagyalakshmi *et al.* 2004), que al incrementar la concentración de sacarosa presentó disminución en la acumulación de betalaínas, teniendo la mayor acumulación del metabolito a concentración de 20 g L⁻¹ del carbohidrato (38 mg/ g E.S) (Khan 2006).

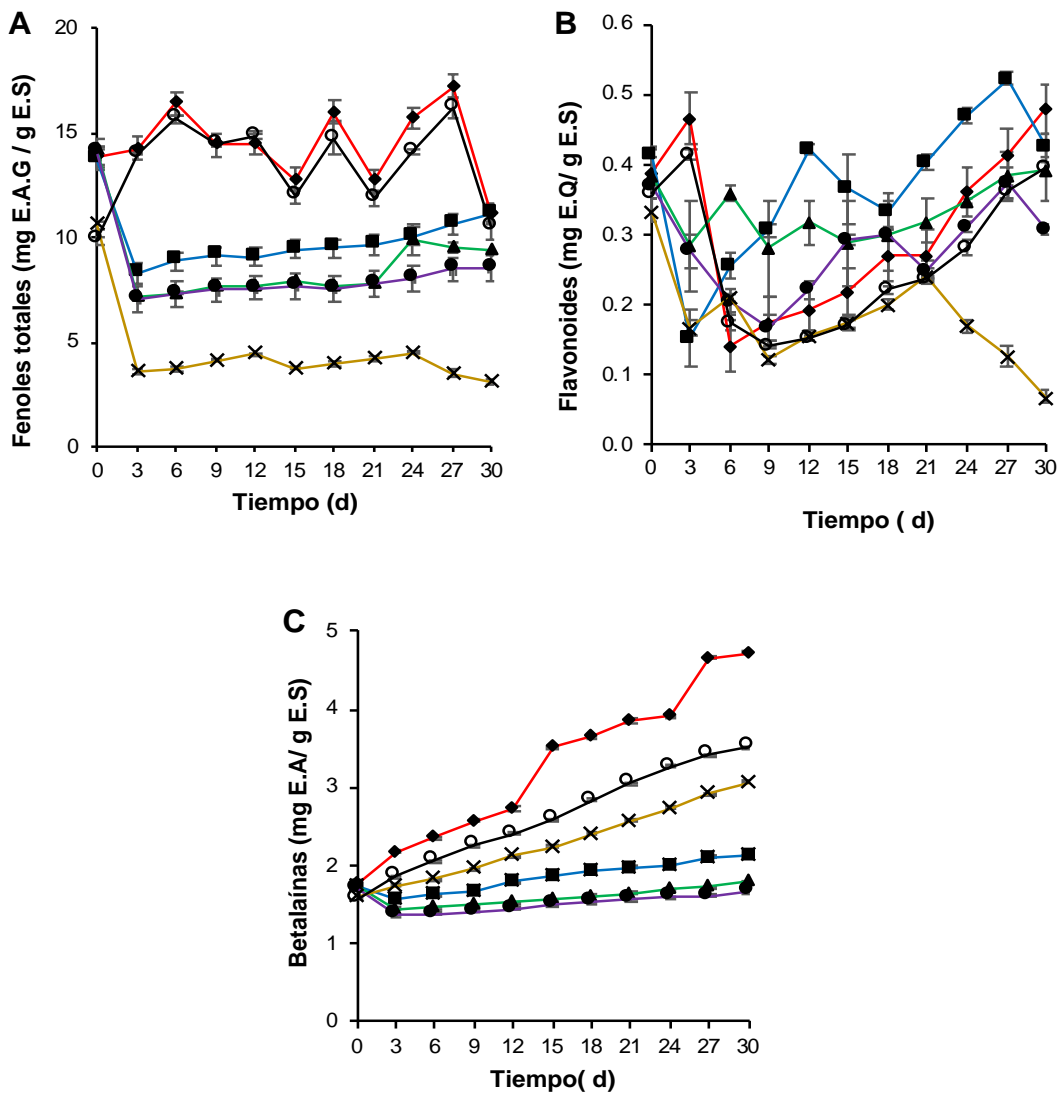


Figura 17. Producción de fenoles totales, flavonoides y betalainas en raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido B5 con distintas concentraciones de sacarosa suplementado con IBA 49.3 μM . A. Fenoles totales, B. Flavonoides y C. Betalainas). (◆) Control, (×) Sacarosa 10 g L⁻¹, (○) Sacarosa 20 g L⁻¹, (■) Sacarosa 40 g L⁻¹, (▲) Sacarosa 50 g L⁻¹ (●) Sacarosa 60 g L⁻¹. Los valores son la media \pm el error estándar ($n=3$).

A partir de las cinéticas obtenidas se calculó la velocidad específica de crecimiento, el tiempo de duplicación, el rendimiento biomasa/sustrato y la relación matemática entre el crecimiento y la conductividad eléctrica (Tabla 13).

Tabla 8. Parámetros cinéticos en cultivo de raíces de *G. globosa* a diferentes concentraciones de sacarosa e IBA a 49.3 μM .

[Sacarosa] (g L ⁻¹)	μ (d ⁻¹)	t_d (d)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)			Ecuación crecimiento- conductividad
				Fenoles	Flavonoides	Betalainas	
10	0.195 ^a	3.55 ^a	0.72 ^a	-0.94 ^e	-0.044 ^e	0.21 ^c	b= 6.627c+0.362
20	0.185 ^b	3.75 ^b	0.47 ^b	0.76 ^a	0.005 ^c	0.29 ^b	b= 5.971c+1.187
30	0.040 ^e	17.32 ^c	0.41 ^c	0.50 ^b	0.013 ^b	0.44 ^a	b= 4.615c+3.968
40	0.058 ^c	11.95 ^c	0.19 ^d	-0.46 ^c	0.020 ^a	0.07 ^d	b= 1.757c-0.112
50	0.055 ^c	12.60 ^c	0.30 ^d	-0.86 ^d	0.002 ^d	0.02 ^e	b= 1.595c+1.176
60	0.049 ^d	14.14 ^c	0.29 ^d	-1.17 ^f	0.002 ^d	0.010 ^e	b= 7.064c+2.701

μ = velocidad de crecimiento; t_d = tiempo de duplicación; $Y_{X/S}$ = rendimiento biomasa-sustrato; $Y_{P/X}$ = rendimiento producto-biomasa; Ecuación crecimiento-conductividad (b= biomasa; c= conductividad eléctrica).

El tratamiento con mayor velocidad de crecimiento y menor tiempo de duplicación fue con la concentración de 10 g L⁻¹ de sacarosa siendo 0.195 d⁻¹ y 3.55 d respectivamente. La relación matemática calculada que expresa el incremento de biomasa acumulada en función del decremento de conductividad eléctrica en los cultivos de raíces de *G. globosa* a 10 g L⁻¹ de sacarosa es: b=6.627c+0.362.

