



TESIS

**“Evaluación de inductores de metabolitos secundarios
en un modelo de raíces modificadas genéticamente
mediante *Agrobacterium rhizogenes* en zanahoria
(*Daucus carota*)”**

QUE PRESENTA:

LBG. Cinthya Yareli Burboa Meza

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Miguel Ángel Segura Castruita

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROBIOTECNOLOGÍA

TLAJOMULCO DE ZÚÑIGA, JALISCO. Diciembre, 2022.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS...

Principalmente a mi familia por todo el apoyo en cada una de las etapas de mi vida profesional, porque sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A mi mentor el Dr. Juan Florencio Gómez Leyva por su enseñanza, por compartirme sus conocimientos, orientarme, ayudarme en la realización de este trabajo, por la confianza de abrirme las puertas de su laboratorio y por ser un gran apoyo durante estos dos años.

A mi director de tesis Dr. Miguel Ángel Segura por su asesoría y apoyo para la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, por hacer mis días divertidos y ligeros en las jornadas de trabajo. Especialmente a Mely, Betty, Elias, Yanelli ☺ Los quiero mucho.

A mi roomie, mejor amiga y compañera inseparable durante tantos años, pero especialmente durante esta etapa en la que compartimos tantas cosas especiales que me ayudaron a crecer como persona, amiga y profesional. ¡Unas cuantas lloraditas y todo se puede! Te ami amix 💕

Y mi mas grande agradecimiento a Efren por ayudarme siempre, por tu paciencia infinita y tu enseñanza, por tu apoyo en todo momento, por motivarme a terminar esta etapa, gracias por llegar y hacerla más especial 💕

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
3.1 <i>Daucus carota</i>	4
3.2 Metabolitos secundarios en plantas	7
3.2.1 Obtención de metabolitos secundarios.....	10
3.2.2 Cultivos de raíces pilosas.....	11
3.3 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	13
3.3.1 Proceso de transformación genética con <i>Agrobacterium</i> <i>rhizogenes</i>	13
3.3.2 Características de las raíces transformadas	16
3.4 Regeneración de planta a partir de raíces pilosas.....	17
3.5 Elicitación.....	18
IV. JUSTIFICACIÓN.....	24
V. HIPÓTESIS	25
VI. OBJETIVOS.....	26
6.1 Objetivo general	26
6.2 Objetivos específicos	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1 Cepa bacteriana.....	27
7.2 Extracción de ADN plasmídico	27
7.3 Transformación de <i>D. carota</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i>	28
7.4 Confirmación de transformación genética de raíces pilosas por medio de PCR.....	29

7.5 Estudio de elicitación	30
7.6 Determinación de compuestos fitoquímicos.....	30
7.6.1 Preparación de extractos de raíz pilosa	30
7.6.2 Determinación de fenoles totales	31
7.6.3 Determinación de flavonoides totales	32
7.6.4 Capacidad antioxidante por el método de DPPH	34
7.6.5 Capacidad antioxidante por el método FRAP	35
7.7 Determinación de la concentración de carotenoides	37
7.7.1 Extracción de carotenoides a partir de raíz pilosa	37
7.7.2 Cuantificación de carotenoides totales	37
7.8 Tratamientos de elicitación para la evaluación de la expresión de genes de biosíntesis de carotenoides.....	38
7.9 Extracción de ARN de raíces pilosas elicitadas.....	38
7.10 Síntesis de cDNA.....	39
7.11 Expresión de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides por medio de PCR tiempo real (qRT- PCR).....	40
7.12 Regeneración de genes plantas a partir de raíces pilosas.....	41
7.13 Análisis estadístico	41
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
8.1 Extracción de ADN plasmídico y confirmación de genes de virulencia.....	42
8.2 Transformación genética de <i>D. carota</i> con <i>A. rhizogenes</i>	43
8.3 Efecto de elicitores en cultivos de raíces pilosas de <i>D. carota</i>	44
8.4 Cuantificación de carotenoides totales en raíces elicitadas.....	53
8.5 Expresión de genes involucrados en la ruta biosintética de carotenoides en raíces pilosas elicitadas de <i>D. carota</i>	56
8.6 Regeneración de planta a partir de raíces transformadas de <i>D. carota</i>	66
XI. CONCLUSIONES.....	71

X. BIBLIOGRAFÍA.....	73
XI. ANEXOS	86

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANA	Ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
AS	Ácido salicílico
Aux	Auxina
BAP	6- Bencilaminopurina
Ca	Clorofila a
Cb	Clorofila b
cDNA	DNA complementario
CHXB	Hidroxilasa del anillo β
CHXE	Hidroxilasa del anillo α
CN	Control Negativo
CP	Control Positivo
CRTISO	Carotenoide isomerasa
Ct	Carotenoides totales
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<i>D. carota</i>	<i>Daucus carota</i>
D.O.	Densidad Óptica
dNTPS	Desoxinucleótidos trifosfatados
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
DXP	1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato

