

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC**

**“Transformación genética de *Gomphrena globosa* L.
mediada por *Agrobacterium rhizogenes*”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

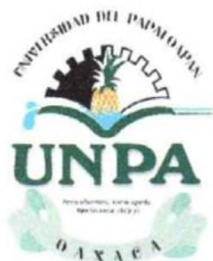
PRESENTA:

FRANK URIEL COHETERO SANTIAGO

Director:

Dr. Edgar García López

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, 2019.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 21 de febrero de 2019
Oficio No. JCIB/007/02/2019

Frank Uriel Cohetero Santiago
Alumno de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

En respuesta a su solicitud de revisión de tesis y con base en los profesores sugeridos por usted, le hago de su conocimiento que el Comité Revisor de su tesis titulada "**Transformación genética de *Gomphrena globosa* L. mediada por *Agrobacterium rhizogenes*"** está compuesto de la siguiente manera:

Presidente: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Secretario: Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Vocal: Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Primer Suplente: Dr. Enrique Villalobos Amador
Segundo Suplente: Dr. Julián Mario Peña Castro

Anexo a este oficio están las cartas de asignación para ellos.

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.



JEFATURA DE INVESTIGACIONES
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

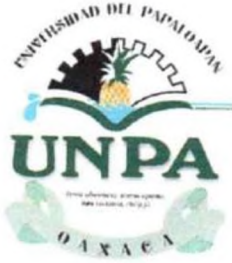
Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan

DIRECTORIA
ACADEMICA

c.c.p. Dr. Edgar García López. Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 04 de abril de 2019 a las 13 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Transformación genética de *Gomphrena globosa* L. mediada por *Agrobacterium rhizogenes***" presentada por el alumno **Frank Uriel Cohetero Santiago**, con número de matrícula **12090557**, aspirante al título de Licenciatura.


Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su aprobación para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de abril de 2019

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



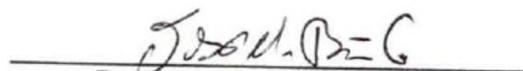
Dr. Edgar García López
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



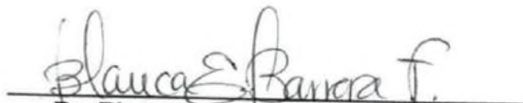
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

A mi gran familia:

Por el apoyo y respaldo que me brindaron durante el proceso de mi formación profesional. A mis padres, mis abuelos, mi hermana, tíos y primos. Cada consejo y cada regaño, son tan importantes como una clase con mis profesores. Pero sobretodo, agradezco el amor que me han mostrado desde el día que llegué a este mundo.

A Edith:

Mi motor principal en cuanto a cuestiones académicas. Mi novia, pero sobretodo, mi amiga y cómplice. Llegaste en el momento preciso, viste algo en mí que no sabía que existía, así que esto también es obra tuya en gran parte.

Al Dr. Edgar García López, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y por todo lo que aprendí gracias a él. Toda mi admiración y respeto.

A la Dra. Jacqueline Capataz Tafur, por permitirme trabajar en el laboratorio de cultivo de células vegetales y por facilitarme los equipos y reactivos necesarios. Su apoyo fue de suma importancia para que este proyecto saliera adelante.

A la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Dr. Julián Mario Peña Castro y Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello, por las ocasiones en que necesitaba algún reactivo o equipo que no tenía disponible y que muy amablemente me facilitaron. Los admiro como profesionales, pero más como personas.

A mis revisores, Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa, Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo, Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia, Dr. Julián Mario Peña Castro y Dr. Enrique Villalobos Amador, por sus correcciones para hacer de éste un mejor trabajo.

A todos los amigos y compañeros que hicieron la estancia más divertida. Roque, Sosa, Samuel, Nuria, Mayra, Fernando, David, Abi, Cris, Celenia, Magda, Betzy, Fernanda, José, Lupita, Manzano y muchos más. Gracias a todos ustedes, las risas nunca faltaron, pasé momentos increíbles que siempre recordaré y espero en el futuro revivir tantas anécdotas para volver a reír a carcajadas. Los quiero a todos.

DEDICATORIA

a MIS PADRES

Sabiendo que no existirá una forma de agradecer todo una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es suyo, y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo. Los amo.

CON CARÍO Y ADMIRACIÓN:

SU HIJO FRANK

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 Medicina tradicional.....	3
2.1.1 Las plantas medicinales en la economía.....	4
2.2 Estudios de plantas medicinales.....	4
2.3 Planta modelo: <i>Gomphrena globosa</i> L.....	6
2.3.1 Descripción botánica.....	6
2.3.2 Fenología, hábitat y distribución geográfica.....	7
2.3.3 Usos y propiedades.....	7
2.4 Potencial biotecnológico de <i>Gomphrena globosa</i>	8
2.4.1 Estudios de caracterización fitoquímica de <i>Gomphrena globosa</i>	8
2.5 Técnicas y tipos de cultivo <i>in vitro</i>	9
2.5.1 Cultivo de callos.....	10
2.5.2 Cultivo de células en suspensión.....	10
2.5.3 Cultivo de raíces transformadas.....	11
2.6 Agrotransformación.....	12
2.6.1 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	14
2.6.2 Transformación de <i>Amaranthaceae</i>	15
3 JUSTIFICACIÓN.....	16

4	HIPÓTESIS	17
5	OBJETIVOS	17
5.1	General.....	17
5.2	Específicos.....	17
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1	Estrategia experimental.....	18
6.2	Material biológico	19
6.3	Métodos.....	19
6.3.1	Propagación <i>in vitro</i> de material vegetal	19
6.3.2	Cepas bacterianas.....	19
6.3.3	Agrotransformación de <i>G. globosa</i>	20
6.3.4	Confirmación de la transformación genética	20
6.3.5	Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios en raíces de <i>G. globosa</i> ..	21
6.3.6	Análisis estadístico.....	23
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
7.1	Propagación de <i>G. globosa in vitro</i>	24
7.2	Caracterización de las cepas bacterianas	25
7.3	Inducción de raíces transformadas.....	26
7.4	Confirmación de la transformación genética de las raíces inducidas	29
7.5	Cuantificación de metabolitos secundarios.....	32
7.5.1	Fenoles totales y flavonoides	32
8	CONCLUSIONES	36
9	PERSPECTIVAS	37
10	REFERENCIAS	38
11	ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Gomphrena globosa</i>	6
Figura 2. Modelo para la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium sp</i>	13
Figura 3. Plásmido <i>Ri</i> en <i>A. rhizogenes</i>	14
Figura 4. Estrategia experimental.....	18
Figura 5. Fases del proceso de micropropagación de <i>G. globosa</i>	24
Figura 6. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>G. globosa</i> . Apariencia y promedio de plántulas regeneradas después de 45 días de cultivo.	25
Figura 7. <i>A. rhizogenes</i> creciendo en placa de Petri después de 2 días de crecimiento.....	25
Figura 8. Cinética de absorbancia a 540 nm de las cepas K599 y AR4 de <i>A. rhizogenes</i>	26
Figura 9. Meristemo de raíz presuntamente transformada con la cepa K599 emergiendo en un punto de infección, después de 10 días de la punción.	27
Figura 10. Propagación de raíces presuntamente transformadas de <i>G. globosa</i> en medio de cultivo semisólido, presentando ageotropismo y alta pilosidad.	29
Figura 11. Detección del gen <i>rolB</i> por PCR.....	30
Figura 12. Detección del gen <i>rolB</i> por PCR.....	31
Figura 13. Detección del gen <i>rolB</i> por PCR.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios realizados en diferentes especies para validar sus propiedades medicinales....	5
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>G. globosa</i>	7
Tabla 3. Medio MS para inducción de brotes.....	19
Tabla 4. Oligonucleótidos para amplificar el fragmento del gen <i>rolB</i>	21
Tabla 5. Resultados de la inducción de raíces transformadas en plántulas de <i>G. globosa</i>	28
Tabla 6. Cuantificación de fenoles totales en raíces de <i>G. globosa</i>	33
Tabla 7. Cuantificación de flavonoides en raíces de <i>G. globosa</i>	34

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
EAG: Equivalentes de ácido gálico
EQ: Equivalentes de quercetina
ES: Extracto seco
g: gramos
h: horas
hr: hairy roots
LB: Luria Bertani
M: Molar
mg: miligramos
min: minutos
ml: mililitros
mm: milímetros
MS: Murashige & Skoog
nm: nanómetros
OD: Densidad óptica
p: peso
pb: pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
ppm: partes por millón
PS: Peso seco
T-ADN: ADN de transferencia
v: volumen
%: porcentaje
µg: microgramos
µl: microlitros

RESUMEN

Gomphrena globosa L. es una especie perteneciente a la familia de las *Amaranthaceae*, que en sus órganos puede acumular fenoles, flavonoides y otros compuestos que también presentan actividad biológica. Es considerada como planta medicinal porque puede ser empleada para el tratamiento de algunas enfermedades como problemas renales, fiebre, cólicos, hipertensión, entre otros. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de transformación genética para *G. globosa* L. mediante la infección de tallos con las cepas K599 y AR4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Para ello, se utilizaron plántulas de cultivo *in vitro* de aproximadamente cuatro semanas de edad, que fueron infectadas con las cepas K599 y AR4. La aparición de raíces presuntamente transformadas se pudo apreciar al día 10 ± 1 y 13 ± 1 posteriores a la infección de las plántulas con las cepas K599 y AR4 respectivamente. Se pudo observar que la virulencia fue similar para ambas cepas hacia *G. globosa*, de acuerdo a la agrupación por el método de Tukey. Las raíces potencialmente transformadas fueron transferidas a medio semisólido MS suplementado con $400 \mu\text{g/ml}$ de cefotaxima para eliminar la bacteria remanente, y subcultivadas las veces necesarias en medio fresco. Posteriormente se realizó la extracción de ADN genómico de raíces presuntamente transformadas, que se utilizó para confirmar la transformación mediante PCR punto final utilizando oligonucleótidos que amplificaban un fragmento del gen *rolB* transferido por las cepas de *A. rhizogenes*. Los productos de PCR permitieron confirmar la transformación de 5 líneas de raíces originalmente inducidas con la cepa K599 y una sola línea transformada con la cepa AR4. La frecuencia de transformación fue de 50 y 20 % para las cepas K599 y AR4 respectivamente, aunque cabe mencionar que el protocolo propuesto aún tiene capacidad de optimizarse. Por último, se realizó la determinación de fenoles y flavonoides en las líneas transformadas las cuales mostraron mayor contenido de ambos metabolitos, de hasta 4.5 veces más comparadas con las no transformadas. Tal efecto potenciador en la acumulación de metabolitos secundarios en tejidos vegetales transformados genéticamente ha sido ampliamente reportado en otras especies con resultados favorables en comparación con tejidos no transformados. Las líneas de raíces transformadas de *G. globosa* establecidas podrán ser utilizadas en futuros estudios de mejora de producción de fenoles y flavonoides, y en estudios de regulación biosintética.

Palabras clave: *Agrobacterium rhizogenes*, agrotransformación, *Gomphrena globosa*, raíces transformadas.

ABSTRACT

Gomphrena globosa L. is a species belonging to the *Amaranthaceae* family, which can accumulate phenols, flavonoids and other compounds that also have biological activity. It is considered as a medicinal plant because it can be used for the treatment of some diseases such as kidney problems, fever, colic, hypertension, among others. The objective of this work was to develop a protocol for genetic transformation of *G. globosa* L. by infecting stems with the strains K599 and AR4 of *Agrobacterium rhizogenes*. Four week old *in vitro* seedlings of *G. globosa* were infected with the strains K599 and AR4. The emergence of putative transformed roots could be appreciated at day 10 ± 1 and 13 ± 1 after the infection of the seedlings with the K599 and AR4 strains respectively. It was observed that the virulence was similar for both strains towards *G. globosa*, according to the grouping by the Tukey method. The putatively transformed roots were transferred to medium semisolid MS medium supplemented with 400 µg/ml cefotaxime to remove remaining bacteria, and were repeatedly subcultured in fresh medium. Subsequently, genomic DNA from putative transformed roots was extracted and it was used to confirm the transformation by endpoint PCR using oligonucleotides to amplify a fragment of the *rolB* gene transferred by strains *A. rhizogenes*. PCR products allowed confirming the transformation of 5 root lines originally induced with the K599 strain and a single root line transformed with the AR4 strain. The transformation frequency was 50 and 20 % for K599 and AR4 strains respectively, although it is worth mentioning that the proposed protocol can still be optimized. Finally, phenols and flavonoids were determined in the transformed lines, which showed a higher content of both metabolites, up to 4.5 times more compared with the non-transformed ones. Such an enhancing effect in the accumulation of secondary metabolites in genetically transformed plant tissues has been widely reported in other species with favorable results compared to non-transformed tissues. The transformed root lines of *G. globosa* established may be used in future studies for production improvement of phenols and flavonoids, and biosynthetic regulation studies.

Keywords: *Agrobacterium rhizogenes*; agrotransformation; *Gomphrena globosa*; hairy roots.

1 INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales en nuestro país ha formado parte de nuestra historia y costumbres. Las cualidades especiales de estas plantas como remedio para combatir todo tipo de enfermedades se remonta a tiempos prehistóricos y su aprovechamiento sin duda comenzó con la continua experimentación de materiales vegetales diversos, que de acuerdo a sus características únicas ofrecían agradables aromas, sabores en los alimentos, alivio del dolor y cura de enfermedades (Juárez Rosete *et al.*, 2013).

De estas plantas se han identificado hasta 5,000 especies que tienen aplicaciones curativas y en el ámbito nacional su comercialización funciona en mercados locales y pueden ser de gran importancia económica en el ámbito internacional por la amplia gama de principios activos que presentan, los cuales debido a su actividad biológica han incrementado el interés en su obtención, esto con el fin de obtener principalmente fármacos (Juárez Rosete *et al.*, 2013).

Entre las plantas que tienen un gran potencial farmacológico están las pertenecientes a la familia *Amaranthaceae*, que incluye aproximadamente 176 géneros y 2400 especies. Son consideradas como una fuente de moléculas bioactivas que tienen uso en la nutrición y en la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes padecimientos como infecciones, inflamación y fiebre. En las especies pertenecientes al género *Gomphrena* se encuentran presentes una variedad de metabolitos como flavonoides, fitoesteroles, fenoles y terpenoides (Ilyas *et al.*, 2013).