El mayor rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$: 0.84 g de biomasa/g de sustrato) fue a la concentración de 10 g L⁻¹ de sacarosa. Sin embargo, el menor rendimiento se presentó con las concentraciones de 40 y 60 g L⁻¹, estos fueron de $Y_{X/S}$: 0.19 y 0.29 g de biomasa/ g de sustrato, respectivamente.

7.5 Detección de compuestos bioactivos por UHPLC.

Mediante UHPLC se detectó que a 280 nm los cultivos expuestos a diferentes concentraciones de IBA y la combinación de IBA 9.9 μM con diferentes concentraciones de sacarosa acumularon mayoritariamente compuestos fenólicos con tiempos de retención desde 3 hasta 7 min (Figura 18). Al comparar los diferentes cromatogramas de los extractos de las raíces cultivadas con diferentes concentraciones de IBA, el tratamiento con 9.9 μM acumuló la mayor cantidad de estos metabolitos de acuerdo con la intensidad de los picos (Figura 18A, cromatograma en

azul), mientras que con la combinación de IBA 9.9 μM y sacarosa de 50 g/L se incrementó la intensidad de los de los picos de los compuestos fenólicos (Figura 18 B, cromatograma en violeta).

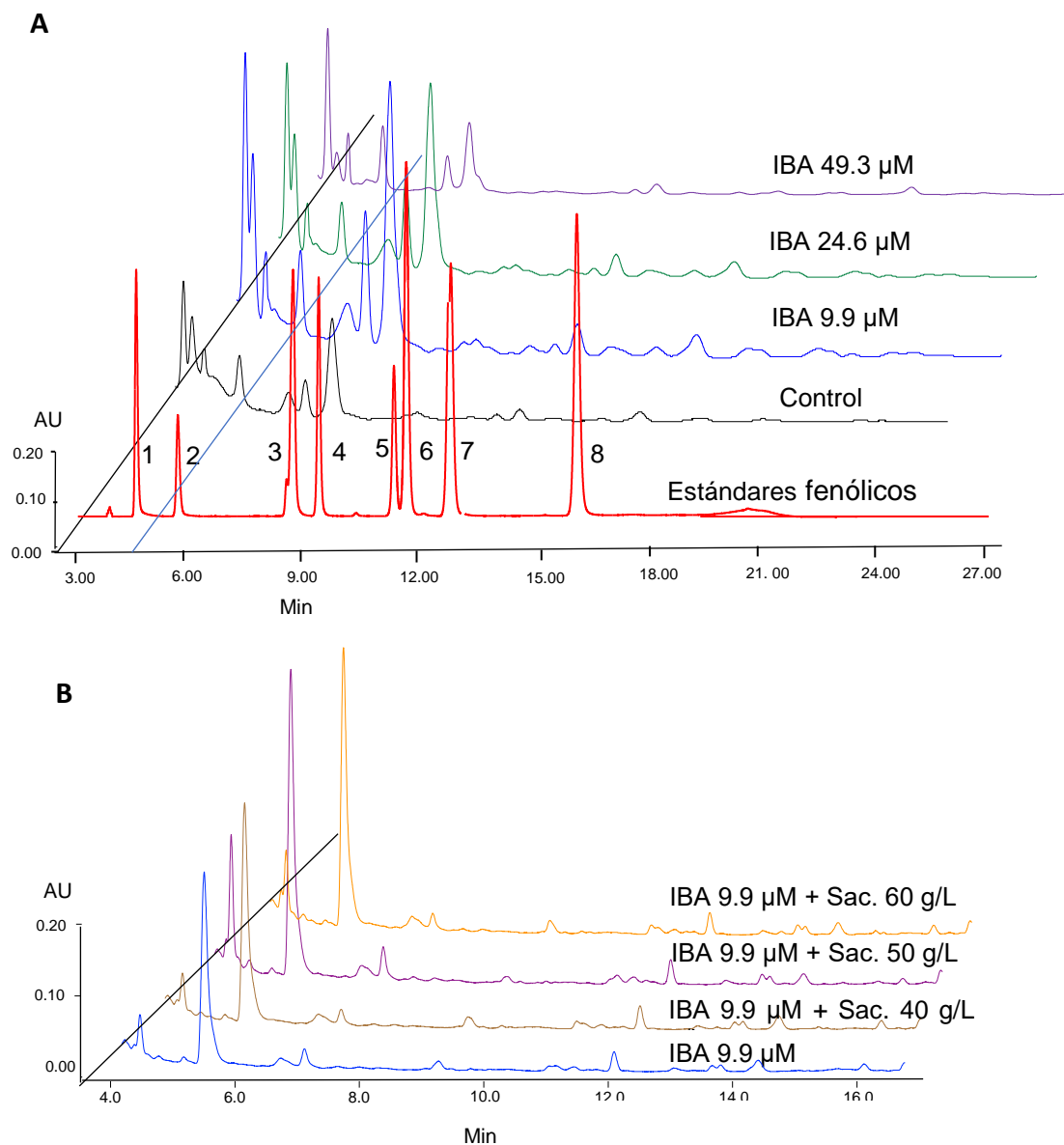


Figura 18. Cromatograma de HPLC (280 nm) de extractos acuosos de cultivos *in vitro* raíces adventicias de *G. globosa*. **A.** Extracto acuoso de raíces de *G. globosa* de cultivo *in vitro* a diferentes concentraciones de IBA. **B.** Extracto acuoso de raíces de *G. globosa* de cultivo *in vitro* con IBA 9.9 μM más sacarosa (30 g L⁻¹, 40g L⁻¹, 50 g L⁻¹ y 60 g L⁻¹). Estándares de compuestos fenólicos 1. Ácido gálico; 2. Ácido protocatecuico; 3. Ácido caféico; 4. Ácido siríngico; 5. Acido ferúlico; 6. Ácido 3-hidroxicinámico; 7. 2-hidroxicinámico; 8. Ácido cinámico.

Al comparar los tiempos de retención de los estándares de compuestos fenólicos con los de las muestras analizadas, se observó la coincidencia de un pico en el tiempo de retención de 4.5 min en la muestra control y el tratamiento IBA 9.9 μM el cual presumiblemente corresponda al ácido protocatecuico (estándar 2). Por otra parte, se observan otros compuestos polares con picos similares a los estándares como el ácido caféico, que podrían ser compuestos fenólicos glicosilados o con algún grupo funcional, ya que los tiempos de retención no corresponden.