EAG	Ácido Gálico
Eq	Equivalente
Fe⁺²	Catión ferroso
Fe⁺³	Catión férrico
FeCl₃.6H₂O	Cloruro férrico hexahidratado
FeSO₄	Sulfato de hierro (II)
FRAP	Poder Antioxidante Reductor Férrico
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
GA_{20 ox}	Giberelina-20-oxidasa
GA₃	Ácido Giberélico
GA_{3 ox}	Giberelin-3-oxidasa
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico
GGPP	C20-geranilgeranil difosfato
GID1	Insensible a la Giberelina DWARF1
h	Horas
JA	Ácido Jasmónico
Kb	Kilobases
Kg	Kilogramo
Kg/cm³	Kilogramo por centímetro cúbico
L	Litro
LCYB1	Licopeno β ciclaza
LCYE	Licopeno ε-ciclaza

M	Molar
MeJA	Metil Jasmonato
mg	Miligramo
mg/L	Miligramo por litro
mg/mL	Miligramo por mililitro
MgSO₄	Sulfato de magnesio
min	Minutos
mM	Micromolar
MM	Medio Mínimo
MS	Murashige and Skoog
N	Normal
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NCED1	9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa
NH₄⁺	Amonio
nm	Nanómetros
NO₃	Nitrato
O₂	Oxígeno molecular
°C	Grados Celsius
P.s	Peso seco
P.f	Peso fresco
p/v	Peso sobre volumen
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDS	Fitoeno desaturasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PSY	Fitoeno sintasa
QCE	Quercentina
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
Rf	Rifampicina
<i>A. rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Ri	Inductor de raíces
<i>rol C</i>	Lugar de enraizamiento C
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscriptasa
s	Segundo
t	Tiempo
T-DNA	ADN de Transferencia
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
TPZT	2, 4, 6 tripridril-s-triazina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
U	Unidad
v/v	Volumen a Volumen
<i>virD</i>	Gen de virulencia D
YEB	Caldo de extracto de levadura
ZDS	ζ-caroteno desaturasa

ZEP	Zeaxantina Epoxidasa
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vía de biosíntesis de carotenoides en plantas. Los recuadros indican los principales carotenoides encontrados en zanahoria.	6
2	Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario.	9
3	Esquema del plásmido silvestre Ri de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .	14
4	Representación esquemática del modo de acción del elicitor en la célula vegetal.	22
5	Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales.	32
6	Curva de calibración de quercentina para la determinación de flavonoides totales.	33
7	Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.	35
8	Curva de calibración de FeSO ₄ para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.	36
9	Espectro de absorción de los pigmentos clorofila <i>a</i> , <i>b</i> y carotenoides.	37
10	ADN plasmídico de cepas de ATCC15834, BV696, A4 de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .	42
11	Amplificación por PCR de genes <i>rolC</i> , <i>Aux1</i> , <i>virD2</i> de las cepas de ATCC15834, BV696, A4.	43
12	Amplificaciones por PCR de los genes <i>rolC</i> , <i>aux1</i> y <i>virD</i> .	44
13	Raíces pilosas de <i>D. carota</i> elicidadas con diferentes tratamientos.	46
14	Efecto de diferentes concentraciones de GA ₃ , MeJA y AS en el contenido de flavonoides totales en raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	47
15	Efecto de diferentes concentraciones de GA ₃ , MeJA y AS en el contenido de fenoles totales en raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	48

16	Efecto de diferentes concentraciones de GA ₃ , MeJA y AS en el contenido de antioxidantes mediante el método DPPH en raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	50
17	Efecto de diferentes concentraciones de GA ₃ , MeJA y AS en el contenido de antioxidantes mediante el método FRAP en raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	51
18	Efecto de diferentes concentraciones de GA ₃ , MeJA y AS en el contenido de carotenoides totales en raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	54
19	Modelo propuesto de la acción de GA ₃ exógeno y su efecto la biosíntesis de giberelinas y carotenoides endógenos en raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	55
20	Niveles de expresión relativa de genes implicados en la vía biosintética de carotenoides en raíces pilosas de <i>D. carota</i> bajo el efecto de GA ₃ y MeJA como elicitores.	62
21	Análisis de componentes principales de determinación de metabolitos secundarios y nivel de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides en raíces pilosas <i>D. carota</i> .	63
22	Heatmap de relación tratamiento vs determinaciones.	66
24	Regeneración de planta a partir de raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	69
25	Efecto de diferentes concentraciones de BAP y ANA en la formación de brotes adventicios por callo regenerados a partir de raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ejemplos de metabolitos producidos por cultivos de raíces transformadas.	20
2	Primers utilizados para PCR.	28
3	Concentraciones de la curva estándar de ácido gálico. Determinación de fenoles totales.	31
4	Concentraciones de la curva estándar de quercetina. Determinación de flavonoides totales.	33
5	Concentraciones de la curva estándar de Trolox. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH.	34
6	Concentraciones de la curva estándar de FeSO ₄ . Determinación de capacidad antioxidante por el método FRAP.	36
7	Componentes utilizados en la síntesis de cDNA.	40
8	Temperaturas de síntesis de cDNA.	40
9	Resultados de los tratamientos de elicitación en raíces pilosas de <i>D. carota</i> .	52
10	Efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y ANA en la inducción de brotes en callos formados a partir de raíces pilosas.	67