El contenido de los metabolitos en una planta puede variar mucho en función del sitio de recolección o de características ontogénicas, por lo tanto, es necesario estandarizar las materias primas vegetales. Esto es posible mediante el empleo de técnicas de cultivo *in vitro*, que nos permiten crecer células, tejidos y órganos provenientes de las plantas en condiciones controladas de laboratorio (Villarreal *et al.*, 2014). Estos cultivos integran un conjunto de metodologías especializadas usadas para cultivar el material vegetal en forma estéril con medios nutritivos sólidos o líquidos, a los que se les adicionan reguladores de crecimiento vegetal. Utilizando estos cultivos, se ha logrado producir de manera homogénea y controlada

algunos compuestos de alto valor agregado que habitualmente se encuentran en la planta de origen (Villarreal *et al.*, 2014).

La acumulación de metabolitos con actividad biológica en tejidos vegetales puede ser mayor si se aplican técnicas de mejoramiento genético. La transformación genética de especies vegetales es un mecanismo ampliamente utilizado dentro del campo del fitomejoramiento (Blanco *et al.*, 2003). Estos sistemas permiten insertar genes foráneos de manera aleatoria dentro del genoma vegetal receptor para la creación de diversas especies vegetales genéticamente modificadas, conocidas también como plantas transgénicas (Sanagala *et al.*, 2017).

Para llevar a cabo la transformación genética, diversas técnicas como: Agrotransformación, biobalística, electroporación y microinyección, entre otras, nos sirven de apoyo (Potrykus *et al.*, 1998). El desarrollo de esta tecnología permite el mejoramiento de especies y aumentan el valor agronómico por la expresión de nuevos rasgos como la resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a herbicidas, plantas que son utilizadas como “bioreactores” para la síntesis de nuevos fármacos y aditivos alimenticios de calidad (Sanagala *et al.*, 2017).

Entre las técnicas que utilizan vectores biológicos se encuentra la transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium sp.* Particularmente, *A. rhizogenes*, una bacteria gram negativa patógena de plantas (Talano *et al.*, 2012), induce la formación de raíces en los puntos de infección en la planta huésped, conocidas como raíces transformadas. Dichas raíces presentan características ventajosas respecto a las raíces no transformadas, como la estabilidad genotípica y fenotípica, un crecimiento *in vitro* rápido e indefinido en ausencia de reguladores de crecimiento y una alta producción de metabolitos secundarios (Talano *et al.*, 2012).

Considerando además la importancia de *G. globosa* como fuente de metabolitos de interés farmacológico, este trabajo tiene como objetivo desarrollar y aplicar un protocolo de transformación mediado por *A. rhizogenes* que sirva para establecer cultivos de raíces transformadas de *G. globosa* con potencial biotecnológico para la obtención controlada de compuestos con actividad biológica producidos por *G. globosa*.

2 ANTECEDENTES

2.1 Medicina tradicional

Es ampliamente conocido que el uso de plantas medicinales para tratar un gran número de malestares es una práctica común en muchos países (Muñeton, 2009). En México, la medicina tradicional ha sido posicionada como una de las máximas expresiones del conocimiento tradicional indígena, con un notable arraigo en su uso, y el conocimiento en su aplicación se transmite principalmente de forma oral de generación en generación (Guzmán *et al*, 2015). Ejemplos clásicos son tomar un té de hierbabuena para curar el dolor de estómago o frotar algunas hierbas para disminuir el dolor de un golpe. Esto refleja la importancia que tienen las plantas medicinales en la vida cotidiana de la sociedad mexicana.

La medicina tradicional es un recurso importante y valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, incluso para la gran mayoría de comunidades indígenas representan el único acceso a la salud pública (Carvajal *et al*, 2009).

Por sus extraordinarias propiedades curativas, las plantas medicinales han estado recubiertas durante mucho tiempo de un toque “divino”, sea originalmente pagano o luego cristiano pero, han inspirado temor y desconfianza por sus propiedades siempre vinculadas a conocimientos ocultos (Salaverry, 2015). Transcurridos muchos años de estos mitos, las plantas medicinales continúan siendo para las diversas medicinas, incluyendo la occidental, otra alternativa para la terapéutica, pero es muy claro que una visión integral del rol que le corresponde al desarrollo y uso de las plantas medicinales en la sociedad moderna rebasa ampliamente a la medicina (Salaverry, 2005).

No obstante, los beneficios que las plantas medicinales nos ofrecen podrían verse afectados ya que algunas especies están en peligro de desaparecer, esto debido a diversos factores como la recolección excesiva y por actividades agrícolas (Juárez Rosete *et al.*, 2013).

A pesar de esto, en nuestro país se cuenta con una gran producción de plantas medicinales que representan importantes fuente de ingresos (Juárez Rosete *et al.*, 2013).

2.1.1 Las plantas medicinales en la economía

En regiones de México y otros países en desarrollo, donde gran parte de la población no tiene acceso a programas de salud pública y medicinas sintéticas, el uso y comercio de plantas medicinales se ha incrementado por cuestiones económicas, sociales y culturales (Rosada, 2014).

La comercialización de especies medicinales endémicas por tradición se da en mercados locales y la importancia económica que tienen a nivel internacional puede ser muy grande, esto por la amplia gama de moléculas bioactivas que presentan. Por ejemplo, en el mercado Sonora de la Ciudad de México se venden día con día aproximadamente unas 10 toneladas de plantas curativas (Muñeton, 2009). Se estima que la industria herbolaria del D.F. procesa y comercializa unas 2000 toneladas mensuales. Si se toman en cuenta los demás mercados de todas las capitales, los mercados regionales, y las empresas naturistas de provincia, al menos se comercializan 3,500 toneladas de plantas medicinales al mes en todo el país (Muñeton, 2009). Entre los cultivos mejor pagados destacan el comino (32,685 pesos por tonelada), la menta (22,099 pesos por tonelada) y el cebollín (17,367 pesos por tonelada) (Juárez Rosete *et al.*, 2013).

Además de esto, la comercialización de distintas especies genera empleos para familias rurales ya que muchas de ellas crecen de forma silvestre y para obtenerlas solo hace falta invertir tiempo, incluso algunas son consideradas malezas, como *G. globosa*. Todo lo anterior hace que sea importante preservar los conocimientos de sus usos e impulsar el estudio para validar sus efectos y, en última instancia, desarrollar y/o descubrir nuevos fármacos.

2.2 Estudios de plantas medicinales

En los últimos años se ha estudiado el efecto en la salud de los metabolitos con posible actividad biológica presentes en diversas plantas. (Quiñones *et al.*, 2012). Existen diversas investigaciones que tratan de validar sus efectos curativos (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios realizados en diferentes especies para validar sus propiedades medicinales.

Autor	Especie	Objetivo	Método	Resultados
Cheng <i>et al</i> , (2012)	<i>Cinnamomum verum</i>	Investigar los efectos hipoglucemiantes de extractos de canela.	Desarrollo de un alimento funcional con mejoramiento fitoquímico de extractos de canela haciendo evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Reducción considerable de niveles de glucosa en sangre de ratones.
Das <i>et al</i> , (2013)	<i>Citrus máxima</i>	Evaluar la actividad antibacterial de extractos etanólicos de hojas.	Discos de papel filtro impregnados con el extracto se colocaron sobre placas con co-cultivos bacterianos evaluando zonas de inhibición.	Máxima inhibición antibacteriana para <i>P. aeruginosa</i> . El valor MIC del extracto para <i>P. aeruginosa</i> era más bajo que <i>E. coli</i> . El valor de MBC fue el mismo para ambas bacterias.
Yenda <i>et al</i> , (2014)	<i>Benincasa hispida</i>	Investigar la actividad antioxidante de extractos de hojas.	Pruebas <i>in vitro</i> de extractos de hojas mediante el uso de radicales libres.	Actividad de captación de radicales libres de los extractos de hojas ensayados de <i>B. hispida</i> , comparada con la del fármaco estándar: ácido ascórbico.
Naidu <i>et al</i> , (2015)	<i>Ocimum bacilicum</i> y <i>Mentha spicata</i>	Determinar la actividad antiplaquetaria <i>in vitro</i> de extractos metanólicos.	Análisis HPLC y ensayo de agregación plaquetaria.	Análisis HPLC indicó presencia de polifenoles. Altos porcentajes de inhibición en la agregación plaquetaria.
Rampadarath & Puchooa, (2016)	<i>Ricinus communis</i>	Explorar las actividades fitoquímicas, antimicrobianas e insecticidas.	Determinación de fitoquímicos con solventes polares y no polares. Método de difusión en disco y pruebas de extractos crudos sobre larvas.	Todos los extractos de las diferentes partes de la planta mostraron actividad antimicrobiana contra la mayoría de los microorganismos probados.
Kharchouf <i>et al</i> , (2017)	<i>Stevia rebaudiana</i>	Caracterización química y evaluación antioxidante de sus extractos.	Cribado fotoquímico y uso de DPPH	Presencia de flavonoides, taninos, osas, entre otros fitoquímicos e importante capacidad antioxidante.
Kamaraj & Maduram, (2018)	<i>Clausena dentata</i>	Estudiar la actividad antiinflamatoria y analgésica.	Cromatografía en capa fina de extractos. Análisis de actividad antiinflamatoria mediante inducción de edema en ratones.	Presencia de diferentes fitoquímicos. Los extractos mostraron actividad analgésica significativa.

Al igual que las plantas de la tabla, existen otras plantas, como *G. globosa*, que son útiles como modelos vegetales para el estudio, descubrimiento e incremento en la producción de metabolitos con actividad biológica.

2.3 Planta modelo: *Gomphrena globosa* L.

2.3.1 Descripción botánica



Figura 1. *Gomphrena globosa* (Rahman & Akter, 2013).

G. globosa L, conocida comúnmente como “siempre viva” (Figura 1). Es una hierba erecta o postrada que alcanza hasta los 30 cm de altura, con tricomas pluricelulares, uniseriados o abietiformes; sus tallos son engrosados, cilíndricos o estriados pubescentes; presenta hojas opuestas, de color verde vivo, ovaladas y estrechas; sus inflorescencias son en forma de cabezuelas, globosas a hemiesféricas o cilíndricas, terminales y axilares, solitarias; de color púrpura a vino tinto; brácteas 2, foliosas, persistentes; bractéolas 2, carinadas, con o sin cresta dorsal dentada; flores perfectas, sépalos 5, estambres 5; filamentos connatos formando un tubo que llega hasta el ápice del perianto; estigma bifido, ovario globoso; el fruto es una cápsula (utrículo); y sus semillas lisas, invertidas (Pérez García, 2009). La clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *G. globosa* (Ilyas *et al.*, 2013).

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	<i>Amaranthaceae</i>
Genero	<i>Gomphrena</i>
Especie	<i>globosa</i> L.

2.3.2 Fenología, hábitat y distribución geográfica

G. globosa tiene un largo período de floración que comienza desde Abril hasta Agosto. Necesita estar expuesta al sol; el suelo debe tener una consistencia media, buen drenaje y con materia orgánica. Su distribución natural se encuentra relacionada a diferentes regiones del Centro y Sur de América, Australia y el Sudeste Asiático. En México se encuentra en los estados de Yucatán, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, San Luis Potosí y Nuevo León (Horticulture, 2006).

2.3.3 Usos y propiedades

Las hojas se usan como antimaláricas y para evitar la caída de los dientes; para detener la hemorragia de la nariz y calmante de los nervios. Toda la planta se utiliza como antipirética y diaforética; las hojas y las flores se usan como emolientes y para controlar la salivación sangrante; también tienen aplicación para tratar la inflamación, fiebre, problemas renales, cólicos, entre otros (Ilyas *et al.*, 2013).

2.4 Potencial biotecnológico de *Gomphrena globosa*

La metabolómica tiene una gran importancia en la caracterización y cuantificación de las moléculas pequeñas, productos del metabolismo primario o secundario, que se encuentran en los sistemas biológicos, especialmente en plantas ya que producen más de 200,000 diferentes tipos de fitoquímicos (García *et al.*, 2012), y la variedad de estructuras y colores reflejan la diversidad de plantas y sus perfiles metabólicos. Información como esta hace evidente la necesidad de trabajos de investigación que permitan identificar aquellos compuestos con actividad biológica presentes en las plantas medicinales.

2.4.1 Estudios de caracterización fitoquímica de *Gomphrena globosa*

G. globosa es una planta que, a pesar de no ser objeto de estudios intensivos, se sabe que produce principalmente triterpenos (Dinda *et al.*, 2004), hidroxicinamamidas, flavonoides, flavonas, flavonoles, saponinas, alcaloides, cumarinas, azúcares reductores (Arcanjo *et al.*, 2010) y betacianinas (gomphrenina I y II, isogomphrenina I, II y III y Sinapoil-gomphrenina I y II) (Silva *et al.*, 2012).

Estudios realizados por Cai *et al.*, (2005), muestran que *G. globosa* es una planta que acumula una importante cantidad de betalaínas (betacianinas y betaxantinas), los análisis detectaron 6 betacianinas tipo Gomphrenina: Gomphrenina I, Isogomphrenina I, Gomphrenina II, Isogomphrenina II, Gomphrenina III, Isogomphrenina III. En las pruebas realizadas todas las betalaínas exhibían una fuerte actividad antioxidante, pero al ser probadas en alimentos como colorantes, estas no fueron estables como los sintéticos.

Ferreres *et al.*, (2011) identifican el perfil metabólico de extractos acuosos de inflorescencias de *G. globosa*, llevado a cabo por HPLC-DAD/ESI-MS. Los resultados obtenidos proveen evidencia de la importancia de los estudios de fragmentación para la diferenciación e identificación de componentes que muestran estructuras similares en extractos complejos. Se describen 24 compuestos fenólicos entre los que destacan: ácido ferulico, quercetina y kaempferol.