8. DISCUSIÓN

Las raíces adventicias (RA) son raíces naturales que se desarrollan a partir de las células diferenciadas de cualquier órgano como la hoja, la raíz o el tallo. Y estas se ha aplicado en muchas plantas medicinales debido a su rápido crecimiento y producción estable de metabolitos secundarios de interés farmacéutico y nutracéutico (Murthy *et al.* 2008). Las raíces adventicias inducidas bajo condiciones asépticas en un medio adecuado suplementado con RCV, muestran una mejor tasa de crecimiento y un potencial incrementado para la acumulación y producción constante de metabolitos secundarios (Hahn *et al.* 2003). La formación de AR es un proceso complejo que involucra diversos factores endógenos y exógenos (Sorin *et al.* 2005). Según Han *et al.* (2001), "El proceso se puede dividir en tres etapas: inducción de la raíz (incluye cambios moleculares y bioquímicos que ocurren antes de cualquier evento citológico); iniciación de la raíz (primeras modificaciones anatómicas) y protrusión de la raíz (emergencia de la raíz primordial)". Estas raíces muestran una alta estabilidad, tasa de crecimiento y sintetizan una gran cantidad de metabolitos secundarios en espacios intercelulares que pueden extraerse fácilmente y pueden cultivarse en un medio modificado con fitohormonas con bajo inóculo (Sivakumar *et al.* 2006). El cultivo de RA también proporciona un sistema experimental para estudiar la coordinación entre el metabolismo primario y secundario.

El cultivo de RA puede realizarse por métodos de cultivo sólido o líquido. En este estudio encontramos que las RA de *G. globosa* mostraron mejor crecimiento y producción de betalaínas y fenoles en medio líquido (Tabla 9). Numerosos estudios indican que el crecimiento de las raíces es a menudo más rápido en medio líquido que en medio sólido utilizando agentes gelificantes como el agar (Thorpe *et al.* 2008) ya que la asimilación de nutrientes en el medio de cultivo líquido es más eficiente debido al movimiento de agitación (Yang *et al.* 2010a, b). Por otro lado, esto también permite una adecuada transferencia de oxígeno (Wang *et al.* 2013).

Se han utilizado diferentes tipos de medios nutrientes para el inicio de los cultivos de RA en medio líquido o suspensión. Entre los medios que han sido empleados con éxito están: Murashige y Skoog (MS, 1952), Linsmaier & Skoog (LS, 1965), Schenk & Hildebrandt (SH, 1972), Gamborg *et al.* (B5, 1968), Woody Plant (WP, Lloyd & McCown 1981). Entre estos medios, el medio MS y B5 son los ampliamente utilizado para el cultivo de raíces adventicias de varias plantas. Se ha señalado que la fuerza iónica de las sales de cultivo es uno de los factores importantes que afectan la biomasa y la acumulación de metabolitos secundarios (Murthy *et al.* 2014). En este estudio se observó que el medio B5 favoreció el crecimiento y la producción de fenoles, flavonoides y betalaínas. Posiblemente, los requerimientos de cada macro y micronutriente, vitaminas aportados por los medios de cultivo evaluados fueron suficientes para satisfacer el crecimiento y desarrollo celular. Este comportamiento, también se ha observado en cultivos de raíces adventicias de *Coleus forskohlii* en el cual el medio B5 favoreció 1.1 veces el crecimiento de raíces adventicias en comparación al medio MS (Li *et al.* 2005). Sin embargo, el medio MS favorece la acumulación de biomasa en cultivos de raíces adventicias de *Withania somnifera* (Praveen y Murthy, 2010).

Una de las principales diferencias entre los medios de cultivo evaluados, es la concentración de nitrógeno. Según Gamborg (1976); la fuente inorgánica de nitrógeno más adecuada para el crecimiento *in vitro* de células vegetales es una mezcla de nitrato y amonio. El nitrógeno es el mineral que se requiere en mayor cantidad para el crecimiento vegetal, la concentración de este macronutriente afecta el nivel de proteínas y aminoácidos en los cultivos de células vegetales.

La relación nitrato-amonio para los medios de cultivo MS y B5 es 2:1 y 1.2:0.1, respectivamente. La concentración de amonio en medio MS es 10 veces superior a la de B5. Por su parte, Gamborg (1976) propone que la mínima concentración de nitrato en el medio de cultivo para el crecimiento y desarrollo celular, es de 25 mM. Por otra parte, a bajas concentraciones de nitrato y amonio (0: 20.6 respectivamente) se favorece el crecimiento de raíces y la producción de betalaínas en cultivos de *B.*

vulgaris, por el contrario, bajas concentraciones de fosfatos inhiben el crecimiento (Khan 2005).

De acuerdo con lo observado, podemos decir que la composición del medio de cultivo (macronutrientes y micronutrientes) juega un papel clave en el crecimiento de órganos y tejidos vegetales. Así pues, se ha reportado que a concentraciones superiores a 5 μM de Zinc se presentó inhibición del crecimiento de raíces pilosas, así como la producción de betalaínas en *B. vulgaris*. Sin embargo, no se observó efecto de micronutrientes como el Cu^{2+} , Co^{2+} , y Fe^{2+} en el crecimiento de estas (Khan 2005). Por lo tanto, las concentraciones de los macro y micronutrientes de los medios de cultivo probados (Ms y B5) seguramente son los responsables del crecimiento favorable de las raíces de *G. globosa* en B5 más que en MS.

En este trabajo la mayor concentración de betalaínas se encontró en el medio B5 (Tabla 10), este comportamiento fue similar a lo reportado en cultivos de raíces adventicias en *B. vulgaris*, en donde la mayor producción de betalaínas se presentó en medio B5 (32.7 mg E A/ g E.S) (Khan 2005).

Los reguladores de crecimiento vegetal juegan un papel crucial. en una variedad de procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas. En particular, el ácido indol-3-butírico (IBA), una auxina sintética, se usa con mayor frecuencia para el crecimiento y el alargamiento de la raíz en cultivos de células y tejidos vegetales (Hartmann *et al.* 1990).

En el presente estudio, la suplementación del medio con IBA a 9.9 μM incrementó 1.8 veces la acumulación de biomasa con relación al control (Figura 10 A y B). Un efecto similar fue reportado en los cultivos de raíces *O. umbellata* (7.32 g P.S/L) utilizando la misma concentración de IBA en un periodo de 40 días (Krishnan & Siril, 2018). Mientras que una la mayor producción de biomasa de raíces de *K. humboldtiana* (2.25 g P.S/L) fue obtenida a concentraciones de 24.6 μM de IBA (Kollárová *et al.* 2004) y en *O. elatus* de 7.6 y 9.6 g PS/L con concentraciones de 2 y 5 μM de IBA,

respectivamente. Los resultados encontrados en este trabajo fueron similares a lo descrito por Robins *et al.* (1996) y Saverwein *et al.* (1992) quienes reportaron que el crecimiento de raíces pilosas es inversamente proporcional a la concentración de los reguladores de crecimiento; sin embargo, cada especie puede comportarse de forma diferente (Jiang *et al.* 2005). Esto se debe a que las auxinas como en el caso de IBA tienen efecto sobre la elongación celular y aunque su acción varía de una especie a otra, la concentración de auxinas puede promover un incremento en la biomasa de las raíces adventicias (Rajesh *et al.* 2014); o, por otra parte, una disminución de la biomasa a medida que la concentración de la hormona es mayor (Robins *et al.* 1996) y (Saverwein *et al.* 1992).