I. RESUMEN

Daucus carota (Umbelliferae o Apiaceae) es uno de los cultivos de hortalizas de raíz más importantes que se cultivan en todo el mundo, y es ampliamente conocida por sus beneficios nutrimentales al ser parte importante de la dieta de la población mundial. Dicha importancia nutrimental esta dada por el contenido fitoquímico que es capaz de sintetizar, entre los que se conocen principalmente carotenoides, fenoles y flavonoides, los cuales presentan actividad antioxidante. Estos compuestos han ganado valor industrial y farmacéutico, por lo que se buscan alternativas para aumentar su producción a gran escala. El cultivo de raíces pilosas producidas por la transformación genética de zanahoria con *Agrobacterium rhizogenes* se presenta como una alternativa para obtener un incremento en el contenido total de estos metabolitos. En el presente trabajo, se empleó este sistema para obtener raíces pilosas de zanahoria, las cuales fueron elicitadas con tres fitohormonas (GA_3 , MeJA, AS) en distintas concentraciones, con el fin de incrementar el contenido de antioxidantes. El tratamiento con ácido giberelico (GA_3) en una concentración de 20 μ M mostró los mejores resultados con 179.17 mg QCE/g de flavonoides totales, 3.8 mg GAE/g de fenoles totales y 779.36 μ g/g de carotenos totales. Partiendo de este ensayo, se seleccionaron los tratamientos con mejores resultados (GA_3 20 μ M y MeJA 400 μ M) para evaluar la expresión de seis genes (*PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *LCYB1*, *LCYE* y *ZEP*) de la ruta de biosíntesis de carotenoides. En los cuales se obtuvo un aumento en la expresión de todos los genes con el tratamiento con GA_3 20 μ M (*PSY1* 7.06 veces, *PSY2* 3.14 veces, *PDS* 3.95 veces, *LCYB1* 5.74 veces, *LCYE* 4.62 veces y *ZEP* 4.98 veces). Adicionalmente, se realizó un ensayo de regeneración de plantas a partir de raíces pilosas, evaluando diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, obteniéndose el mayor número de brotes por callo empleando una concentración de BAP 0.5 mg/L + 0.1 mg/L ANA generándose 11 ± 2.24 brotes/callos en promedio.

II. INTRODUCCIÓN

Las plantas son capaces de sintetizar una enorme variedad de compuestos, particularmente metabolitos secundarios. Las funciones precisas de muchos de estos compuestos se desconocen en gran medida, pero las plantas invierten una gran cantidad de energía en su síntesis porque contribuyen a su supervivencia. Muchos metabolitos secundarios están involucrados en reacciones de defensa frente a diferentes tipos de estrés. Sin embargo, la abundancia de estos compuestos suele ser baja (<1% peso seco) y su síntesis depende en gran medida de la predisposición genética de la planta. La producción de metabolitos secundarios a menudo se restringe a etapas específicas del desarrollo de la planta o la respuesta a diferentes estreses. Estos compuestos secundarios han llamado la atención del público en general debido a que la mayoría de ellos tienen efectos benéficos para la salud humana, siendo considerados como compuestos bioactivos; por lo que se han desarrollado nuevas estrategias para la producción de estos compuestos (Thakur et al., 2019).

Tradicionalmente, los metabolitos secundarios se pueden obtener directamente por extracción de materia prima vegetal o por síntesis química, pero estos procesos a menudo tienen rendimientos pobres o inconsistentes. En el primer caso, los problemas surgen de la naturaleza estacional del crecimiento de las plantas, la heterogeneidad de los compuestos y, en algunos casos, el alto riesgo de extinción de las plantas, particularmente si el material vegetal se recolecta del medio natural. En el caso de la síntesis química, la estereoespecificidad, las estrictas condiciones de las reacciones bioquímicas y los altos costos de producción son las principales dificultades en la producción de compuestos bioactivos (Almagro y Pedreño, 2020).

Durante los últimos años, se han desarrollado diversas estrategias biotecnológicas para la producción de metabolitos secundarios, principalmente el uso de cultivos de plantas *in vitro* que tienen muchas ventajas, ya que producen extractos homogéneos, se cultivan en condiciones estériles y su mantenimiento es independiente de las condiciones climáticas o estacionales. Además, la aplicación

de ingeniería genética y metabólica también se ha desarrollado para evaluar su eficacia hacia la mejora de la producción de metabolitos secundarios (Halder et al.,2018).

La transformación genética de plantas ha permitido incrementar la cantidad de metabolitos secundarios sintetizados por diversos géneros de plantas. Los cultivos de raíces pilosas obtenidas del proceso de transformación con *Agrobacterium rhizogenes* se han desarrollado como una estrategia prometedora para la producción de metabolitos secundarios, especialmente en casos donde la síntesis o extracción de compuestos bioactivos es difícil o inviable, o donde la cosecha de material vegetal implica un daño grave al medio ambiente, además permite obtener una alta tasa de producción de estos metabolitos y la síntesis endógena de fitohormonas (Ortiz, 2008).