Por otra parte Lobo *et al.*, (2014) realizaron estudios fitoquímicos en tres especies vegetales, entre ellas *G. globosa*, en las que se llevó a cabo la caracterización de compuestos fenólicos. Detectaron 27 compuestos fitoquímicos de los cuales 6 eran derivados de ácidos fenólicos, 15 flavonoides, otros derivados de flavonoides y 6 betacianinas. Se probó la actividad antioxidante

de estos compuestos, pero resulto ser baja en todos los ensayos ya que la concentración de fenoles en los extractos de las muestras también era baja.

Los pasados estudios representan una muestra del potencial biotecnológico de *G. globosa*, no obstante uno de los principales problemas con los que se encuentra el aprovechamiento de esta planta son los bajos rendimientos de recuperación de los compuestos bioactivos; aunque para ello existen numerosas alternativas de mejora como las que se explicarán a continuación.

2.5 Técnicas y tipos de cultivo *in vitro*

G. globosa es una planta que se encuentra comúnmente en jardines por su uso ornamental (Mahbubur & Ara, 2014). Diversos factores ecológicos y ambientales, así como el método de recolección empleado, tienen relevancia en la síntesis y acumulación de los compuestos con actividad biológica para esta especie (Villarreal *et al*, 2014). Es por eso que una de las alternativas para controlar las condiciones de cultivo y producción es el cultivo *in vitro* vegetal.

Esta técnica es denominada *in vitro* porque el material vegetal se cultiva en recipientes de vidrio o de plástico transparente y consiste en cultivar un inóculo bajo condiciones asépticas aprovechando su potencialidad de diferenciación en presencia de cantidades balanceadas de nutrientes y hormonas (Abdelnour & Vincent, 1994). Existen tres conceptos básicos que fundamentan el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales: totipotencialidad celular, desdiferenciación y balance de reguladores de crecimiento vegetal (Hurtado & Merino, 1987). La capacidad para regenerar con relativa facilidad tejidos, órganos e incluso una planta entera es única en plantas. Al cultivo *in vitro* lo podemos definir como un conjunto de técnicas que nos permiten tener control sobre el tejido de estudio y sus procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos (Abdelnour & Vincent, 1994).

El uso de las técnicas del cultivo vegetal *in vitro* puede ofrecer muchas ventajas para la producción de compuestos bioactivos al ser sistemas altamente controlados, estos pueden constituir modelos adecuados para realizar investigaciones bioquímicas y fisiológicas que ayuden a entender el metabolismo secundario de las plantas, así como a investigar aspectos básicos sobre sus mecanismos de especialización o diferenciación (Villarreal *et al.*, 2014). Entre los más importantes se encuentran los expuestos a continuación.

2.5.1 Cultivo de callos

Los callos son agregados de células proliferantes no especializadas que crecen en medios semisólidos en presencia de carbohidratos, sales minerales, vitaminas y aminoácidos, y que son suplementados con reguladores de crecimiento vegetal del grupo de las auxinas y las citocininas (Villa *et al.*, 2011). Estas últimas son las responsables de mantener el crecimiento no diferenciado (Villa *et al.*, 2011). Los callos crecen bajo condiciones estériles y usualmente se inducen a partir de tejidos jóvenes de la planta. En teoría, es posible obtener callos de todas las especies vegetales; sin embargo, las condiciones óptimas para su crecimiento dependen de cada especie y requieren ser determinadas (Villa *et al.*, 2011).

Diferentes trabajos en los que se han establecido o utilizado cultivos de callos para investigar su capacidad de producción de compuestos bioactivos se han llevado a cabo. Javad *et al.*, (2016) establecieron cultivos de callos para *Stevia rebaudiana* para la producción de esteviósidos obteniendo resultados favorables. De la misma forma Khurshid *et al.*, (2018) obtuvieron una mayor producción de compuestos con actividad antioxidante en cultivo de callos de *Eclipta alba*. Por otra parte Sarmadi *et al.*, (2018) investigaron los efectos de elicitors para la producción de metabolitos secundarios en cultivos de callos de *Taxus baccata*.

Los callos pueden variar en su textura, desde duros y compactos, a tejidos friables. Los tejidos callosos constituyen el material primario que permitirá establecer cultivos de células en suspensión (Villa *et al.*, 2011).

2.5.2 Cultivo de células en suspensión

Los cultivos de células en suspensión se establecen a partir de callos disgregados y transferidos a medios nutritivos líquidos conteniendo reguladores de crecimiento vegetal, y creciendo bajo condiciones controladas de iluminación (oscuridad, luz continua, o fotoperiodo) y temperatura (25 a 28°C) (Villarreal *et al.*, 2014). Los cultivos en suspensión crecen en agitación continua utilizando agitadores orbitales, lo que permite un mezclado continuo de nutrientes y disponibilidad de oxígeno disuelto. Las suspensiones celulares se subcultivan en medios frescos con regularidad. Diversos factores físico-químicos, nutricionales y hormonales juegan un papel crucial para lograr la producción óptima de los compuestos de interés (Villarreal *et al.*, 2014). La mayoría de los trabajos que utilizan cultivos de células en suspensión, se enfocan en el

mejoramiento de la producción de compuestos bioactivos en diferentes especies vegetales como: *Zea mays* (Nissan *et al.*, 2015), *Polygonum multiflorum* (Muthu *et al.*, 2016), *Solanum betaceum* (Alvez *et al.*, 2017) y *Barringtonia racemosa* (Osman *et al.*, 2018). Aun cuando hay muchos problemas que solucionar en relación con estos cultivos, los procesos industriales actuales se basan en cultivos de células en suspensión (Villarreal *et al.*, 2014).

Si los cultivos *in vitro* se incuban o someten a condiciones de estrés fisiológico, pueden expresar características de adaptación y resistencia que en condiciones naturales nunca manifestaron, creciendo selectivamente sólo aquellas células capaces de adaptarse a sus nuevas condiciones (Calva & Pérez, 2005). Esta variación genética también se puede inducir por técnicas de transformación genética por inclusión de ADN foráneo de manera similar a las aplicadas comúnmente en microorganismos (Crozier *et al.*, 2000) obteniendo cultivos o plantas transgénicas.

2.5.3 Cultivo de raíces transformadas

Estos cultivos son altamente diferenciados y potencialmente producen una mayor concentración de metabolitos secundarios (Giri & Narasau, 2000). Las raíces transformadas crecen en ausencia de reguladores vegetales y generalmente se obtienen por transformación genética a través de genes contenidos en plásmidos silvestres de la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. Se ha demostrado en distintas especies como: *Lactuca serriola* (El-Esawi *et al.*, 2017), *Althaea officinalis* (Travassoli & Safipour, 2018) y *Raphanus sativus* (Balasubramanian *et al.*, 2018), que los cultivos de raíces transformadas poseen una mayor capacidad de biosíntesis de algunos metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, ofreciendo de esta manera, un repertorio más amplio de producción de compuestos naturales al compararse con cultivos indiferenciados de las mismas especies vegetales como son los callos y las células en suspensión (Giri & Narasau, 2000). Los cultivos de raíces transformadas también ofrecen ventajas como una tasa de crecimiento acelerado libre de reguladores de crecimiento, estabilidad genética y bioquímica, capacidad biosintética eficiente comparada con raíces no transformadas, facilidad de preservación y una producción de biomasa estable (Balasubramanian *et al.*, 2018).

Por medio de estas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de patógenos en un medio aséptico bajo condiciones ambientales controladas. Además, estas técnicas cuentan

con numerosas aplicaciones como: propagación masiva de plantas (especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción), clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal), obtención de metabolitos secundarios, producción de nuevos híbridos, germinación de semillas, producción de haploides, estudios fisiológicos diversos y mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas) (Hu & Du, 2006; Villarreal et al., 2014; Balasubramanian *et al.*, 2018).

2.6 Agrotransformación

El proceso de transformación mediado por *A. rhizogenes* y *tumefaciens*, denominado agrotransformación, se utiliza principalmente por su facilidad y alto porcentaje de transformación en una gran variedad de especies vegetales (Blanco *et al.*, 2003).

El proceso de transformación, para ambas especies, se inicia cuando *Agrobacterium* sp. percibe señales químicas de las células dañadas de la planta, las cuales son consideradas como inductoras de la respuesta de virulencia (Figura 2). Entre estas señales químicas se encuentran, azúcares neutros y ácidos, como la glucosa y el ácido glucorónico, o hidrocarburos aromáticos monocíclicos, como acetosiringona, α -hydroxyacetosiringona, coniferyl alcohol y vainillina (Blanco *et al.*, 2003). El proceso de transformación comprende 10 etapas principales y comienza con el reconocimiento y la unión de *Agrobacterium* a la célula huésped (1) y la detección de señales de plantas específicas por el sistema de transducción de señal de dos componentes (2) de *Agrobacterium* VirA / VirG. Tras la activación de la región del gen vir (3), se genera una copia móvil del T-ADN por el complejo proteico VirD1 / D2 (4) y se administra como complejo VirD2-DNA (complejo T inmaduro), junto con otras proteínas Vir, en el citoplasma de la célula huésped (5). Tras la asociación de VirE2 con la hebra T, el complejo está en forma madura, viaja a través del citoplasma de la célula huésped (6) y se importa activamente en el núcleo de la célula huésped (7). Una vez dentro del núcleo, el T-ADN es reclutado hasta el punto de integración (8), despojado de sus proteínas de escolta (9) e integrado en el genoma del huésped (10) (Tzfira & Citovsky, 2006).

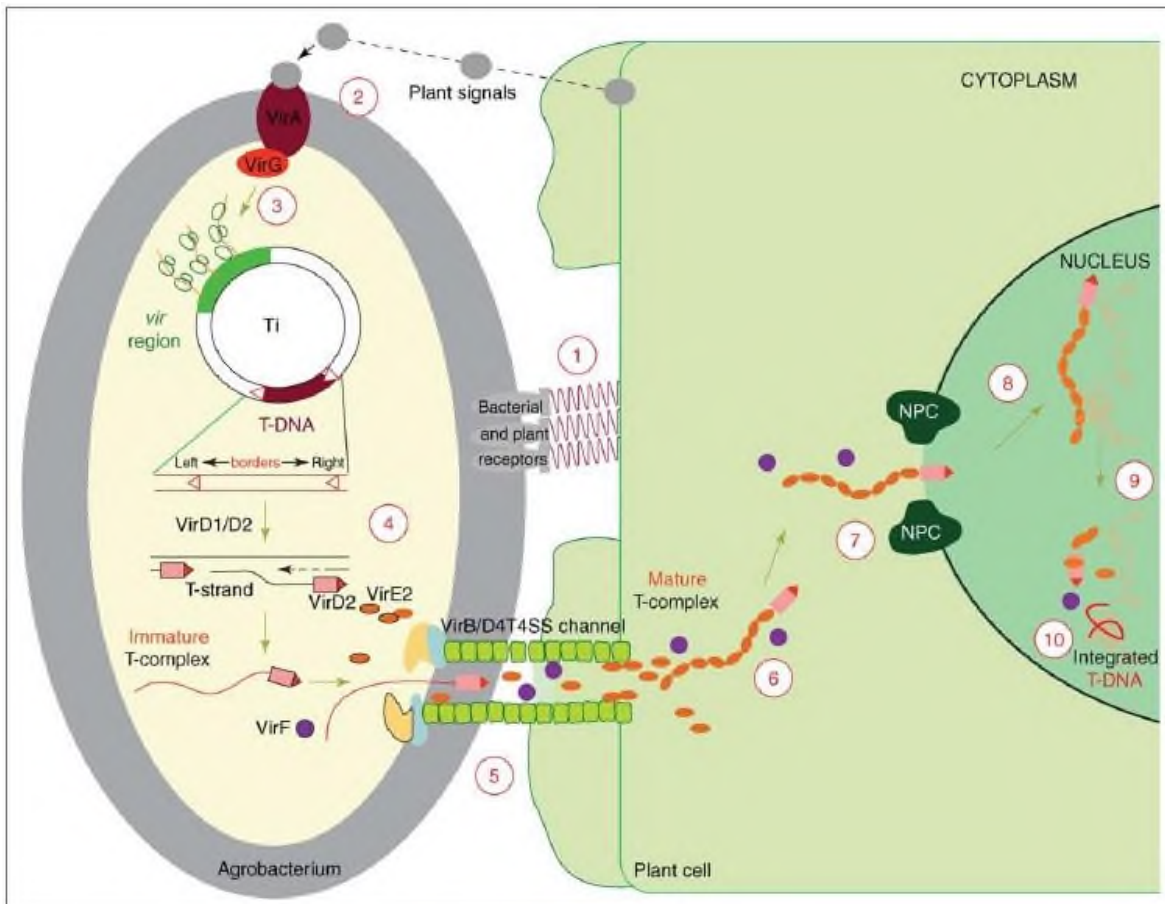


Figura 2. Tomada de (Tzfira & Citovsky, 2006). Un modelo para la transformación genética mediada por *Agrobacterium sp.*

Particularmente, en el caso de *A. rhizogenes*, es el causante de una patología de plantas comúnmente llamada “*hairy roots*” (hr) o raíces transformadas (Chen & Otten, 2017). Así, una vez culminado el proceso de transferencia del T-ADN al tejido vegetal se pueden utilizar ensayos histoquímicos, como la tinción de Gus para genes reporteros, y moleculares, como la PCR, para verificar el evento de transformación (Tepfer, 1990). Además se puede discriminar la transformación de manera cualitativa por dos tipos de marcadores que funcionan en el cultivo de raíces transformadas. El primero es seleccionable: crecimiento acelerado. El segundo es morfológico: aumento de ramificación y plagiotropismo (Tepfer, 1990).

2.6.1 *Agrobacterium rhizogenes*

A. rhizogenes es el organismo causante de las “hairy roots” o raíces transformadas en un gran número de especies vegetales (Chen & Otten, 2017). Cuando la bacteria infecta la planta el T-DNA (DNA de transferencia) que se encuentra entre los bordes izquierdo y derecho en la región del plásmido *Ri* (Figura 3) de la bacteria es transferido e integrado dentro del genoma nuclear de la célula vegetal (Hu & Du, 2006). El proceso de transformación produce un valioso subproducto (hr), que se formarán en o cerca del sitio de la infección. Además, se producen las opinas que sirven como alimento específico para las bacterias (Chilton *et al.*, 1982).