Actualmente, el IBA es la auxina más utilizada para estimular el proceso de enraizamiento debido a su alta capacidad para promover el inicio de la raíz, así como a su débil toxicidad y gran estabilidad en comparación con el ANA y el IAA (Qaddoury & Amssa 2004). Se han postulado varias hipótesis para explicar la eficacia del IBA. El IBA es más estable que el IAA en diversas condiciones de luz y temperatura, tanto en solución como *in vivo* (Nissen & Sutter 1990; Nordstrom *et al.* 1991). Las diferencias en el transporte, la captación o el metabolismo también podrían contribuir su mayor actividad (Epstein & Ludwig-Muller 1993). Alternativamente, una relación específica entre el IBA y el IAA puede ser importante para el desarrollo, y la aplicación de IBA exógena puede cambiar el equilibrio para promover el desarrollo de la raíz (Zolman *et al.* 2000). Además de eso, IBA tiene una tasa de conjugación más lenta que IAA, de modo que el IBA libre requerido para inducir enraizamiento estará disponible durante un período de tiempo más largo (Krisantini *et al.* 2006).

Como medida indirecta del crecimiento celular se realizó un seguimiento de la conductividad eléctrica. Los cambios en la conductividad eléctrica están en función de las necesidades nutricionales de las raíces (Lian *et al.* 2015). Por lo tanto, puede ser usada como un método indirecto para estimar la biomasa. Por lo general esta decrece en el medio de cultivo a mientras transcurre el tiempo de cultivo (Cui *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013). El mayor descenso de conductividad se presentó con el tratamiento 9.9

μM de IBA. (0.39 mScm^{-1}) (Figura 10 B). Según lo reportado por (Pavlov *et al.* 2005) en cultivo de raíces pilosas de *B. vulgaris*, un decremento en la conductividad eléctrica va seguido de un incremento en la producción de biomasa, lo cual puede ser representado mediante una ecuación matemática entre la acumulación de biomasa y la conductividad eléctrica del medio de cultivo.

La producción máxima de compuestos fenólicos fue de $18.9 \text{ mg E A.G/g ES}$ con $9.9 \mu\text{M}$ de IBA (Figura 11 A). Mientras que con $24.6 \mu\text{M}$ de IBA se logró una producción máxima de flavonoides y con $49.3 \mu\text{M}$ de IBA de betalaínas (5.14 mg EA/g E.S) (Figura 11 B y C). Diversos estudios sugieren que el IBA promueve la acumulación de compuestos bioactivos, por ejemplo, en *O. elatus* se reportó un efecto similar evaluando diferentes concentraciones del mismo fitorregulador, siendo la concentración de $15 \mu\text{M}$ de IBA con la cual se obtuvo mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, 36.2 y 56.2 mg/g P.S respectivamente (Jiang *et al.* 2015). Por otra parte, en *E. angustifolia* se ha reportado la máxima acumulación de compuestos fenólicos con concentraciones de $10 \mu\text{M}$ de IBA (Wu *et al.* 2006) y *M. citrifolia* con concentraciones de $25 \mu\text{M}$ de IBA para la producción de antraquinonas, compuestos fenólicos y flavonoides (Baque *et al.* 2010).

De forma similar en cultivos de *B. vulgaris* (Bhagyalakshmi *et al.* 2004) y de *E. longifolia* (Tao *et al.* 2015), observaron que al incrementar la concentración del regulador de crecimiento incrementaron también la acumulación de betalaínas y compuestos fenólicos respectivamente a lo encontrado en este trabajo. Cabe destacar que según estudios realizados por Méndez (2017) con células en suspensión de *G. globosa*, estos cultivos producen y/o acumulan de forma mayoritaria compuestos fenólicos, principalmente ácido ferúlico. Adicionalmente, el cálculo del rendimiento de producto/biomasa mostró que el mayor rendimiento para la producción de compuestos fenólicos se presentó con el tratamiento $24.6 \mu\text{M}$ de IBA. Para flavonoides, el mayor rendimiento lo presentó el tratamiento control. Por otra parte, el mayor rendimiento para betalaínas se presentó con el tratamiento $49.3 \mu\text{M}$ de IBA.

Los carbohidratos, en especial la sacarosa, son fuentes importantes de carbono y energía. Y ha sido demostrado que la concentración de sacarosa puede afectar el crecimiento, el desarrollo y el metabolismo vegetal (Cui *et al.* 2014).

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de sacarosa en la producción de los metabolitos secundarios de *G. globosa*, para los compuestos fenólicos se seleccionó el medio suplementado con 9.9 μM de IBA, encontrando que la máxima producción fue de 26.52 mg E. A.G/ g E. S, con la concentración de 50 g L⁻¹ de sacarosa en el día 24 (Figura 14 A) mientras que la mayor producción de flavonoides fue de 0.53 mg E. Q/ g E.S en el día 24 (Figura 14 B). Por otro lado, el incremento o disminución de la concentración de sacarosa no incrementó la producción de betalainas, en los cultivos suplementados con 49.3 μM de IBA (Figura 17 C), siendo la mejor condición la del control con 30 g/L de sacarosa (en la cual se produjo 4.72 mg E.A/ g E.S).

Diversos estudios indican que la concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo es extremadamente importante en la producción de metabolitos. Sin embargo, los resultados pueden variar según la especie vegetal. Esto está de acuerdo con lo reportado por Yin *et al.* (2013), indicando que a concentración de 40 g L⁻¹ de sacarosa obtuvo la mayor producción de saponinas y polisacáridos en *P. heterophyllia*. Sin embargo, Wu *et al.* (2006) reportó que el mayor contenido de compuestos fenólicos y flavonoides se obtuvo con una concentración de 50 g L⁻¹ de sacarosa. Por otra parte, Jiang *et al.* (2015) reporta una mayor acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides que *G. globosa* en *O. elatus*, siendo de 39.6 y 39.2 mg/ g E.S. respectivamente. Por lo que el incremento en la producción de compuestos fenólicos en puede estar relacionado con la concentración de sacarosa adecuada. Así mismo, el efecto de la concentración de auxina o bien el conjugado (auxina/carbohidrato) en el metabolismo secundario en los cultivos de raíces guardan relación con la morfología y especialización celular (Cui *et al.* 2010). Esto muestra que, el incremento en la producción de compuestos bioactivos está asociado con el crecimiento celular.