Por su parte, la elicitación de la inducción de nuevos metabolitos secundarios o biosíntesis mejorada empleando reguladores de crecimiento, es una de las herramientas biotecnológicas más eficaces y ampliamente empleadas para la acumulación de estos compuestos en cultivos de tejidos vegetales *in vitro* (Wang et al., 2013).

El objetivo de la estimulación de compuestos bioactivos como flavonoides, compuestos fenólicos, terpenos y pigmentos es que se produzcan en mayor manera debido a su alto interés por diversas industrias entre las que destacan la farmacéutica y alimenticia, ya que dichos compuestos son fuente importante de capacidades antioxidantes que comparten efectos nutritivos y terapéuticos.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 *Daucus carota*

La zanahoria (*Daucus carota* ssp. *sativus*) es una planta bienal que pertenece al grupo botánico Umbelliferae o Apiaceae y la cual es uno de los cultivos de hortalizas de raíz más importantes que se cultivan en todo el mundo (Dunemann y Bottcher, 2021). La principal importancia nutricional de las zanahorias en la dieta humana se basa en la gran cantidad de fitoquímicos presentes en la raíz reservante, estos incluyen carotenoides, antocianinas y otros compuestos fenólicos (Arscott y Tanumihardjo 2010), lo que hace de la zanahoria un alimento funcional (Hager y Howard 2006).

Se sabe que la acumulación de carotenoides en las plantas es el resultado de la biosíntesis, la degradación de pigmentos precursores de naturaleza terpenoide. A diferencia de otras plantas, casi todos los cultivares de zanahoria pueden acumular una gran cantidad de pigmentos en su raíz de reserva (Cazzonelli y Pogson 2010). Las variedades de zanahoria que se cultivan actualmente en el mundo poseen raíces que varían de blanco, amarillo, naranja y rojo, e incluso hay variedades de zanahoria con raíces reservantes moradas (Surles et al. 2004; Arscott y Tanumihardjo 2010). La razón principal de esta diversidad de colores se debe a su capacidad para sintetizar y acumular una gran cantidad de diferentes tipos de carotenoides y antocianinas en la raíz (Montilla et al. 2011). La cantidad de pigmentos en la zanahoria también se ve afectada por la temporada de crecimiento, el tipo de suelo y diferentes factores genéticos (Grassmann et al. 2007). Además, el perfil y la cantidad de carotenoides en la raíz reservante también varían drásticamente durante su desarrollo y entre diferentes condiciones de crecimiento (Fuentes et al. 2012).

La biosíntesis de carotenoides se encuentra bien caracterizada (Clotault, et al., 2008) (Figura 1). En las plantas, los carotenoides se producen en los plástidos mediante enzimas codificadas nuclearmente (Cunningham y Gantt, 1998). El precursor de carotenoide C20-geranilgeranil difosfato (GGPP) se sintetiza a través

de la vía plastidial 1-desoxi-Dxilulosa-5-fosfato (DXP). GGPP también es el precursor de giberelinas, plastoquinonas, terpenos, clorofilas, tocoferoles y filoquinonas (Bouvier et al., 2005). El fitoeno incoloro resulta de la condensación de dos moléculas GGPP por una fitoeno sintasa (*PSY*). La desaturación del fitoeno en licopeno a través del ζ -caroteno, el primer carotenoide amarillo, es catalizada tanto por la fitoeno desaturasa (*PDS*) como por la ζ -caroteno desaturasa (*ZDS*). La enzima carotenoide isomerasa (*CRTISO*) participa en la conversión de poli-*cis* licopeno en *trans*-licopeno. Posteriormente, los extremos del carotenoide lineal licopeno pueden ciclarse. La acción coordinada de licopeno β ciclasa (*LCYB*) y licopeno ϵ -ciclasa (*LCYE*) permite la síntesis de α -caroteno a partir de licopeno. La sola acción de *LCYB* conduce al β -caroteno (Clotault, et al., 2008).

El α -caroteno y el β -caroteno pueden ser hidroxilados en luteína tanto por la hidroxilasa del anillo β (*CHXB*) como por la hidroxilasa del anillo α (*CHXE*), y en zeaxantina por la *CHXB*. Luego, la zeaxantina se transforma en violaxantina a través de la anteraxantina por la zeaxantina epoxidasa (*ZEP*). El producto final de la vía es el ácido abscísico. A lo largo de la vía, los carotenoides podrían ser escindidos por dioxigenasas de escisión de carotenoides en apocarotenoides (Auldridge et al., 2006).