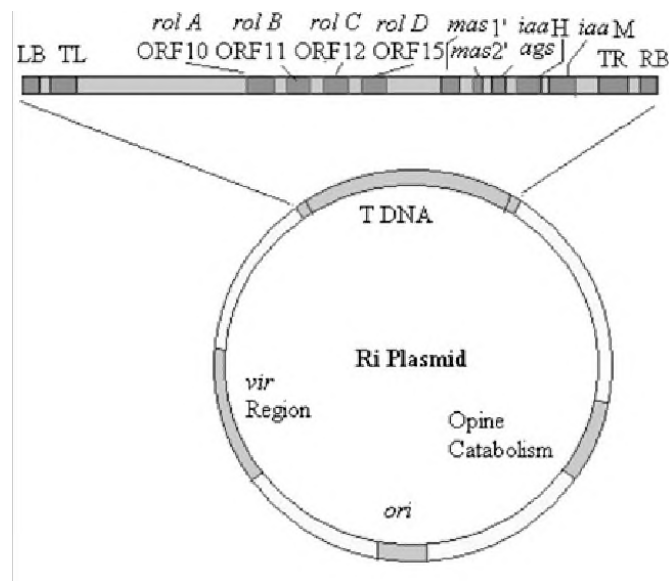


Figura 3. Plásmido *Ri*: El T-ADN está definido por los bordes izquierdo (LB) y derecho (RB) e incluye los genes necesarios para su transcripción y traducción en la célula vegetal. Fuera de la región del T-ADN, se encuentran los genes *vir* y un gen que codifica para el catabolismo de opinas y un origen de replicación (*ori*) que permite que el plásmido sea mantenido de forma estable en *A. rhizogenes*.

Por este método, en un gran número de especies se han obtenido cultivos de raíces transformadas y regeneración de plantas transformadas. Estas son las razones para desarrollar un sistema de cultivos de órganos radiculares ya que muchas especies sintetizan metabolitos secundarios de uso comercial, principalmente para producir fármacos, y las raíces transformadas también son capaces de regenerarse en plantas enteras.

2.6.2 Transformación de *Amaranthaceae*

Muchas especies pertenecientes a la familia de las *Amaranthaceae* son de gran importancia en muchas partes del mundo debido a que tienen un alto valor nutricional y presentan propiedades medicinales. Sin embargo, los trabajos realizados en el campo de la transformación genética para esta familia son escasos, algunos ejemplos se presentan a continuación.

Jofre *et al.*, (1997) utilizaron embriones maduros de *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto) para desarrollar un sistema de cultivo *in vitro* para la regeneración de plantas y la transformación genética. Las plantas se regeneraron a partir de callos derivados de embriones cultivados en medio Murashige y Skoog. Las plantas transgénicas se obtuvieron por inoculación de explantes de embriones maduros con una cepa de *Agrobacterium* desarmada que contenía el plásmido pGV2260 (pEsc4), que portaba los genes que codificaban la neomicina fosfotransferasa de tipo II y la β -glucuronidasa. La presencia de transgenes en el genoma de plantas de amaranto transformadas y su progenie se demostró mediante hibridación Southern blot. Se observó expresión específica de tejido y expresión inducible por luz dirigida por un promotor de proteína de unión de clorofila en plantas de amaranto transgénico y su progenie.

El objetivo de Duan *et. al.*, (2013) fue estudiar la regeneración de plantas y la transformación mediada por *Agrobacterium* de *Achyranthes bidentata* utilizando el gen EREBP de algodón. Los resultados mostraron una tasa de inducción alta de callos de los tallos de *A. bidentata*. Sin embargo, la tasa de diferenciación de brotes del callo de las hojas y pecíolos era muy baja. En comparación con la ceftriaxona, 200 mg/l de cefotaxima podría controlar completamente *A. tumefaciens* y tuvo una acción relativamente menos tóxica en los tallos de *A. bidentata*. Además, la tasa de inducción del callo resistente a la higromicina fue la más alta cuando se infectó durante 3 minutos y se co-cultivó durante 3 días. Se obtuvieron seis plantas transgénicas positivas transformadas con el vector de expresión pCAMBIA1304-GhEREB2 y se confirmaron por PCR. La expresión del gen diana GhEREB2 se detectó en cinco plantas transgénicas mediante RT-PCR. En resumen, se estableció un sistema eficiente de transformación genética y regeneración de plantas para *A. bidentata*.

3 JUSTIFICACIÓN

Gomphrena globosa es una planta con propiedades medicinales debido a la producción de moléculas con actividad biológica, principalmente las provenientes del metabolismo secundario. Sin embargo, la acumulación de estos metabolitos de interés puede variar debido a factores bióticos o abióticos. Por lo anterior, una posible solución al problema es establecer cultivos vegetales en ambientes controlados que permitan reproducir con mayor eficacia la respuesta esperada en la síntesis de estas moléculas.

La agrotransformación es un proceso mediado por *A. rhizogenes* que ha demostrado producir mejoras de la capacidad biosintética en diversas especies vegetales y, debido a que no existen reportes previos del establecimiento de cultivos transformados de *G. globosa*, surge la oportunidad de desarrollar un protocolo de transformación genética mediada por *A. rhizogenes* que produzca cultivos útiles en el futuro próximo para aumentar la producción de moléculas con actividad biológica producidas por *G. globosa*. Además de establecer líneas de raíces transformadas que puedan ser usadas en potenciales bioprocesos.

4 HIPÓTESIS

Gomphrena globosa será transformada genéticamente con cepas silvestres de *Agrobacterium rhizogenes*.

5 OBJETIVOS.

5.1 General.

Establecer cultivos de raíces transformadas de *Gomphrena globosa* a través de la técnica de agrotransformación con cepas silvestres de *A. rhizogenes*.

5.2 Específicos.

- Inducir y propagar cultivos de raíces transformadas de *Gomphrena globosa* con *Agrobacterium rhizogenes*.
- Confirmar la transformación de los cultivos establecidos vía PCR.
- Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides presentes en raíces transformadas y no transformadas de *G. globosa*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Estrategia experimental

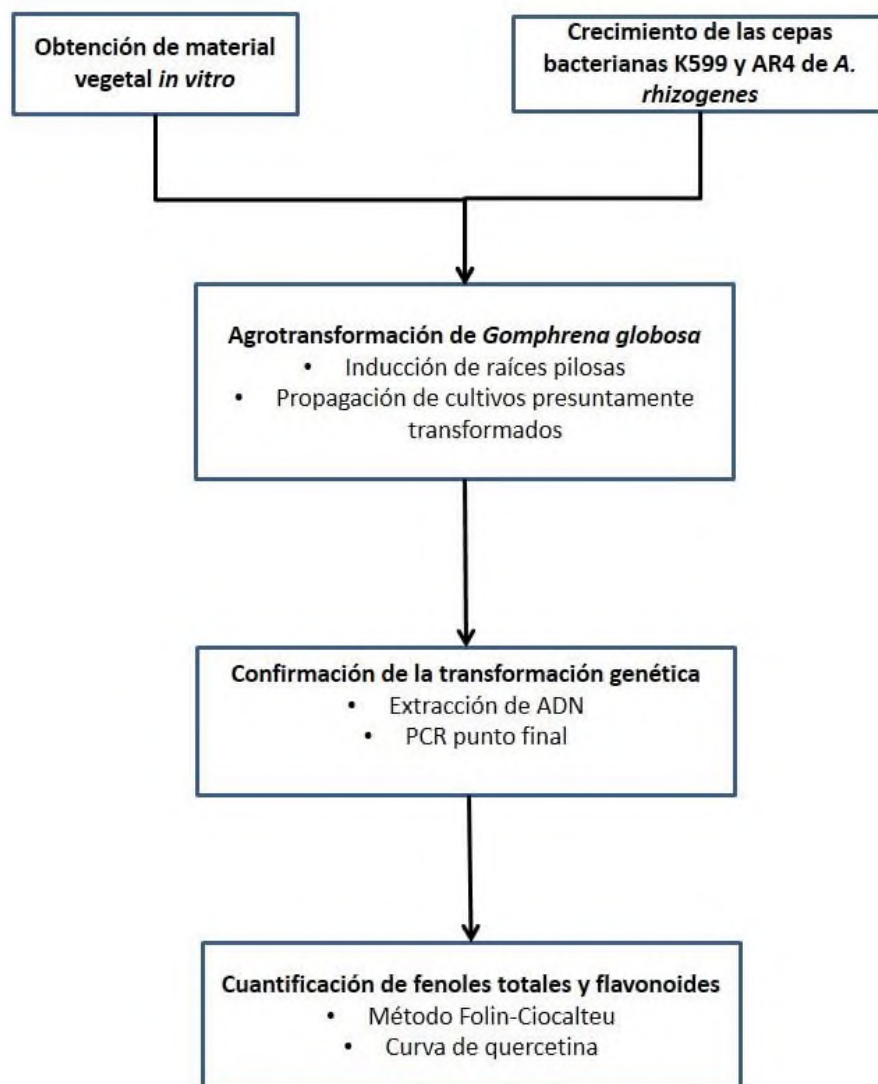


Figura 4. Estrategia experimental.

6.2 Material biológico

Las plántulas de *Gomphrena globosa in vitro* fueron provistas por el Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. Se utilizaron las cepas silvestres K599 y AR4 de *A. rhizogenes* proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Cultivo de Células Vegetales.

6.3 Métodos

6.3.1 Propagación *in vitro* de material vegetal

La propagación se llevó a cabo siguiendo la metodología establecida previamente por el grupo de trabajo (Méndez, 2017) de la siguiente manera. De las plántulas provistas se escindieron, en condiciones de esterilidad, segmentos internodales de aproximadamente 1.5 cm de longitud para ser cultivados asépticamente en medio de cultivo MS semi-sólido (Murashige & Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento con pH 5.8, siguiendo la formulación que se muestra en la Tabla 3 (Méndez, 2017). El pH se ajustó antes de esterilizar en autoclave a 120 °C durante 15 min. Los explantes fueron cultivados a 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, hasta la regeneración de plántulas completas (López & Chaparro, 2007; Jofre *et al.*, 1997).

Tabla 3. Medio MS para inducción de brotes.

Componente	Concentración
Medio MS	4.33 g/L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel®	1.8 g/L

6.3.2 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se caracterizaron por su morfología colonial y tiempo en el que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento, determinada por su absorbancia aproximada a 0.5 OD a 540 nm. Las cepas K599 y AR4 de *A. rhizogenes* se incubaron a 28 °C en un agitador orbital a 200 rpm, en medio líquido Luria Bertani (LB) hasta alcanzar su fase exponencial de crecimiento. Transcurrido este tiempo, las suspensiones bacterianas fueron usadas para la infección de plantas y explantes de *G. globosa* (Wang, 2011).

6.3.3 Agrotransformación de *G. globosa*

6.3.3.1 Inducción de raíces pilosas

Para la inducción de raíces transformadas se usaron plántulas completas de *G. globosa* de aproximadamente cuatro semanas de edad, las cuales fueron infectadas por el método de punción en tallo, utilizando una jeringa de insulina previamente sumergida en la suspensión bacteriana correspondiente de las cepas K599 y AR4 de *A. rhizogenes* (García *et al.*, 2008). Como control negativo de transformación plántulas fueron punzadas con agua estéril. Posterior a la inoculación las plántulas se mantuvieron a 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad hasta la aparición de raíces pilosas.

6.3.3.2 Propagación de cultivos de raíces transformadas

Las raíces potencialmente transformadas, que se desarrollaron en las plántulas infectadas, fueron escindidas individual y asépticamente; y transferidas a medio semi-sólido MS suplementado con 400 µg/ml de cefotaxima para eliminar la bacteria remanente. Posteriormente, estas fueron subcultivadas las veces necesarias en medio semi-sólido MS fresco adicionado con el mismo antibiótico para lograr la eliminación total de la bacteria. Las raíces finalmente desinfectadas se cultivaron en medio MS semi-sólido sin antibiótico y fueron incubadas a 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (García *et al.*, 2008).

6.3.4 Confirmación de la transformación genética

6.3.4.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de los cultivos de raíces se realizó empleado un *buffer* comercial (Jena Bioscience, PCR-111S) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Se preparó una alícuota del buffer de extracción de ADN 1x, diluyendo a partir de la concentración proporcionada 10x, con agua grado PCR. Posteriormente, se tomaron pequeñas porciones de tejido de los cultivos de raíces presuntamente transformadas (2-3 mm de longitud), y se colocaron en tubos eppendorf que contenían 50 µl del buffer 1x. Las muestras se mezclaron brevemente en un vortex y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente para permitir la lisis del tejido y la liberación de ADN. Por último, se centrifugaron a 10,000 g por 3

min. Seis μL del sobrenadante se utilizaron directamente como templado en la mezcla de reacción para PCR como se describe en la sección siguiente.

6.3.4.2 PCR punto final

Se realizó PCR punto final para confirmar la transformación del tejido radicular. Los oligonucleótidos necesarios para detectar al gen *rolB* (Tabla 4), que amplifican un fragmento de 150 pares de bases, fueron diseñados previamente en el grupo de trabajo (Jiménez, 2018).

Tabla 4. Oligonucleótidos para amplificar el fragmento del gen *rolB*.

Gen blanco	Oligo directo(5'-3')	Oligo Reverso (5'-3)
<i>RolB</i>	AGA GCT TCA AGA TGC CTT CG	CGC GTA AGG ATT TCT GCA TT

La amplificación se realizó utilizando un termociclador Veriti (Applied Biosystems). El programa consistió de una desnaturalización inicial a 95 ° C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 95 ° C durante 30 s, 58 ° C durante 30 s, 72 ° C durante 30 s y una extensión final a 72 ° C durante 3 min. Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 20 μL , conteniendo tampón, 6 μL de templado, 400 nM de cada oligonucleótido, Master mix 1x y agua grado PCR. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% al aplicar un campo eléctrico de 80 V por 45 min.