Según lo reportado en algunas especies vegetales, concentraciones elevadas de sacarosa podrían afectar la producción de biomasa, así como la acumulación de compuestos bioactivos (Wu *et al.* 2006). Por otra parte, dado que la sacarosa regula la presión osmótica, así como la acumulación de metabolitos, probablemente concentraciones elevadas de sacarosa pueden causar una condición de estrés de tipo osmótico, impidiendo el desarrollo de las raíces de *G. globosa*, así como una disminución en la producción de metabolitos secundarios debida a la baja acumulación de biomasa, este mismo fenómeno concuerdan con lo reportado en los cultivos *in vitro* de *P. sepium* (Zhang *et al.* 2012), en *P. heterophylla* (Yin *et al.* 2013) y en *H. perforatum* (Cui *et al.* 2010)

En este trabajo, se observó que las raíces adventicias de *G. globosa* bajo diferentes concentraciones de IBA 9.9 uM y combinación de IBA con diferentes concentraciones de sacarosa, la acumulación de compuestos fenólicos mediante UHPLC, presuntivamente el ácido protocatecuico (PCA) el cual es un ácido dihidroxibenzoico, un tipo de ácido fenólico (Figura 18). Este compuesto es uno de lo más estudiados que se encuentra en forma natural y está presente en la mayoría de las plantas comestibles utilizadas en la medicina popular. Posee similitud estructural con el ácido gálico, el ácido cafeíco, el ácido vanílico y el ácido siríngico, que son compuestos antioxidantes bien conocidos. Más de 500 plantas contienen PCA como constituyentes activos que imparten diversas actividades farmacológicas y estos efectos se deben a sus actividades antioxidantes, junto con otros posibles mecanismos, como las propiedades antiinflamatorias y la interacción con varias enzimas (Sahil & Bais, 2014). Sin embargo, se desconoce la cantidad acumulada bajo las condiciones estudiadas en este en este trabajo.

Finalmente, cabe destacar que este trabajo es el primer reporte del estudio de cultivo *in vitro* de raíces adventicias de *G. globosa* mostrando que el tipo de entorno *in vitro* afecta fuertemente el crecimiento y la acumulación de compuestos fenólicos, flavonoides y betalaínas de cultivos adventicios de raíces de *G. globosa*.

9. CONCLUSIONES

- Los cultivos de raíces adventicias de *G. globosa* cultivadas en medio líquido presentaron mayor crecimiento y producción de compuestos fenólicos en comparación al medio sólido.
- Las raíces de *G. globosa* mostraron mayor crecimiento y producción de compuestos fenólicos y betalaínas en el medio de cultivo B5 en comparación al medio MS.
- La concentración de IBA a 9.9 μM presentó la mayor acumulación de compuestos fenólicos. Sin embargo, la concentración de IBA 49.3 μM indujo una mayor acumulación de betalaínas.
- La concentración de sacarosa de 40 gL^{-1} con IBA a 9.9 μM indujo el mayor desarrollo y crecimiento de raíces adventicias de *G. globosa*, mientras que con sacarosa 50 gL^{-1} de sacarosa se presentó la mayor acumulación de compuestos fenólicos. Por otro lado, con la concentración de IBA 49.3 μM y de sacarosa 30 gL^{-1} indujo una mayor acumulación de betalaínas.

10. REFERENCIAS

1. Arcanjo, D. D., 2010. Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic antimicrobial and cardiovascular effects of *G. globosa* L. (Amaranthaceae). *Journal of Medicinal Plants Research Vol 5(10)*.
2. Bais, H. P., H. P., Sudha, G. & Ravishankar, G. A., 2001. Influence of polyamines on growth and coumarin production in hairy root cultures of *Cichorium intybus* L.. *Plant Growth Regul.*, p. 18:33–37..
3. Baque , M. A., Murthy, H. N. & Paek , K. Y., 2014. Adventitious root culture of *Morinda citrifolia* in Bioreactors for production of bioactive compounds.. *Springer*, p. pp 185–222..
4. Bourgaud , F., Gravot, A., Milesi , S. & Gontier , E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.. *Plant Science*, pp. 161:839-851.
5. Cai , Y., Sun , M. & Corke , H., 2001. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in the Amaranthaceae.. *Agric Food Chem*, pp. 49: 1971-1978.
6. Calva, G. & Pérez, J., 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales; fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, pp. vol. 6, No.11 ISSN: 1607 – 1609.
7. Capataz, T., Trejo , G., Rodríguez, M. & Sepúlveda , G., 2011. Arabinogalactan proteins are involved in cell aggregation of cell suspension cultures of *Beta vulgaris* L.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, pp. 106(1), 169-177.
8. Cui , N. Y., Baque , M. A., Lee , E. J. & Paek , K. Y., 2013. Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives.. *Plant Biotechnol*, p. Rep 7:297–308.
9. Dinda, B. y otros, 2004. Phytochemical investigation of *Gomphrena globosa* aerial parts.. *Indian Journal of Chemistry*, pp. Sect. B: Organic chemistry, 43(10), 2223-7.
10. Dodds, J. H. & Roberts, L. W., 1990. *Experiments in Plant Tissue Culture*. 2nd Ed. Published by Cambridge University Press.: s.n.
11. Ferreres, F., Gil, A. & Valentão , P., 2011. Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-Performance liquid

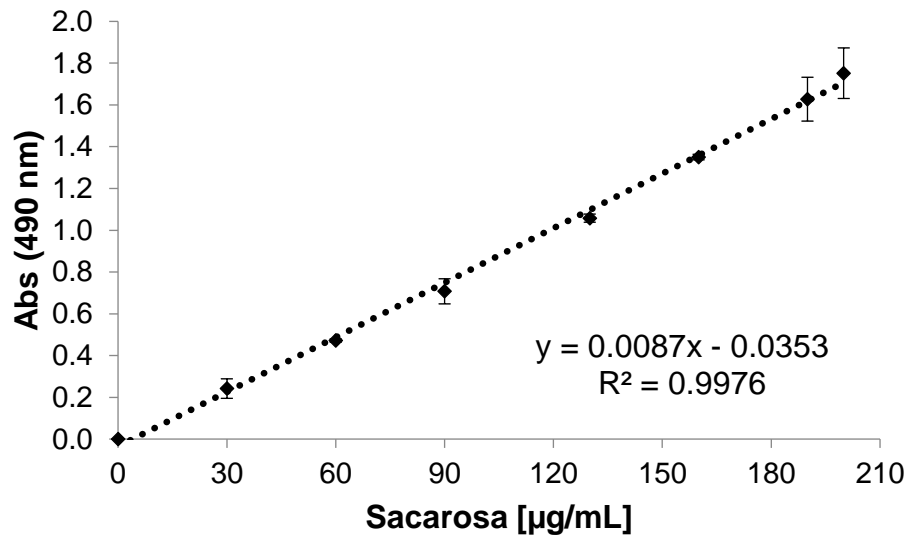
- chromatography dio de array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* , p. 3441–3446..
12. Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A. & Vasil, I. K., 1976. Plant tissue culture media.. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, pp. 12, 473–478..
 13. Gilman , E. & Howe , T., 2014. Gomphrena globosa Globe Amarantha University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
 14. Gómez, Y. A., Zamilpa, A., González, M. & Trejo, G., 2011. Adventitious root cultures of Castilleja tenuiflora Benth. as a source of phenylethanoid glycosides. *Industrial Crops and Products*.
 15. Harish , C. U., Saini, D. C. & Santosh , K. S., 2011. Phytochemical analysis of Ammannia multiflora.. *Research Journal of Phytochemistry*, pp. 5: 170-176..
 16. Heuer , S., Wray , V., Metzger , J. W. & Strack, D., 1992. Betacyanins from flowers of Gomphrena globosa *Phytochemistry*. pp. 31: 1801-1807..
 17. Huerta, A. A. y otros, 2009. Oxidative stress induces alkaloid production in Uncaria tomentosa root and cell cultures in bioreactors. *Eng. Life Sci*, p. 9(3):211–218..
 18. Kleinowski , M. E. & Rodrigues, M., 2014. Salicylic acid on antioxidant activity and betacyan in production from leaves of Alternanthera tenella. *Ciencia Rural, Santa Maria*, pp. v.44, n.10, p.1893-1898..
 19. Lee , E. J., Moh , S. H. & Paek, K. Y., 2011. Influence of inoculum density and aeration volume on biomass and bioactive compound production in bulb-type bioreactor cultures of Eleuterococcus koreanum Nakai. *Bioresour Technol* , p. 102:7165–7170..
 20. Lubbe, A. & Verpoorte , R., 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for pecialty industrial materials in Industrial. *Crops and Products*, pp. Crops and Products 34(1):785-801..
 21. Mendez, L., 2017. Producción de betalainas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *G. globosa*.. Tesis de Maestría en Biotecnología.
 22. Mohammed, S. D., 2010. The Effectiveness of Ethanolic Extract of Amaranthus tricolor L.: A Natural Hepatoprotective Agent. *ISSN 1678-4596 Med.*, 38, 1051..