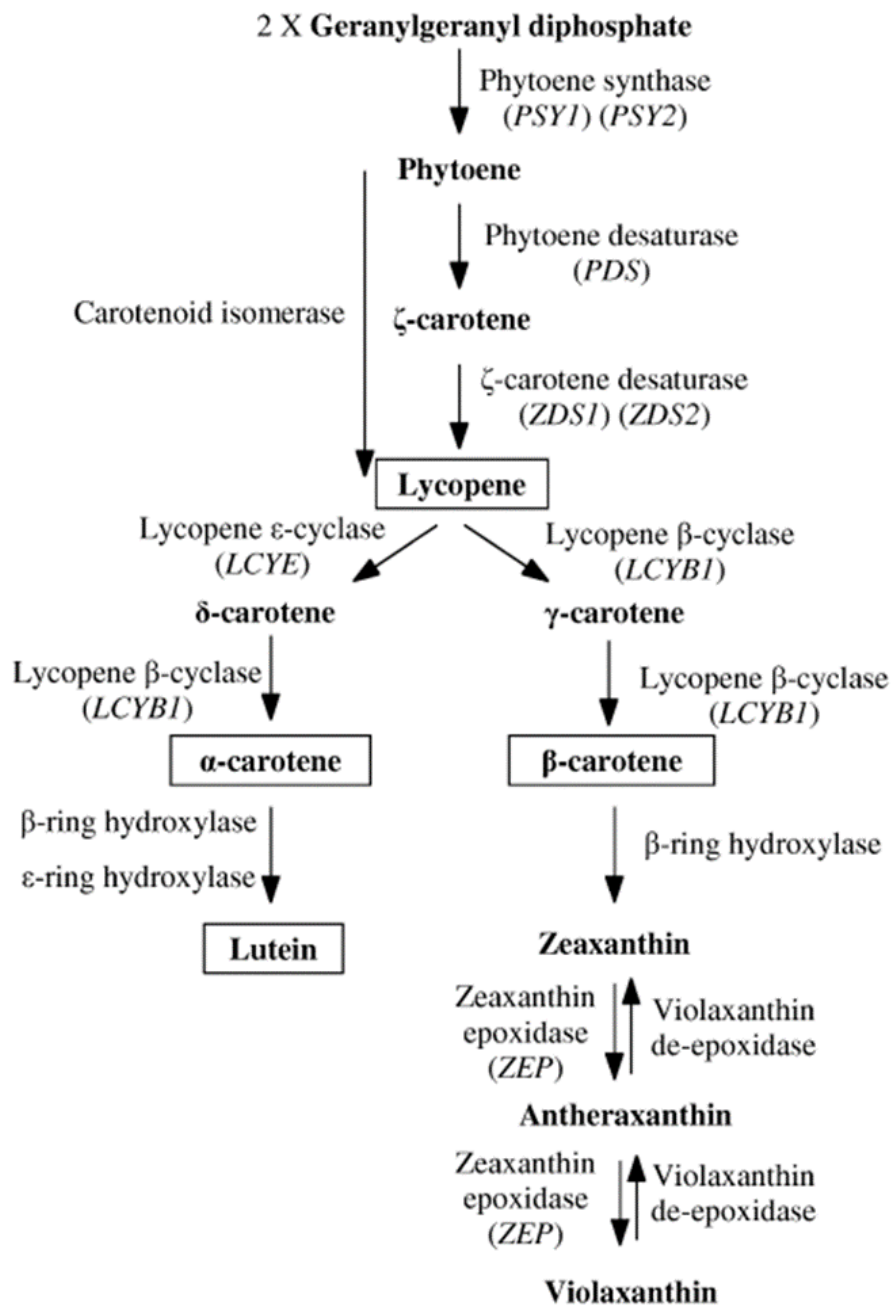


Figura 1. Vía de biosíntesis de carotenoides en plantas. Los recuadros indican los principales carotenoides encontrados en zanahoria. Tomada de Clotault, 2008.

En la raíz reservante de zanahorias anaranjadas, el α -caroteno y el β -caroteno son los carotenoides sintetizados más abundantes y se acumulan en grandes cristales dentro de los cromoplastos (Baranska et al. 2006). Los cromoplastos se diferencian de los proplastidios durante el desarrollo normal de las raíces reservantes en la oscuridad. Adicionalmente, se identificó que el aumento en el contenido de carotenoides se correlaciona con un aumento significativo en la expresión de casi todos los genes carotenogénicos, principalmente *PSY2*, *ZDS2*, *PDS*, *LCYB1*, *LCYE*, *ZEP* y *NCED1* (Maass et al. 2009).

El consumo de zanahorias y sus derivados se ha incrementado sostenidamente en las últimas décadas, principalmente debido al reconocimiento de este alimento como una importante fuente de antioxidantes naturales; lo que ha tenido un impacto directo en su producción, convirtiéndose en una de las hortalizas cultivadas de mayor importancia económica a nivel mundial, tanto en el área de producción como en el valor de mercado. En la actualidad, Asia produce aproximadamente el 61,6% del total de zanahorias producidas en el mundo, seguida de Europa con un 22,6% y América con un 9,4% de la producción (FAOSTAT Database on Agriculture 2014).

3.2 Metabolitos secundarios en plantas

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios o productos naturales).