6.3.5 Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios en raíces de *G. globosa*

6.3.5.1 Fenoles totales

La extracción de fenoles totales se realizó de acuerdo al método descrito por Silva *et al.* (2012) con algunas modificaciones. El extracto acuoso se obtuvo usando una relación de 30 mg del material vegetal de *G. globosa* por cada 1.5 ml de agua, calentando durante 5 min a 100 °C, posteriormente se sonicó por 30 min a temperatura ambiente y por último se centrifugó a 450 g en refrigeración por 10 min. El pellet se desechó y el sobrenadante se liofilizó, y almacenó a 4 °C hasta su posterior análisis.

La determinación de fenoles se llevó a cabo por el método de Folin-Ciocalteu, el cual 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.*, 1998).

Una curva de calibración de ácido gálico fue utilizada para determinar la cantidad de fenoles contenidos en las muestras, las concentraciones usadas fueron de 0, 20, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (EAG/gES) (Chaovanalikit y Wrolstad, 2004). Para preparar la mezcla de reacción, primero se agregaron 150 µl de agua desionizada, posteriormente se adicionaron 2.5 µl del extracto el cual se encontraba a una concentración normalizada de 15 mg/ml, después se agregaron 10 µl del reactivo Folin-Ciocalteu, y se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente; pasado este tiempo se adicionaron 30 µl de Na₂CO₃ al 20% (p/v), se incubó a 37 °C por 15 minutos y después se enfrió en hielo por 15 min más (Méndez, 2017). La absorbancia de las muestras se leyó a 750 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS). Todas las muestras se realizaron por triplicado.

6.3.5.2 Flavonoides

El extracto acuoso se obtuvo usando una relación de 30 mg del material vegetal de *G. globosa* por cada 1.5 ml de agua, calentando durante 5 min a 100 °C, posteriormente se sonicó por 30 min a temperatura ambiente y por último se centrifugó a 450 g en refrigeración por 10 min. El pellet se desechó y el sobrenadante se liofilizó y almacenó a 4 °C (Silva *et al.*, 2012).

Para la determinación de flavonoides se construyó una curva de calibración de quercetina usando las concentraciones de 0, 5, 15, 25, 45, 65, 85 y 150 ppm y los resultados se expresaron en equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (EQ/gES). La mezcla de reacción constó de 35 µl de extracto a una concentración de 15 mg/ml, después se agregaron 140 µl de agua desionizada y se dejó reposar por 6 min a temperatura ambiente, luego se adicionaron 10.5 µl de nitrito de sodio al 5% (p/v) dejando reposar por 5 min a temperatura ambiente; enseguida se agregaron 70 µl de AlCl₃ al 10%, posteriormente se adicionaron 84 µl de NaOH 1M. Finalmente se agregaron 84 µl de agua desionizada dejando reposar por 30 min a temperatura

ambiente. La absorbancia de las muestras se determinó a 490 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS). Todas las muestras se realizaron por triplicado (Cruz, 2018).

6.3.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides se realizaron con el software estadístico Minitab 16. El efecto del tipo de cultivo analizado sobre la acumulación de fenoles y flavonoides se analizó mediante análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido por la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($p < 0.05$) para determinar las diferencias entre los tratamientos.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Propagación de *G. globosa* *in vitro*

A partir de cultivos *in vitro* axénicos proporcionados por el LCCV, se procedió a propagar explantes de *G. globosa*. De acuerdo a lo reportado por el equipo de trabajo. La respuesta morfogénica se produjo espontáneamente y generó nuevas plántulas libres de contaminantes que a su vez se utilizaron para propagaciones sucesivas. Las principales fases del proceso de micropropagación actual se muestran en la Figura 5.

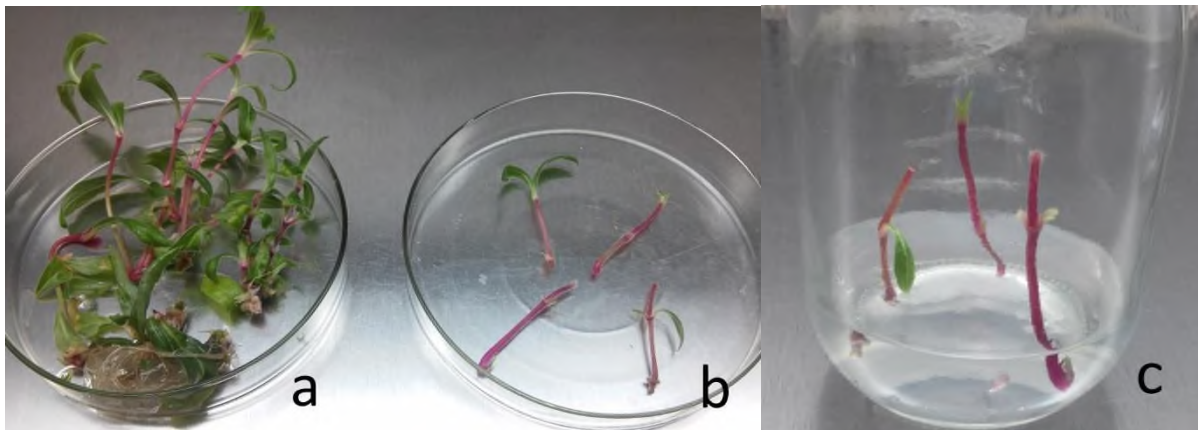


Figura 5. Fases del proceso de micropropagación de *G. globosa*. a) Plántulas de *G. globosa* provenientes de cultivo *in vitro*. b) Explantes tomados de segmentos internodales en condiciones asépticas. c) Disposición de los explantes en medio de cultivo MS.

La regeneración de plántulas fue satisfactoria, y las primeras fases de la respuesta morfogénica se observaron con la regeneración de parte aérea en cada explante tan pronto como 7 días después del sembrado inicial. El inicio del enraizamiento se observó a partir de 7 días posteriores a la regeneración de la parte aérea sin la necesidad de agregar reguladores de crecimiento vegetal. Características de crecimiento similares han sido reportadas por el grupo de trabajo. El desarrollo de tallos, hojas y raíces completas, muestra la capacidad de regeneración de la planta, llegando a generar brotes múltiples en cada tallo (Figura 6), cada planta original generaba 6 ± 2 explantes, y eventualmente cada explante sería capaz de generar una planta completa con múltiples brotes. Esta facilidad para generar plantas completas también se ha observado en lo reportado en el equipo de trabajo (Méndez 2017; Cruz, 2018). Cuarenta y cinco días después, las plántulas se encontraban completamente desarrolladas y juveniles; para ser usadas para la infección con las cepas de *A. rizhogenes*.

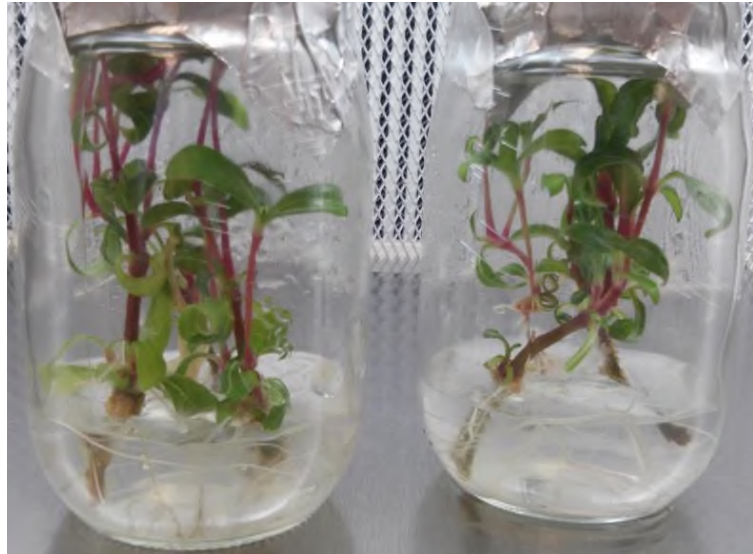


Figura 6. Cultivo *in vitro* de *G. globosa*. Apariencia y promedio de plántulas regeneradas después de 45 días de cultivo.

7.2 Caracterización de las cepas bacterianas

La caracterización morfológica de las cepas de *A. rhizogenes* se realizó revisando su crecimiento en cajas Petri. Las colonias de ambas cepas presentaron coloración y características típicas de *Agrobacterium sp.*, estas eran de forma circular, mucosas, convexas, de tono brillante y color blanco a amarillo hueso (Figura 7), de acuerdo a lo reportado por Alippi *et al.*, (2011), el color de las colonias es variable según los componentes del medio y este puede cambiar con el paso del tiempo.

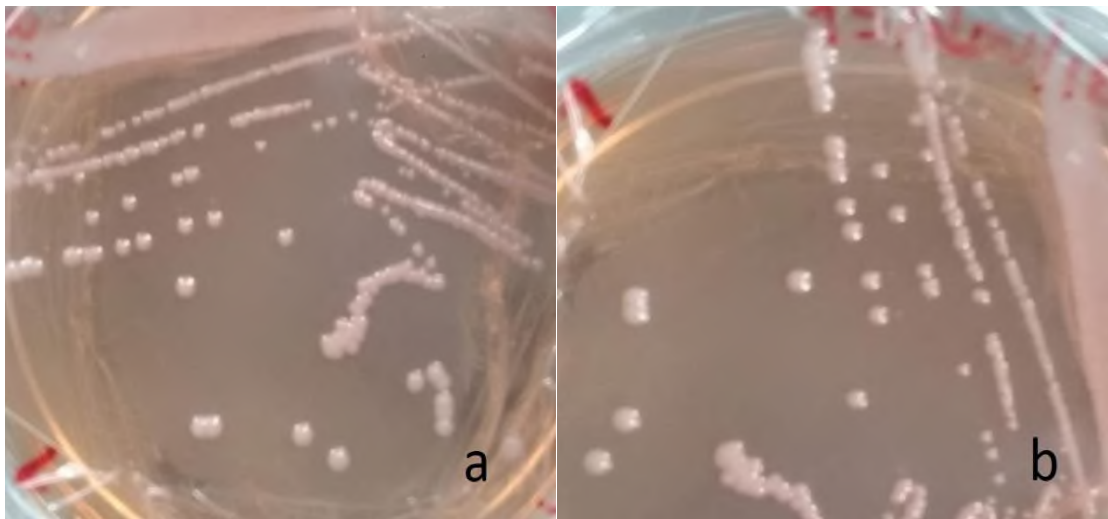


Figura 7. *A. rhizogenes* creciendo en placa de Petri después de 2 días de crecimiento. a) Morfología colonial de la cepa K599. b) Morfología colonial de la cepa AR4.

Como parte de la preparación de las cepas para el proceso de infección, se determinó el momento en el que se alcanzó la fase exponencial de crecimiento por su absorbancia a 540 nm; a las 15 h para la cepa K599 y a las 8 h para la cepa AR4 (Figura 8). Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, que asegura la mayor actividad metabólica de las bacterias, se procedió a la infección de los explantes de *G. globosa* para inducir el crecimiento de raíces transformadas.

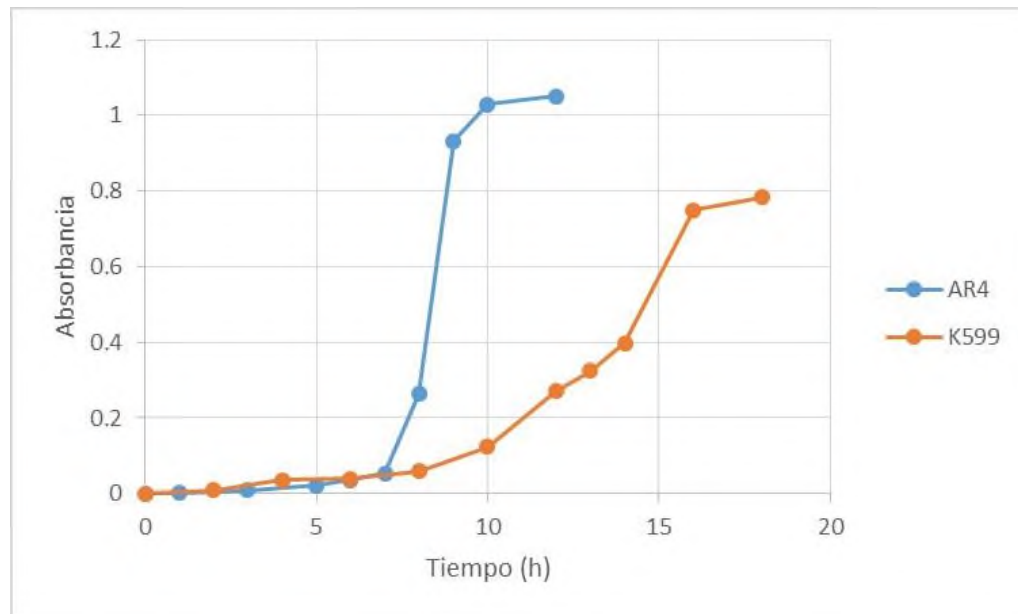


Figura 8. Cinética de absorbancia a 540 nm de las cepas K599 y AR4 de *A. rhizogenes*.

7.3 Inducción de raíces transformadas

Las raíces transformadas se indujeron usando las cepas K599 y AR4 caracterizadas previamente y en fase exponencial de crecimiento. El desarrollo de raíces se apreció a partir del día 10 ± 1 y 13 ± 1 posterior a la infección de plántulas con las cepas K599 y AR4 respectivamente, observándose la aparición de meristemas de raíces en algunas de las zonas de punción (Figura 9).



Figura 9. Meristemo de raíz presuntamente transformada con la cepa K599 emergiendo en un punto de infección, después de 10 días de la punción.

El total de plántulas infectadas fue de 72 con cada cepa. En el caso de la infección con la cepa K599, 7 plantas desarrollaron raíces de los puntos de punción contabilizando en total 10 eventos en este tratamiento. La cepa AR4 indujo raíces en 5 plantas con un total de eventos de emergencia de raíces de 5, los resultados de inducción se resumen en la Tabla 5. Estos resultados apuntan a una posible resistencia por parte de *G. globosa* hacia la transformación mediada por *A. rhizogenes* o poca virulencia de las cepas, aunque hasta el momento no se tienen antecedentes de la transformación de esta planta por este método en particular. En contraste, la recalcitrancia a la transformación no parece ser una constante en especies pertenecientes a la familia de las *Amarantaceae*. Resultados favorables se han obtenido al transformar genéticamente *Amaranthus tricolor* L. (Swain *et al.*, 2010), *Amaranthus spinosus* L. (Pal *et al.*, 2012), y *Amaranthus sp.*

Tabla 5. Resultados de la inducción de raíces transformadas en plántulas de *G. globosa*.