23. Monroy, M. R., Aparicio, A. J., Ortíz, G. D. & Jiménez, G. S., 1994. Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnology Letters*, pp. 16(8), 853-858.
24. Moreira, M. F., Appezzato-da-Glória, B. & Zaidan, L. B., 2000. Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gomphrena macrocephala*. *St.-Hil. Brazilian Archives of Biology and Technology*, pp. 43(2), 221-227..
25. Mroczek, A., 2015. Phytochemistry and bioactivity of triterpene saponins from Amaranthaceae family. *Phytochem*, p. 14:577–605.
26. Mroginski, L. A. & Roca, W. M., 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Cultivo de tejidos en la agricultura. *Fundamentos y aplicaciones (19-40)*, pp. Cali, Colombia. Eds. Roca, WM & Mroginski, LA.
27. Pak, G. I., 2007. Effect of Different Hormonal Combinations on Regeneration Callus *Gomphrena globosa* L.. *J Biol Sci 10 (20)*, pp. 3708-3712..
28. Pérez, N., Capote, A., Gerth, A. & Jiménez, E., 2012. Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems.. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, pp. 110: 153-162..
29. Qu, J., Zhang, W. & Yu, X., 2011. A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*.. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 107(2), 261-269..
30. Rao, R., 2002. Biotechnol Adv. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. pp. 101-53.
31. Salvador, M. y otros, 2012. Bioactive Chemical Constituents and Biotechnological Production of Secondary Metabolites in Amaranthaceae Plants, Gomphreneae Tribe Biotechnological. *Production of Plant Secondary Metabolites*, pp. 124-158.
32. Savithramma, N., Ling, R. M. & Ankanna, S., 2012. Preliminary Phytochemical Screening Of Some Important Medicinal Plants. *International Journal Of Ayurvedic and Herbal Medicine*, p. 139:145.
33. Silva, L. R., Valentão, P., Faria, J. & Ferreres, F., 2012. Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food chemistry*, pp. 135(2), 756-763..

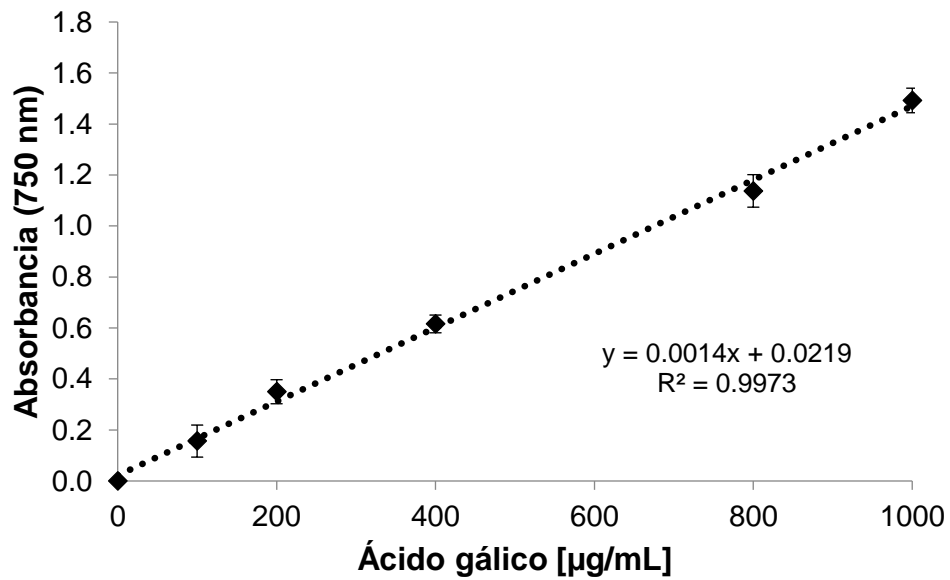
34. Singh, A., Kandasamy, T. & Odhav, B., 2009. In vitro propagation of *Alternanthera sessilis* (sessile joyweed), a famine food plant.. *African Journal of Biotechnology*, p. 8(21).
35. Singleton , V. L., 1982. Grape and wine phenolics; background and prospects.. *In: Grape and Wine Centennial Symposium, Proceedings of the University of California*, p. Davis: 215–227..
36. Sivakumar, G., Yu , K. W. & Paek , K. Y., 2006. Enhanced production of bioactive ginsenosides from Adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor culture.. *J Hort Sci Biotechnol*, p. 81:549–552..
37. Tanaka, Y., Sasaki, N. & Ohmiya, A., 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids.. *The Plant Journal*, pp. 54(4), 733-749..
38. Tao , L. & Young , P. P., 2015. Production of biomass and bioactive compounds from Adventitious roots by optimization of culturing conditions of *Eurycoma longifolia* in balloon-type bubble biorreactor. *Journal of bioscience and bioengineering*, pp. Vol. 119 No. 6, 702-717..
39. Tsuji, T. y otros, 1998. Anti-helicobacter pylori saponin From *Gomphrena globosa*.. *Jpn Kobai Tokkyo Koho JP* , p. 10: 488..
40. V.L., S., 1982. Grape and wine phenolics; background and prospects. *In: Grape and Wine Centennial Symposium, Proceedings of the University of California*, p. Davis: 215–227.
41. Vanisree, M. y otros, 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites. *Bot. Bull. Acad.*, pp. Sin 45: 1-22 1..
42. Vizoso, S. y otros, 2000. Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants. *Planta* 211, , pp. 563-574.
43. Wang, M. Y., Wu, L. H. & Zhang, J., 2009. Impacts of root sulfate deprivation on growth and elements concentration of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) under hydroponic condition.. *Plant, Soil and Environment*, pp. 55(11), 484-493..
44. Zhou, M. L. y otros, 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