Los metabolitos secundarios incluyen una amplia variedad de compuestos de bajo peso molecular que no tienen un papel directo en el mantenimiento de los procesos vitales fundamentales, pero que son necesarios para la interacción ambiental de la planta, como la supervivencia, la adaptación y la competitividad (Halder et al., 2019). Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que

proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la producción, debido a que atraen a insectos polinizadores o a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes; y algunos otros también intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, los metabolitos secundarios difieren de los primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal; se sintetizan en pequeñas cantidades y de forma no generalizada, estando su producción restringida a un determinado género, a una familia, o incluso a algunas especies de plantas y su síntesis se encuentra bajo una estricta regulación metabólica, en una etapa fisiológica y localización específica del tejido de la planta (Chandra y Chandra, 2011).

Anteriormente estos fitoquímicos no presentaban mayor interés, debido a que eran considerados como productos de desecho; sin embargo, gracias a diversas investigaciones que se han estado realizando en los últimos años, se sabe que son importantes para las plantas y son útiles para el ser humano, debido a que tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Naik et al., 2016).

Se estima que hay aproximadamente 200,000 metabolitos secundarios en el reino vegetal, que, de acuerdo a su origen biosintético pueden ser clasificados en cuatro grupos principales (Mishra et al., 2012) (Figura 2).

- Terpenos: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

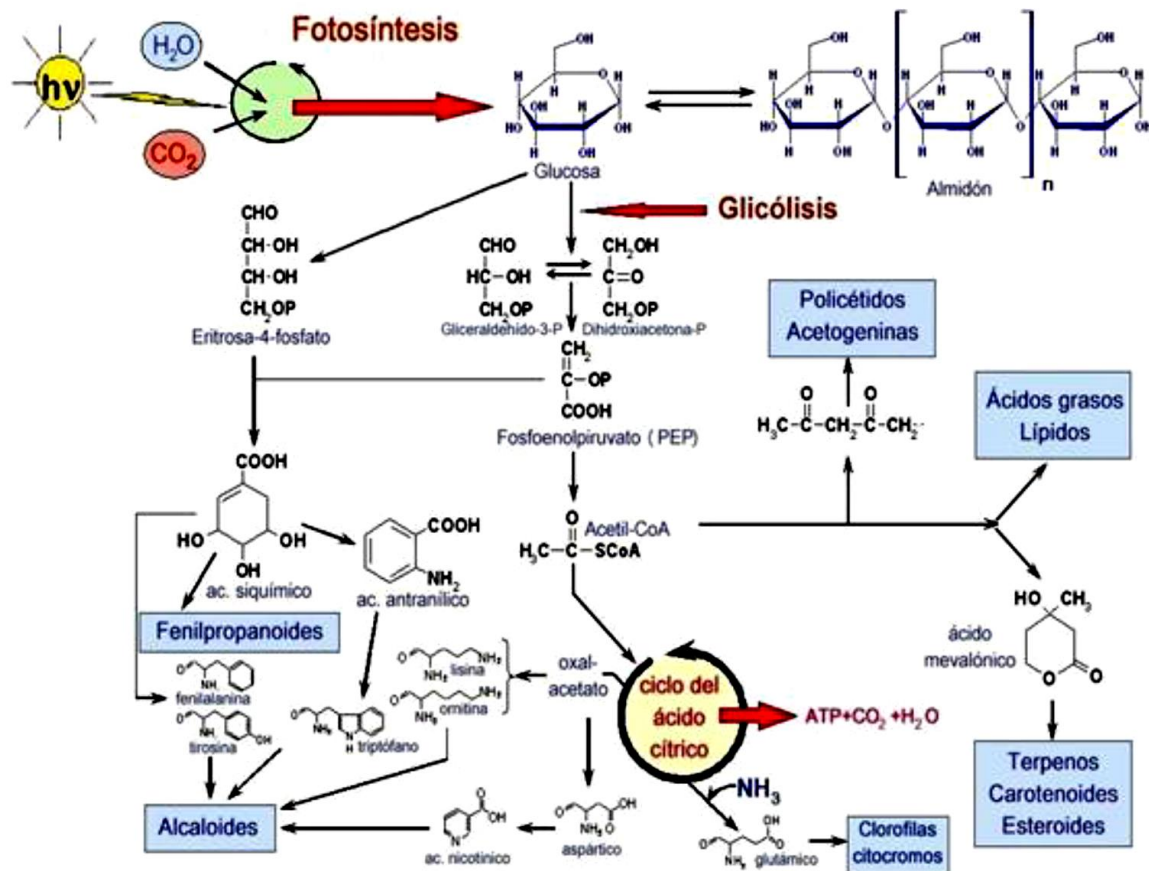


Figura 2. Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario. Tomada de García y Carril, 2011.

Debido a que estos compuestos no son esenciales para el crecimiento de las plantas y, por lo tanto, se producen en pequeñas cantidades, éstos a menudo se acumulan en tejidos especializados, lo cual dificulta su extracción, aislamiento y purificación (Kim et al., 2002). Suelen tener estructuras muy complicadas y/o exhiben quiralidad (Mukundan et al., 1997). En consecuencia, en muchos casos la síntesis orgánica no es rentable y la extracción de plantas cultivadas en el campo ha sido el principal método utilizado para obtener económicamente estos importantes compuestos (Balandrin et al., 1985; Dicosmo y Misawa, 1995). Dependiendo de la especie de planta, los métodos agrícolas tradicionales a menudo requieren meses o años para obtener una cosecha. Además de los factores mencionados anteriormente, la disminución de los recursos vegetales y el alto costo

de mano de obra involucrados en la extracción de metabolitos secundarios en plantas han acelerado el uso del cultivo de células vegetales para su producción efectiva.