Cepa	Total de plántulas infectadas	Plántulas que desarrollaron raíces	Porcentaje de plántulas que produjeron raíces	Total de raíces inducidas	Promedio de raíces por explantes
K599	72	7	9.72	10 ^a	1.42
AR4	72	5	6.94	5 ^a	1
Control	12	0	0	0	0

Los datos se expresaron por medio \pm EE (n = 3). Los valores en la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes (p < 0.05).

La Tabla 5 muestra que no hay diferencias significativas en la inducción de raíces presuntamente transformadas, de acuerdo al análisis de varianza (Anexo 1), específicamente tomando en cuenta el porcentaje de plántulas que produjeron raíces lo que indica que, aunque la virulencia o infectividad resultó baja, ambas cepas (K599 y AR4) producen una respuesta estadísticamente igual. La discusión de los posibles factores que influyen en estos resultados se muestran más adelante.

Por otro lado, Munusamy *et al*, (2013), lograron la transformación de *Amaranthus sp.* mediante una variante del método *floral-dip* con una cepa de *A. tumefaciens* (AGL1) con tasas de transformación bajas, no obstante presenta una interesante perspectiva para investigar la transformación de *G. globosa* por este método ampliamente utilizado con *Arabidopsis thaliana*.

Particularmente, referente a trabajos que utilizaron las cepas K599 y AR4, Calderón-Gabriel (2018) y Jiménez-Brigada (2018), reportaron una virulencia importante y similar entre las cepas hacia la planta *Stevia rebaudiana*, lo que realza la importancia de explorar los efectos de virulencia y transformación de manera específica entre cada especie y cepa utilizada.

Para la utilización efectiva de la capacidad de transformación de *A. rhizogenes*, Swain *et al.*, (2010), describe una serie de factores que deben optimizarse tanto para las bacterias como para el material vegetal. Estos incluyen (i) cepa (s) bacteriana (s), (ii) fase de crecimiento bacteriano y densidad celular, (iii) precultivo bacteriano con inductor de virulencia (acetosiringona), (iv)

fuente y tipo de explante, (v) método de infección, (vi) Período de co-cultivo, (vii) tipo y concentración de antibiótico bactericida, entre otros.

Cuando las raíces emergidas alcanzaron alrededor de 2 cm de longitud, el segmento de tallo que las desarrolló, fue escindido asépticamente y transferido a medio semisólido MS con 400 µg/ml de cefotaxima para eliminar la colonización bacteriana. Durante su desarrollo en este medio, algunas raíces mostraron características específicas de los cultivos transformados (Figura 10) como lo son: alta pilosidad y ageotropismo (Chen & Otten, 2017). Después de 30 días de mantener los explantes en esta modalidad de cultivo, y promover la generación de biomasa, las raíces se utilizaron para realizar extracción de ADN genómico para amplificar al gen *rolB* mediante PCR y así comprobar que la transformación se llevó a cabo.

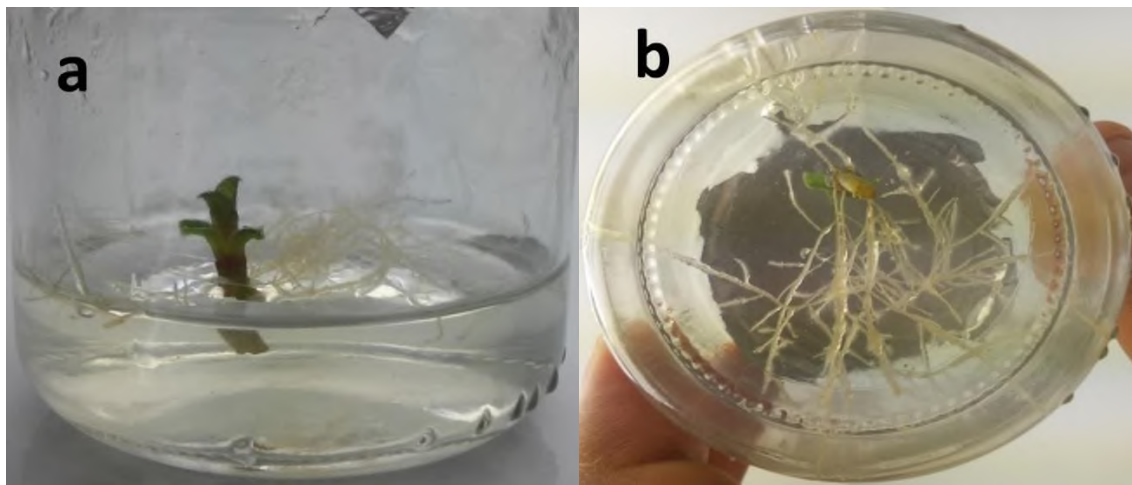


Figura 10. Propagación de raíces presuntamente transformadas de *G. globosa* en medio de cultivo semisólido, presentando ageotropismo y alta pilosidad. a) Proliferación de raíces presuntamente transformadas con la cepa K599. b) Proliferación de raíces presuntamente transformadas.

7.4 Confirmación de la transformación genética de las raíces inducidas

Utilizando segmentos de raíces procedentes de plántulas infectadas, se procedió a la extracción de ADN y posteriormente se realizaron las pruebas para la amplificación por PCR para determinar la presencia del gen *rolB* contenido en el plásmido *Ri* de ambas cepas de *A. rhizogenes* usadas para la infección. Esto se logró utilizando oligonucleótidos específicos que amplificaron fragmentos de 150 pb del gen *rolB*. Como control positivo, se utilizó ADN plasmídico de *A. rhizogenes* de cada cepa y como control negativo, ADN genómico de raíces cultivadas *in vitro* no transformadas. Las muestras provenientes de tejidos infectados con la

cepa K599 se pueden identificar con el código FK5 y el número de muestra (ej. FK51), y las muestras para la cepa AR4 tienen el código FAR4 y el número de muestra (ej. FAR41).

En la figura 11 y 12 se pueden observar bandas de 150 pb amplificadas en el control positivo y en cuatro muestras de raíces provenientes de los puntos de infección con la cepa K599 (FK51, FK52, FK53 y FK56), sin embargo, no todas las muestras provenientes de zonas de infección mostraron resultados positivos, tal fue el caso de las líneas FK54, FK55 y de FK57 al FK510 que a pesar de haber sido recuperadas de sitios de infección no poseían el gen *rolB* y, por ende, no estaban transformadas. En las Figuras 12 y 13 se observa que para las muestras provenientes de los puntos de infección con la cepa AR4 (FAR41-5), solo se obtuvo un resultado positivo de amplificación, la línea FAR42. Las líneas FK53 y FAR42 mostraron amplificaciones inespecíficas, es decir; fragmentos de menos de 150 pb (c.a 100 pb), que no fueron identificados durante el desarrollo de este trabajo, no obstante se conservaron y se consideraron transformadas para el cálculo de las frecuencias de transformación.

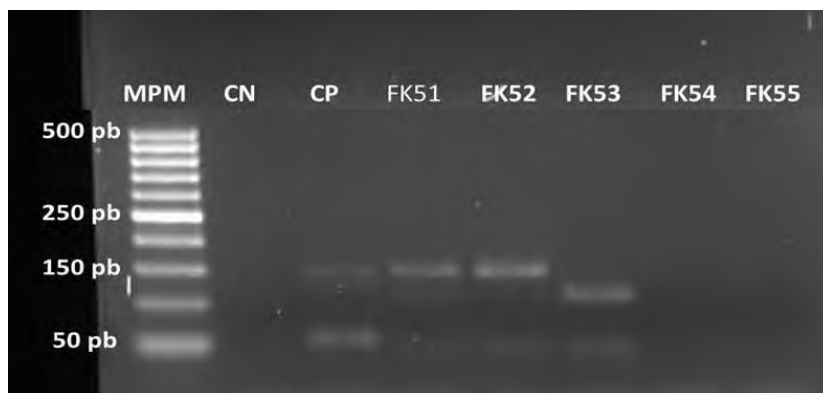


Figura 11. Detección del gen *rolB* por PCR. Marcador de peso molecular (MPM); Control negativo (CN): ADN de plántulas no transformadas; Control positivo (CP): ADN plasmídico de *A. rhizogenes*; ADN genómico de raíces que emergieron de los puntos de infección con la cepa K599 (FK5).



Figura 12. Detección del gen *roB* por PCR. Marcador de peso molecular (MPM); ADN de raíces que emergieron de los puntos de infección con la cepa K599 (FK5); ADN genómico de raíces que emergieron de los puntos de infección con la cepa AR4 (FAR4).

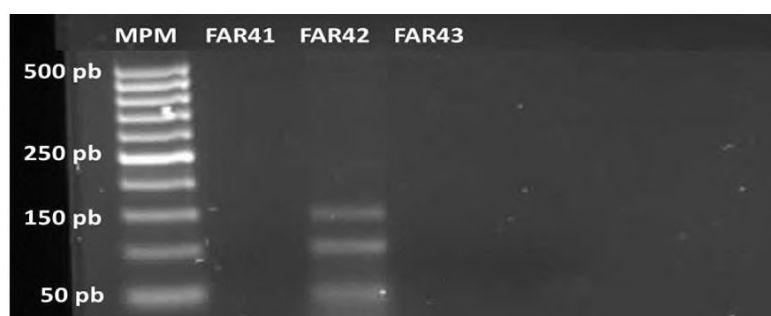


Figura 13. Detección del gen *roB* por PCR. Marcador de peso molecular (MPM); ADN genómico de raíces que emergieron de los puntos de infección con la cepa AR4 (FAR4).

La frecuencia de transformación o eficiencia de transformación, considerando el total de raíces provenientes de las zonas de infección y las positivamente confirmadas, fue de 50 y 20 % para las cepas K599 y AR4 respectivamente. Estas frecuencias resultaron ser relativamente bajas aunque cabe resaltar que el protocolo de transformación de *G. globosa* propuesto aún no está optimizado en el grupo de trabajo ni en la literatura, hasta donde llegó nuestra búsqueda.

La eficiencia de transformación utilizando cepas de *A. rhizogenes* es variada para distintas especies de plantas medicinales. Así, Tao & Li (2006) obtuvieron una eficiencia de transformación del 90% en *Torenia fournieri* utilizando la cepa R1000. Por otro lado El-Esawi *et al*, (2017), transformaron explantes de *Lactuca serriola* obteniendo un 74% de raíces transformadas confirmadas con la cepa AR15834. Por su parte, Balasubramanian *et al*, (2018), utilizaron las cepas silvestres MTCC 2364 y MTCC 532 de *A. rhizogenes*, obteniendo una

eficiencia de transformación del 77.6% y 67.6% respectivamente, desarrollando un protocolo de transformación eficiente para *Raphanus sativus*.

Como se mostró anteriormente, la eficiencia en la inducción de raíces transformadas con distintas cepas de *A. rhizogenes* en diferentes especies vegetales fue mayor para otros autores comparando los resultados obtenidos en este trabajo, pero cabe mencionar que en la mayoría de las composiciones de los medios de cultivo que utilizaron, incluían acetosiringona, un compuesto que induce la transferencia del T-ADN de la agrobacteria a la planta (Swain *et al.*, 2010). Además, la transformación genética mediada por *Agrobacterium* también se ve afectada por el genotipo y la estructura del explante, los factores físicos y químicos, las cepas bacterianas y las moléculas de señal (Tao & Li, 2006; Swain *et al.*, 2010), además de que diferentes cepas de *A. rhizogenes* varían en su capacidad de transformación (Kumar *et al.*, 1991; Giri *et al.*, 1997). Este resultado podría posiblemente explicarse por los diferentes plásmidos contenidos en distintas cepas (Nguyen *et al.*, 1992), debido a que algunas contienen genes que dirigen la síntesis de un compuesto que induce a la célula a diferenciarse en la formación de raíces bajo la influencia de auxinas endógenas (Ooms *et al.*, 1986) y otras que contienen loci involucrados en la síntesis directamente de las auxinas (Capone *et al.*, 1989) y que luego inducen la formación de raíces pilosas. Todos estos factores contribuyen a las frecuencias de transformación relativamente bajas, pero ofrecen importantes ventanas de oportunidad para mejorar el proceso de agrotransformación en *G. globosa*.

En última instancia, después de la detección del gen *RolB*, se confirmaron 4 líneas de raíces transformadas inducidas con la cepa K599 y solamente una línea inducida con la cepa AR4. Estas líneas fueron posteriormente comparadas en función de su acumulación de fenoles y flavonoides.

7.5 Cuantificación de metabolitos secundarios

7.5.1 Fenoles totales y flavonoides

El contenido de fenoles totales y flavonoides se determinó en raíces transformadas y no transformadas, encontrando diferencias entre ellas, inclusive, se encontraron diferencias de concentración entre las líneas transformadas. La cantidad promedio de biomasa utilizada para cada muestra fue de 0.2 g.

En la Tabla 6 se muestran los contenidos de fenoles totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mgEAG/gES) y por gramo de peso seco (mgEAG/gPS) y en la Tabla 7 las concentraciones de flavonoides expresadas en mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto seco (mg EQ/ gES) y por gramo de peso seco (mgEQ/gPS). Los resultados indican que hay un mayor contenido de fenoles totales y flavonoides en las líneas de raíces transformadas comparadas con las no transformadas, de hasta 4.5 veces más, en el caso de la línea FK56. El análisis estadístico indica diferencias significativas entre los contenidos de fenoles totales en las líneas transformadas, siendo la línea FK56 la de mayor concentración (24.47 mg EAG/ g ES) y FK52 la de menor concentración (9.60 mg EAG/ g ES), y para flavonoides (tabla 7) solamente hubo diferencia significativa entre las raíces transformadas con respecto a las no transformadas. En términos generales se observó un efecto positivo de la transformación genética sobre la acumulación de fenoles y flavonoides.