9. ANEXOS

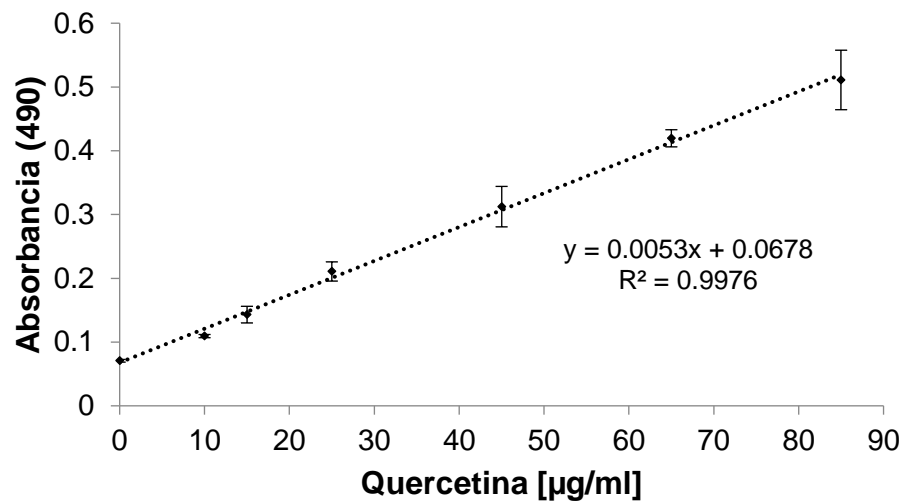
Anexo 1. Curva de calibración de sacarosa



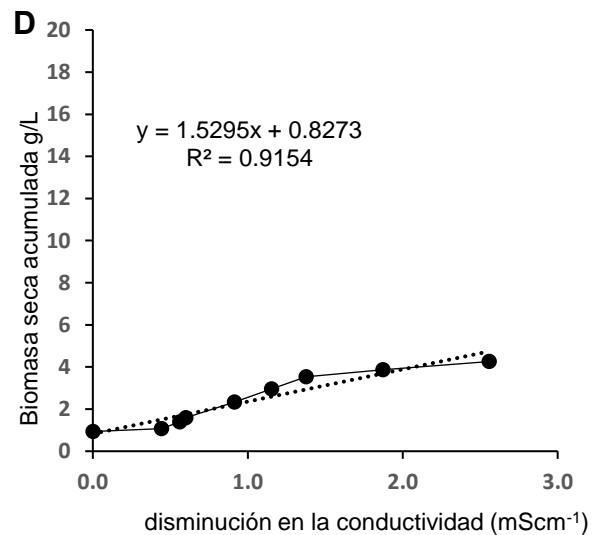
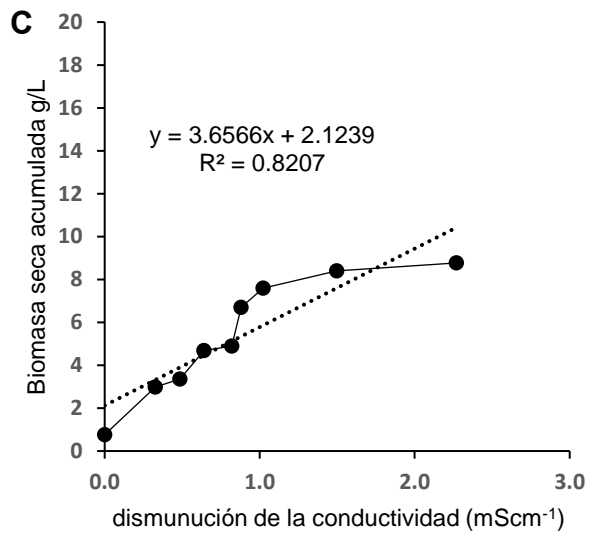
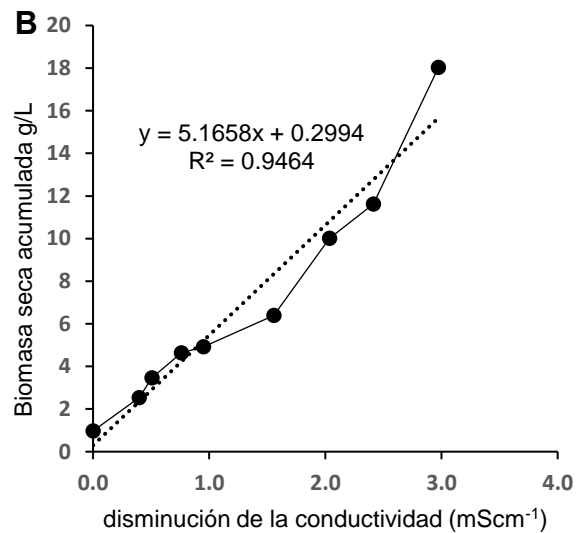
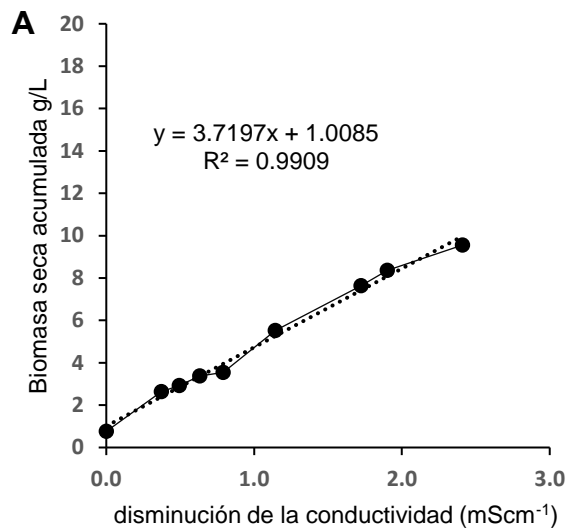
Anexo 2. Curva de calibración de fenoles totales