3.2.1 Obtención de metabolitos secundarios

Producción de metabolitos secundarios en plantas completas o cultivos celulares *in vitro*

La producción y/o acumulación natural de fitoquímicos en las plantas suele ser baja y depende de la etapa fisiológica y de desarrollo de ésta (Zárate y Verpoorte, 2007), así como de las condiciones de cultivo, los cambios climáticos o las limitaciones geopolíticas. Se requieren cantidades muy altas de tejido vegetal para extraer cantidades suficientes de los metabolitos secundarios objetivo, pero una extracción a gran escala puede representar serios problemas económicos y ecológicos. En el peor de los casos, una sobreexplotación de plantas silvestres con fines comerciales puede conducir a su casi extinción o a su inclusión en la lista de especies silvestres protegidas, endémicas o raras. En vista de una mayor demanda de metabolitos secundarios, particularmente como precursores de productos con fines farmacológicos, existe la necesidad de desarrollar nuevos enfoques eficientes para su producción. La obtención de productos naturales en cultivos de células vegetales *in vitro* es una alternativa para su extracción a partir de plantas silvestres o cultivadas (Makhzoum et al., 2013); ya que el cultivo de células vegetales no se ve afectado por los cambios en las condiciones ambientales, por lo que la producción mejorada puede estar disponible en cualquier lugar o temporada. Los estudios sobre la producción de metabolitos útiles mediante el cultivo de células vegetales se han llevado a cabo en una escala cada vez mayor desde la década de 1950. A pesar de los esfuerzos considerables, solo se han logrado unos pocos procesos comerciales utilizando cultivos de células vegetales (Kieran et al., 1997). El mayor desafío de producir metabolitos secundarios a partir de cultivos en suspensión de células vegetales es que los metabolitos secundarios generalmente son producidos por células especializadas y/o en distintas etapas de desarrollo (Balandrin et al., 1985; Mukundan et al., 1997); debido a que algunos compuestos no se sintetizan si las

células permanecen indiferenciadas (Berlin et al., 1985). Además, los cultivos de células vegetales indiferenciadas al ser genéticamente inestables a menudo pierden, parcial o totalmente, su capacidad biosintética para acumular productos secundarios (Rokem y Goldberg, 1985; Charlwood y Charlwood, 1991).

3.2.2 Cultivos de raíces pilosas: una forma alternativa de aumentar la acumulación de metabolitos secundarios en el cultivo

Los cultivos de tejidos diferenciados, como raíces o brotes, ofrecen una alternativa viable para solucionar la disminución progresiva en la cantidad de metabolitos secundarios que se observa a menudo en cultivos de suspensión celular mantenidos *in vitro* (Makhzoum et al., 2013). De hecho, numerosos compuestos secundarios con valiosas propiedades terapéuticas se acumulan en las raíces de las plantas "normales". Sin embargo, la cosecha de raíces es destructiva, lo que resulta en la pérdida de los tejidos. Debido a su crecimiento prolífico y su idoneidad para el cultivo continuo, una nueva ruta para mejorar la producción de metabolitos secundarios en el sistema de cultivo de tejidos es mediante la transformación de especies de plantas deseables utilizando el sistema de vector natural *Agrobacterium rhizogenes*, el agente causante de la enfermedad de las raíces pilosas en las plantas (Giri y Narasu, 2000; Bourgaud et al., 2001). En la naturaleza, la bacteria gram negativa del suelo *A. rhizogenes* modifica genéticamente especies de plantas dicotiledóneas para convertirlas en productores químicos de una fuente de alimento (opina). Este proceso de transformación conduce a la aparición de "raíces pilosas" en el sitio de infección de la planta (Shanks y Morgan, 1999); cuyas raíces genéticamente transformadas (pilosas) son capaces de crecer ilimitadamente en medios de cultivo libres de hormonas de crecimiento.

Se han establecido cultivos de raíces pilosas de varias plantas dicotiledóneas/monocotiledóneas y se ha encontrado que producen los mismos metabolitos secundarios que las raíces naturales y, por lo tanto, ofrecen un sistema prometedor para la producción de metabolitos secundarios (Mukundan et al., 1997; Doran, 2002; Rudrappa et al., 2005).