Tabla 6. Cuantificación de fenoles totales en raíces de *G. globosa*.

Raíces	Fenoles totales	
	(mg EAG/ g ES)	(mg EAG/ g PS)
Transformadas		
FK51	16.92 ± 0.18 ^b	1.88 ± 0.02 ^c
FK52	9.60 ± 0.25 ^d	0.48 ± 0.01 ^e
FK53	13.06 ± 0.64 ^c	2.61 ± 0.13 ^b
FK56	24.47 ± 0.46 ^a	3.11 ± 0.06 ^a
No transformadas		
NT1	5.45 ± 0.34 ^e	1.79 ± 0.11 ^c
NT2	6.05 ± 0.52 ^e	0.91 ± 0.08 ^d
NT3	4.84 ± 0.38 ^e	0.24 ± 0.02 ^e

Los datos se expresaron como promedio ± EE (n = 3). Los valores en la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes (p <0.05).

Tabla 7. Cuantificación de flavonoides en raíces de *G. globosa*.

Raíces	Flavonoides	
	(mg EQ/ g ES)	(mg EQ/ g PS)
Transformadas		
FK51	0.48 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.002 ^b
FK52	0.38 ± 0.03 ^a	0.06 ± 0.004 ^b
FK53	0.45 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.003 ^a
FK56	0.44 ± 0.01 ^a	0.07 ± 0.002 ^{ab}
No transformadas		
NT1	0.16 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.004 ^b
NT2	0.1 ± 0.02 ^b	0.03 ± 0.005 ^c
NT3	0.01 ± 0.03 ^b	0.02 ± 0.007 ^c

Los datos se expresaron como promedio ± EE (n = 3). Los valores en la misma columna con letras distintas son significativamente diferentes (p <0.05).

Como se observa, el contenido de fenoles y flavonoides en raíces transformadas es mayor en comparación a las no transformadas, pero también hay un incremento considerable respecto a lo reportado por Cruz (2018) en raíces provenientes de plántulas germinadas en semillas sintéticas (Fenoles: 8.29 mg EA/g E.S; Flavonoides: 0.17 mg EQ/g E.S.), llegando a tener concentraciones de estos metabolitos similares a las obtenidas en tallos (Fenoles: 16.34 mg EA/g E.S; Flavonoides: 0.61 mg EQ/g E.S.) y concentraciones por debajo solo en hojas (Fenoles: 30.24 mg EA/g E.S; Flavonoides: 0.63 mg EQ/g E.S.). Por otro lado, los valores obtenidos en las concentraciones de fenoles en este trabajo son similares a los reportados por Aguilar (2018), en extractos acuosos de parte aérea de plantas silvestres de *G. globosa*. (21.92 mg EA/g E.S), sin embargo la cantidad de flavonoides acumulados es mayor de acuerdo a lo reportado en estos mismos extractos (0.072 mg EQ/g E.S).

El grado de activación del metabolismo secundario puede variar según el tipo de planta y el tipo de metabolitos secundarios, de 2 a 300 veces (Bugakov *et al.*, 2013), debido a la influencia de la expresión de los genes *rol* y sus combinaciones (Matveeva *et al.*, 2015). Shkryl *et al.* (2008) investigaron la influencia de los productos de genes *rol* en la acumulación de metabolitos secundarios de *Rubia cordifolia*. Estudiaron los genes *rol* de manera individual y en diferentes combinaciones, y demostraron que los genes individuales *rolA*, *rolB* y *rolC* y su combinación fueron capaces de inducir una regulación positiva de la biosíntesis de antraquinonas en tejidos transgénicos.

Según los datos de Shkryl *et al.* (2008), *rolB* es aparentemente el inductor principal del metabolismo secundario, de entre los demás genes *rol*, y también es el mejor supresor del crecimiento celular, por lo que la acumulación de mayores niveles de fenoles totales en raíces transformadas, puede ser debido al efecto que tiene *rolB* regulando los genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios (Bulgakov *et al.*, 2018), como se reportan en otros cultivos de raíces transformadas de plantas medicinales. Resultados similares se han obtenido en especies como, *Lactuca serriola* (El-Esawi *et al.*, 2017), *Althea officinalis* (Tavassoli & Sapifour, 2018) y *Raphanus sativus* (Balasubramanian *et al.*, 2018). Uno de los ejemplos más notables de la efectividad que tienen los tejidos transgénicos *rolB* en la producción de metabolitos secundarios fue la mostrada para *Vitis amurensis*, donde la transformación condujo a un aumento de más de 100 veces la producción de resveratrol (Kiselev *et al.*, 2007). En el caso particular de las cepas utilizadas en este trabajo, resultados similares se han obtenido en el grupo de investigación, donde se ha reportado una mayor acumulación de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana* debido a la transformación genética mediada por *A. rhizogenes* (Jiménez, 2018).

8 CONCLUSIONES

El presente trabajo describe por primera vez la transformación genética de *G. globosa* mediada por las cepas silvestres K599 y AR4 de *A. rhizogenes* con frecuencias de transformación relativamente bajas, no obstante el protocolo propuesto aún tiene una amplia ventana de optimización. Lo anterior valida la hipótesis general del trabajo.

Las líneas transformadas se caracterizaron por una alta producción de fenoles totales y flavonoides comparadas con raíces no transformadas de *G. globosa*, por lo que el establecimiento de cultivos de raíces transformadas representa una técnica prometedora para la producción de metabolitos secundarios.

9 PERSPECTIVAS

Caracterizar cinéticamente y a nivel de producción de metabolitos secundarios de interés los cultivos establecidos en este trabajo.

Intentar mejorar el protocolo de transformación haciendo uso de inductores de transformación, como la acetosiringona al medio de cultivo.

Extender el estudio de transformación con otras cepas de *A. rhizogenes* diferentes a las utilizadas en este trabajo; así como utilizar cepas de *A. tumefaciens*.

Con base en los resultados reportados en este estudio y la factibilidad de transformación de *G. globosa*, evaluar estrategias para expresar genes de interés para mejorar las características biosintéticas y fisiológicas de la planta.

10 REFERENCIAS

- Abdelnour, A., & Vincent, E. J. (1994). Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Available at <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/888>
- Aguilar, R. J. J. (2018). Actividad Citotóxica y Antioxidante de Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional para el Tratamiento de Cáncer en Oaxaca. Licenciatura en biotecnología. Universidad del Papaloapan, 106.
- Alippi, A. M., López, A. C., & Balatti, P. A. (2011). Métodos para la detección de *Agrobacterium* a partir de muestras de material vegetal, suelo y agua. *Revista Argentina de Microbiología*, 43(11), 278-286
- Alvez, A., Caeiro, A., Correia, S. I., Veríssimo, P., & Canhoto, J. (2017). Establishment and biochemical characterization of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) embryogenic cell suspension cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 53(6), 606–618.
- Arcanjo, D. D. R., de Oliveira Sena, I. V., de Albuquerque, A. C. M., Neto, B. M., Santana, L. C. L. R., Silva, N. C. B., & dos Santos Soares, M. J. (2011). Phytochemical screening and evaluation of cytotoxic, antimicrobial and cardiovascular effects of *Gomphrena globosa* L.(Amaranthaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(10), 2006-2010.
- Balasubramanian, M., Anbumegala, M., Surendran, R., Arun, M., & Shanmugam, G. (2018). Elite hairy roots of *Raphanus sativus* (L.) as a source of antioxidants and flavonoids. *3 Biotech*, 8(2), 1-15
- Blanco, M., Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense*, 27(1), 19–28.
- Bulgakov, V. P., Shkryl, Y. N., & Veremeichik, G. N. (2013). Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes* derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 134(2013), 1–22.
- Bulgakov, V. P., Vereshchagina, Y. V., Bulgakov, D. V., Veremeichik, G. N., & Shkryl, Y. N. (2018). The *rolB* plant oncogene affects multiple signaling protein modules related to hormone

- signaling and plant defense. *Scientific Reports*, 8(1), 1-14.
- Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9), 370–376.
- Calderón, G. L. (2018). Establecimiento de cultivos de raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* con fenotipo silvestre y su crecimiento en biorreactor de inmersión temporal (RITA). Maestría en biotecnología. Universidad del Papaloapan. 1-61.
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1067-6079.
- Capone, L., Cardarelli, M., & Trovato, M. (1989). Upstream no-coding region which confers polar expression to Ri plasmid root inducing *rolB*. *Molecular & General Genetics*, 216(1989), 239–244.
- Carvajal, R. L., Hata, U. Y., Sierra, M. N., & Rueda, N. D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* K.). *Colombia Forestal*, 12(2009), 161-170
- Chaovanalikit, A., & Wrolstad, R. E. (2004). Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. *Food Chemistry and Toxicology*, 69(1), 67–72.
- Chávez, M. M. C., White, O. L., Moctezuma, P. S., & Herrera, T. F. (2017). Prácticas curativas y plantas medicinales: un acercamiento a la etnomedicina de San Nicolás, México. *Cuadernos Geográficos*, 56(2), 26-47.
- Chen, K., & Otten, L. (2017). Natural *Agrobacterium* transformants: recent results and some theoretical considerations. *Frontiers in Plant Science*, 8(1600), 1-16.
- Cheng, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Rojo, L. E., Lila, M. A., & Raskin, I. (2012). *In vivo* and *in vitro* antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food matrix. *Food Chemistry*, 135(2012), 2994–3002.
- Chilton, M. D., Tepfer, D. a., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., & Tempé, J. (1982).

- Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature*, 295(1982), 432-434.
- Crozier A., Kamiya Y., Bishop G., & Yokota T. (2000). Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 850-929.
- Cruz, V. D. (2018). Caracterización morfológica y de producción de metabolitos secundarios de plántulas in vitro obtenidas mediante semillas sintéticas de *Gomphrena globosa* L. Licenciatura. Universidad del Papaloapan. 1-46.
- Das, S., Borah, M., & Ahmed, S. (2013). Antibacterial activity of the ethanolic extract of leaves of *Citrus maxima* (Burm.) Merr. on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(4), 136-139.
- Dinda, B., Gosh, B., Arima, S., Sato, N., & Harigaya, Y. (2004). Phytochemical investigation of *Gomphrena globosa* aerial parts. *Indian Journal of Chemistry. Sect. B: Organic and Medicinal chemistry*, 43(10), 2223-2227.
- Duan, H. Y., Ding, X. S., Song, J. Y., He, Y. L., & Zhou, Y. Q. (2013). Regeneration and *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Achyranthes bidentata* using Cotton. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 349–356.
- El-Esawi, M. A., Elkelish, A., Elansary, H. O., Ali, H. M., Elshikh, M., Witczak, J., & Ahmad, M. (2017). Genetic transformation and hairy root induction enhance the antioxidant potential of *Lactuca serriola* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017(5604746), 1-8.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., & Andrade, P. B. (2011). Structural characterization of phenolics and betacyanins in *Gomphrena globosa* by high-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(22), 3441–3446.
- García, L. E., Ramos, R. E. G., Ariza, C. A., Pérez, V. J., Gómez, G. O., Calva, C. G. (2008). Inducción de raíces transformadas de *Brassica oleracea* var. italica (brócoli) útiles para la producción de proteínas heterólogas con actividad terapéutica. *Tecnocultura*, 1(19),26–34.

- García, M. L., Alonso, H. J., Torres, P. I., Guevara, G. R.G., Cruz, H. A., Campos, G. J., Gutiérrez, R. X., Vázquez, M. M. J., Hernández, S. M., & Feregrino, P. A. A. (2012). Participación de las ciencias analíticas modernas (Genómica, Proteómica, Metabolómica) en el estudio de las plantas. *CIENCIA@UAQ*, 5(1), 6-11.
- García de Alba, G. J. E., Ramírez, H. B. C., Robles, A. G., Zañudo, H. J., Salcedo, R. A. L., García de Alba, V. J. E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos. Revista de Ciencias Sociales*, 2012(39), 29-44
- Giri, A., & Narasau, L.M. (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18(1), 1-22.
- Giri, A., Banerjee, S., Ahuja, P.S., & Giri, C.C. (1997). Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* wall. using *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 33(4), 280– 284.
- Horticulture, I., & Gardener, W. M. (2006). A Horticulture Information article from the Wisconsin Master Gardener website, Globe Amaranth, *Gomphrena globosa*. 1-2.
- Hu, Z. B., & Du, M. (2006). Hairy root and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(2), 121–127.
- Hurtado, M., & Merino, M. (1987). Cultivo de Tejidos Vegetales. *Trillas*, 3(1987), 1-232.
- Ilyas, M., Tarnam, A., & Begum, N. (2013). Biological potential and phytopharmacological screening of *Gomphrena* species. *Global Journal of Pharmacology*, 7(4), 457–464.
- Javad, S., Naz, S., Ilyas, S., & Aftab, A. (2016). Production of stevioside from callus and cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (bert.). *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 26(5), 1374-1382.
- Jiménez, B. A. (2018). Efecto de la sobreexpresión de 1-desoxixilulosa-5-fosfato sintasa modificada en raíces transformadas de *Stevia rebaudiana* sobre la producción de glucósidos de esteviol. Maestría en biotecnología. Universidad del Papaloapan. 1-70.
- Jofre, G. A. E., Villegas, S. N., Cabrera, P. J. L., Adame, A. R. M., Herrera, E. L., & Simpson, J.

- (1997). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Amaranthus hypochondriacus*: Light, and tissue-specific expression of a pea chlorophyll a/b-binding protein promoter. *Plant Cell Reports*, 16(12), 847–852.
- Juárez, R. C., Aguilar, C. J., Juárez, R. M., Bugarín, M. R., Juárez, L. P., & Cruz, C. E. (2013). Herbs and medicinal plants in Mexico : Tradition & *Bio Ciencias*, 2(3), 119–129.
- Kamaraj, R., & Maduram, A. (2018). Analgesic and anti-inflammatory activity of various extracts of *Clausena dentata* (willd.) Roem. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(2), 413-416.
- Kharchouf, S., Bouchador, A., Drioiche, A., Khiya, Z., El Hilali, F., & Zair, T. (2017). Phytochemistry and antioxydante activity of *Stevia rebaudiana*. *Phytothérapie*, 1-7. doi 10.1007/s10298-017-1163-7
- Khurshid, R., Khan, T., Zaeem, A., Garros, R., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2018). Biosynthesis of precious metabolites in callus cultures of *Eclipta alba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 135(2), 287–298.
- Kiselev, K. V., Dubrovina, A. S., & Veselova, M. V. (2007). The *rolB* gene induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128(3), 681–692.
- Kumar, V., Jones, B., & Davey, M.R. (1991). Transformation by *Agrobacterium rhizogenes* and regeneration of transgenic shoots of the wild soybean *Glycine argyrea*. *Plant Cell Reports*, 10(3), 135–138.
- Lobo, R. C., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos, B. C., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus* : A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research International*, 62(2014), 684–693.
- López, A., & Chaparro, A. (2007). Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp. *andigena* var. Pastusa suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 16-25.