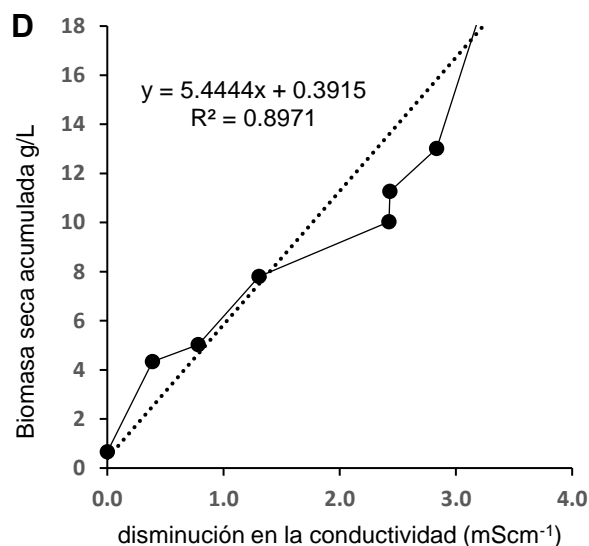
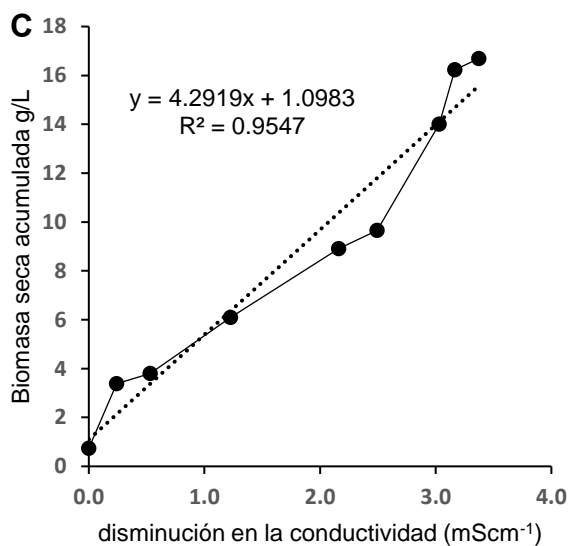
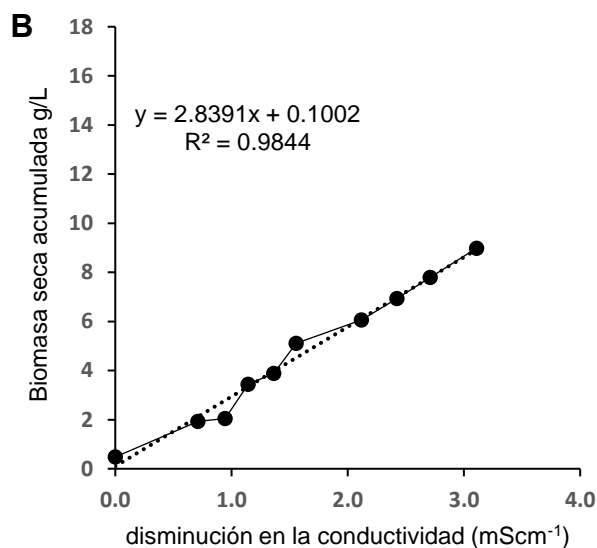
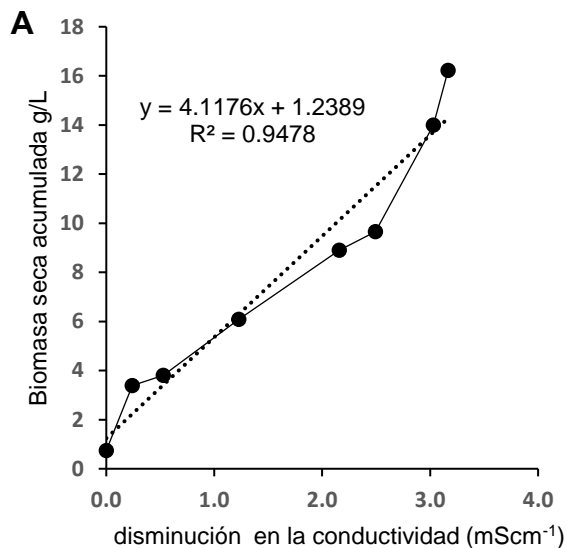
Anexo 3. Curva de calibración de flavonides

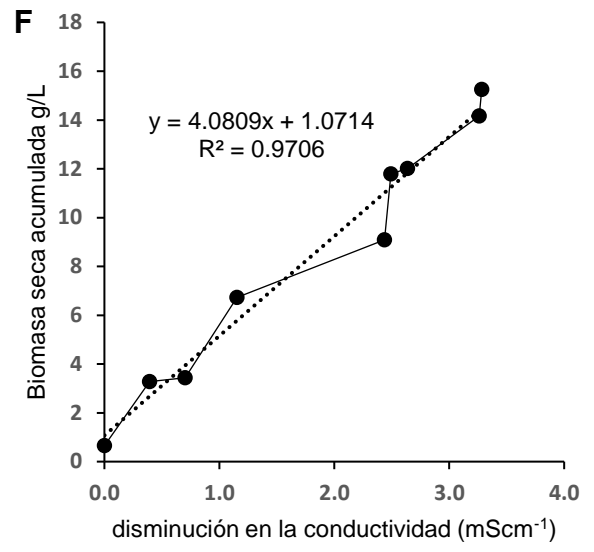
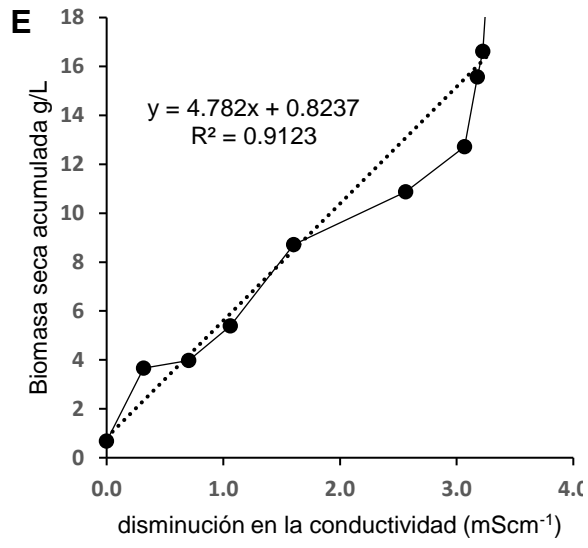


Anexo 4. Gráficas de relación entre el incremento de biomasa acumulada y el decremento de la conductividad en cultivo de raíces de *G. globosa*. A. Control, B. IBA 9.9 μM , C. IBA 24.6 μM y D. IBA 49.3 μM .



Anexo 5. Gráficas de relación entre el incremento de biomasa acumulada y el decremento de la conductividad en cultivo de raíces de *G. globosa* con IBA 9.9 μM y sacarosa. A. 10 g L⁻¹, B. 20 g L⁻¹, C. 30 g L⁻¹, D. 40 g L⁻¹, E. 50 g L⁻¹, F. 60 g L⁻¹.





Anexo 6. Gráficas de relación entre el incremento de biomasa acumulada y el decremento de la conductividad en cultivo de raíces de *G. globosa* con IBA 49.3 μM y sacarosa. A. 10 g L⁻¹, B. 20 g L⁻¹, C. 30 g L⁻¹, D. 40 g L⁻¹, E. 50 g L⁻¹, F. 60 g L⁻¹.