- Mahbubur, R. A. H. M., & Ara, G. M. I. (2014). Taxonomy and medicinal uses on Amaranthaceae family of Rajshahi, Bangladesh. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 2(2), 54-59.
- Matveeva, T. V., Sokornova, S. V., & Lutova, L. A. (2015). Influence of *Agrobacterium* oncogenes on secondary metabolism of plants. *Phytochemistry Reviews*, 14(3), 541–554.
- Mauro, M. L., Constantino, P., & Bettini, P. P. (2017). The never ending story of *rol* genes: a century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131(2), 201–212.
- Méndez, S. L. (2017). Producción de betalainas y compuestos fenólicos en cultivos celulares de *Gomphrena globosa* L. Maestría en biotecnología. Universidad del Papaloapan, pp 1-90.
- Munusamy, U., Akmar, A. S. N., Aziz, M. A., & Khazaai, H. (2013). Female reproductive system of *Amaranthus* as the target for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(2013), 188-192.
- Muñeton, P. P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria*, 10(9), 2–9.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Naidu, R. J., Ismail, R., Kumar, P., Jothy, L. S., Chen, Y., & Sasidharan, S. (2015). Antiplatelet activity and quantification of polyphenols content of methanol extracts of *Ocimum basilicum* and *Mentha spicata*. *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, 6(5), 1236-1243.
- Nguyen, C., Bourgaud, F., Forlot, P., & Giri, A. (1992). Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Reports*, 11(8), 424– 427.
- Nissan, H., Blum, S., Shimoni, E., & Elbaum, R. (2015). Characterization of silicon accumulation in maize cell suspension cultures. *Silicon*, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s12633-015-9347-y>
- Ooms, G., Twell, D., Bossen, M. E., Hoge, J. H. C., & Burrell, M. M. (1986). Development regulation of Ri T-DNA gene expression in roots, shoots and tubers of transformed potato

(*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Plant Molecular Biology*, 6(5), 321–330.

- Osman, N. I., Sidik, N. J., & Awal, A. (2018). Efficient enhancement of gallic acid accumulation in cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* L. by elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 135(2), 203–212.
- Pal, A., Swain, S. S., Mukherjee, A. K., & Chand, P. K. (2012). Agrobacterium pRi TL-DNA *rolB* and TR-DNA opine genes transferred to the spiny amaranth (*Amaranthus spinosus* L.), a nutraceutical crop. *Food Technology and Biotechnology*, 51(1), 26–35.
- Pérez, G. V. (2009). Plantas medicinales de uso en traspatio en la zona centro del estado de Veracruz, México, 112. Retrieved from <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/28574>
- Potrykus I., Bilang R., Futterer J., Sauter C., Schrott M., & Spangenberg G. (1998). Genetic engineering of crop plants. *Agricultural Biotechnology*, 770.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Rahman, A. H. M. M., & Akter, M. (2013). Taxonomy and medicinal uses of Euphorbiaceae (Spurge) family of Rajshahi, Bangladesh. *Research in Plant Sciences*, 1(3), 74–80.
- Rampadarath, S., & Puchooa D. (2016). *In vitro* antimicrobial and larvicidal properties of wild *Ricinus communis* L. in Mauritius. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 100-107.
- Salaverry, G. O. (2005). La complejidad de lo simple: Plantas medicinales y sociedad moderna. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(4), 245-246.
- Sanagala, R., Moola, A. K., & Bollipo Diana, R. K. (2017). A review on advanced methods in plant gene targeting. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 317-321.
- Sarmadia, M., Karimia, N., Palazónb, J., Ghassempourc, A., & Mirjalilid, M. H. (2018). The effects of salicylic acid and glucose on biochemical traits and taxane production in a *Taxus baccata* callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132(2018), 271–280.

- Shkryl, Y. N., Veremeichik, G. N., & Bulgakov, V. P. (2008). Individual and combined effects of the *rolA*, *B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli. *Biotechnogyl and Bioengineering*, 100(1), 118–125.
- Silva, L. R., Valentão, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A. & Andrade, P. B. (2012). Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (*Gomphrena globosa* L.) inflorescences. *Food chemistry*, 135(2), 756-763.
- Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299(1998), 152-178
- Swain, S. S., Sahu, L., Barik, D. P., & Chand, P. K. (2010). Agrobacterium plant factors influencing transformation of ‘Joseph’s coat’ (*Amaranthus tricolor* L.). *Scientia Horticulturae*, 125(2010), 461–468.
- Talano, M. A., Wevar, O. A. L., González, P. S., & Agostini, E. (2012). Hairy roots, their multiple applications and recent patents. *Recent Patents on Biotechnology*, 6(2), 115-133.
- Tao, J., & Li, L. (2006). Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *South African Journal of Botany*, 72(2), 211 – 216.
- Tavassoli, P., & Safipour, A. A. (2018). Influence of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and analysis of phenolic and flavonoid compounds in marshmallow (*Althaea officinalis* L.). *3 Biotech*, 8(8), 351-359.
- Tepfer, D. A. (1990). Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiolgia Plantarum*, 79(1), 140–146.
- Thiruvengadam, M., Rekha, K., Rajakumar, G., Lee, T. J., Kim, S. H., & Chung, I. M. (2016). Enhanced production of anthraquinones and phenolic compounds and biological activities in the cell suspension cultures of *Polygonum multiflorum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1912-1939.

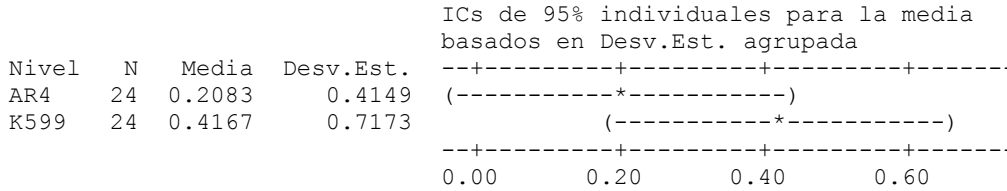
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147–154.
- Villa, R. N., Pacheco, H. Y., Lara, Z. E. B., Monsreal, J. F., Cardeña, B. I. M., Galván, V. O. T., & Ruíz, G. L. M. (2011). Biotecnología de plantas medicinales : generando fármacos de un futuro tornado presente . *Temas de Ciencia Y Tecnología*, 15(43), 13–20.
- Villarreal, M. L., Cardoso, A., Ortiz, A., & Sharma, A. (2014). Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. *Revista Digital Universitaria*, 15(8), 1–15.
- Wang, H. (2011). Desarrollo de un protocolo de transformación genética de albaricoquero independiente del enotipo. Universidad de Murcia. 11-141.
- Yenda, B., Rao, V. B., & Rao, G. B. (2014). *In vitro* antioxidant activity studies on leaves of *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3), 141-146.

11 ANEXOS

Anexo 1. ANOVA de la inducción de raíces transformadas en plántulas de *G. globosa*: Raíces vs. Cepa

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Cepa	1	0.521	0.521	1.52	0.224
Error	46	15.792	0.343		
Total	47	16.312			

S = 0.5859 R-cuad. = 3.19% R-cuad.(ajustado) = 1.09%



Desv.Est. agrupada = 0.5859

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Cepa	N	Media	Agrupación
K599	24	0.4167	A
AR4	24	0.2083	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

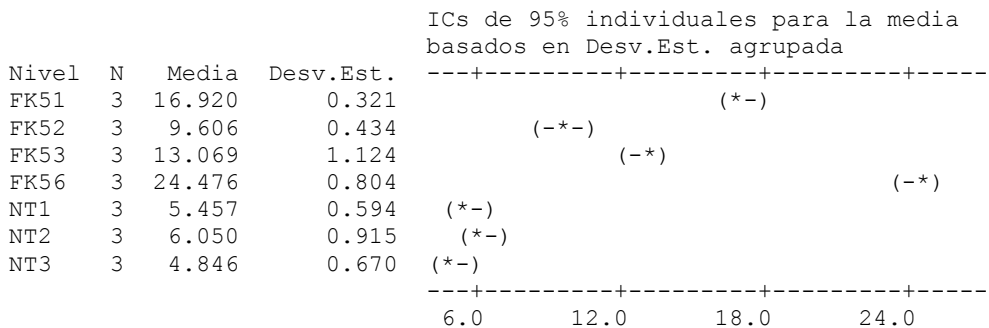
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Cepa

Nivel de confianza individual = 95.00%

Anexo 2. ANOVA de la cuantificación de fenoles totales por gramo de extracto seco en raíces de *G. globosa*: FENOLES (ES) vs. CULTIVO

Fuente	GL	SC	MC	F	P
CULTIVO	6	942.872	157.145	286.58	0.000
Error	14	7.677	0.548		
Total	20	950.549			

S = 0.7405 R-cuad. = 99.19% R-cuad.(ajustado) = 98.85%



Desv.Est. agrupada = 0.741

Agrupar información utilizando el método de Tukey

CULTIVO	N	Media	Agrupación
FK56	3	24.476	A
FK51	3	16.920	B
FK53	3	13.069	C
FK52	3	9.606	D
NT2	3	6.050	E
NT1	3	5.457	E
NT3	3	4.846	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

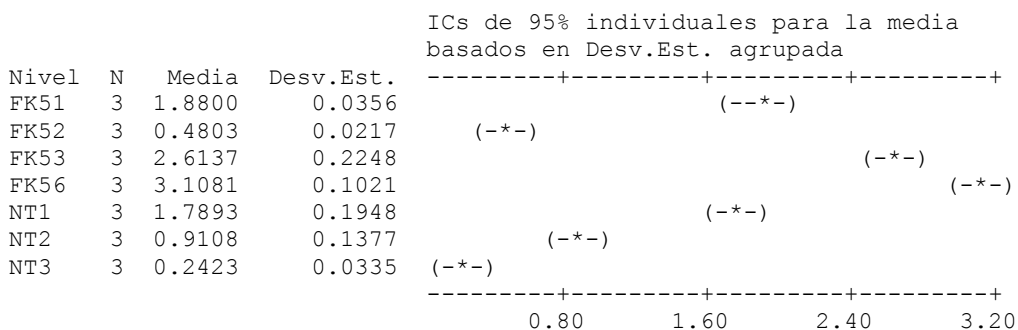
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de CULTIVO

Nivel de confianza individual = 99.58%

Anexo 3. ANOVA de la cuantificación de fenoles totales por gramo de peso seco en raíces de *G. globosa*: Fenoles (PS) vs. CULTIVO

Fuente	GL	SC	MC	F	P
CULTIVO	6	20.9515	3.4919	202.51	0.000
Error	14	0.2414	0.0172		
Total	20	21.1929			

S = 0.1313 R-cuad. = 98.86% R-cuad.(ajustado) = 98.37%



Desv.Est. agrupada = 0.1313

Agrupar información utilizando el método de Tukey

CULTIVO	N	Media	Agrupación
FK56	3	3.1081	A
FK53	3	2.6137	B
FK51	3	1.8800	C
NT1	3	1.7893	C
NT2	3	0.9108	D
FK52	3	0.4803	E
NT3	3	0.2423	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

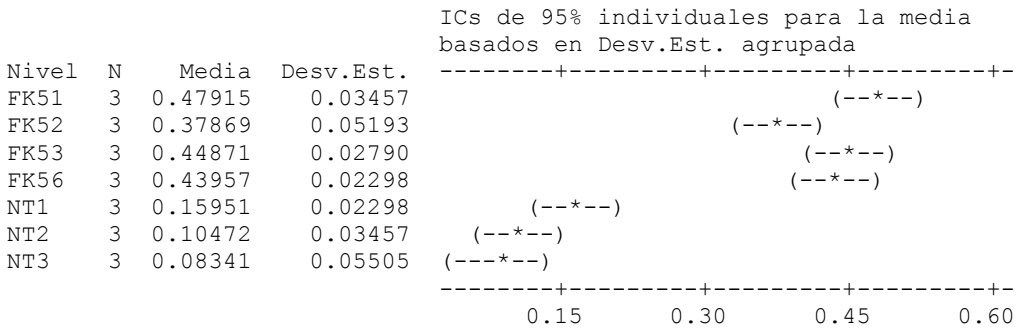
Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de CULTIVO

Nivel de confianza individual = 99.58%

Anexo 4. ANOVA de la cuantificación de flavonoides por gramo de extracto seco en raíces de *G. globosa*: Flavonoides (ES) vs. Cultivo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Cultivo	6	0.55397	0.09233	64.94	0.000
Error	14	0.01991	0.00142		
Total	20	0.57388			

S = 0.03771 R-cuad. = 96.53% R-cuad.(ajustado) = 95.04%



Desv.Est. agrupada = 0.03771

Agrupar información utilizando el método de Tukey

Cultivo	N	Media	Agrupación
FK51	3	0.47915	A
FK53	3	0.44871	A
FK56	3	0.43957	A
FK52	3	0.37869	A
NT1	3	0.15951	B
NT2	3	0.10472	B
NT3	3	0.08341	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Cultivo

Nivel de confianza individual = 99.58%

Anexo 4. ANOVA de la cuantificación de flavonoides por gramo de peso seco en raíces de *G. globosa*: Flavonoides (PS) vs. Cultivo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Cultivo	6	0.0100464	0.0016744	29.98	0.000
Error	14	0.0007820	0.0000559		
Total	20	0.0108285			

S = 0.007474 R-cuad. = 92.78% R-cuad.(ajustado) = 89.68%