Tepfer (1990) ha enumerado algunas de las especies de plantas en las que se han establecido líneas de raíces pilosas productivas de rápido crecimiento. La mayor ventaja de las raíces pilosas es que a menudo exhiben una capacidad biosintética similar o mayor para la producción de metabolitos secundarios en comparación con sus plantas madre (Kim et al., 2002). Muchos metabolitos secundarios valiosos se sintetizan en las raíces *in vivo* y, a menudo, la síntesis está relacionada con la diferenciación de las raíces (Flores et al., 1999). Se ha informado que los miembros de varias familias, incluidas *Balsaminaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Juglandaceae*, *Labiatae*, *Moraceae*, *Ranunculaceae*, *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Cucurbitaceae*, *Plumbaginaceae*, *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae* y *Umbelliferae*, inducen síntomas de la enfermedad de la raíz pilosa al ser heridos e inoculados con *A. rhizogenes* (De Cleene y De Ley, 1981; Dawda et al., 1997). Incluso en los casos en que un metabolito secundario en particular se acumula solo en la parte aérea de una planta intacta, se ha demostrado que este tipo de cultivos son capaces de acumular el mismo metabolito en raíz (Wallaart et al., 1999). Además, se ha demostrado que estas raíces transformadas a menudo pueden regenerar plantas viables completas y mantener su estabilidad genética durante el subcultivo continuo. Los cultivos de raíces pilosas han resultado ser una herramienta valiosa para estudiar las propiedades bioquímicas y el perfil de expresión génica de las rutas metabólicas. En adición, ayudan a dilucidar los intermediarios y las enzimas clave involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Hu and Du, 2006).

Las ventajas del cultivo de raíces pilosas destacadas anteriormente han desarrollado su prometedor papel en la producción masiva de metabolitos secundarios de alto valor y aunque la aplicación a gran escala de raíces pilosas no es una tarea fácil debido a sus características, actualmente se continúan investigando procesos para hacer factible su aplicación comercial (Kim et al., 2002).

3.3 *Agrobacterium rhizogenes*

La especie *Agrobacterium rhizogenes* es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia Rhizobiaceae, aerobia obligada que se encuentra en el suelo, capaz de vivir en forma saprófita o como parásito; la cual es responsable de la enfermedad de raíces pilosas al infectar plantas dicotiledóneas (Winans, 1992).

En condiciones de laboratorio se han encontrado más de 450 diferentes especies de plantas, que incluyen monocotiledóneas, dicotiledóneas y algunas gimnospermas, susceptibles a ser infectadas por esta bacteria (Veena y Taylor, 2007).

3.3.1 Proceso de transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*

El proceso de transformación está basado en la bacteria cuyo mecanismo de patogenicidad se da por la transferencia de genes al genoma de la planta infectada. La generación de raíces pilosas se lleva a cabo por la inserción de un fragmento discreto de DNA bacteriano al núcleo de las células vegetales. El patógeno transfiere un segmento de DNA (región de T-DNA delimitada por repeticiones directas de oligonucleótidos de 25 pb) desde su gran plásmido inductor de raíces (Ri, 200 kb aproximadamente) al genoma del hospedero, el cual contiene genes que codifican proteínas con funciones para la conjugación del plásmido, la biosíntesis y el catabolismo de opinas, así como para la iniciación, transferencia e integración del T-DNA al genoma vegetal (Chandra, 2012) (Figura 3). Este T-DNA porta un conjunto de genes que codifican enzimas para el control de auxinas y citoquininas (*iaaM*, *iaaH*, *ipt*) y codifican genes para opinas (aminoácidos inusuales). En el borde izquierdo (T_L -DNA) se localizan los genes responsables de la producción del fenotipo de raíces pilosas, y en el borde derecho (T_R -DNA) se encuentran los genes que controlan la síntesis de opinas y auxinas (Winans 1992; Veena y Taylor, 2007).

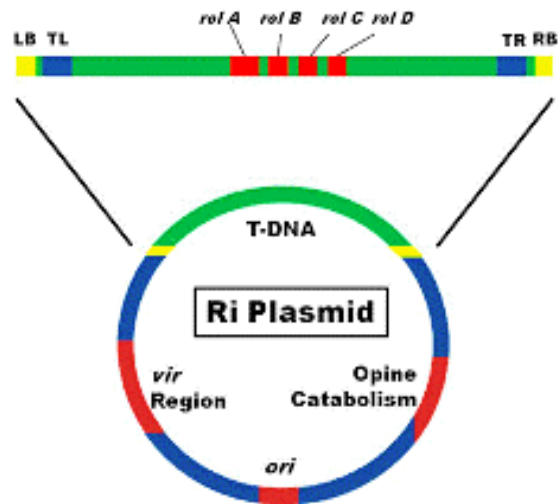


Figura 3. Esquema del plásmido silvestre Ri de *Agrobacterium rhizogenes*. Tomada de Chandra, 2012.

Una vez en el núcleo, éste se integra al DNA genómico dirigiendo una hipersensibilidad en la planta, así como la producción de opinas; estas últimas con la función de inducir la transcripción de genes bacterianos necesarios para su transporte y su catabolismo, además de servir como fuente de carbono, nitrógeno y, algunas veces fósforo, a las bacterias (Roychowdhury et al. 2013).

Para atraer a la bacteria, la planta libera compuestos químicos cuando se ha generado una herida, por lo que son considerados de suma importancia para que se pueda llevar a cabo el movimiento de la bacteria (quimiotaxis) hacia el tejido vegetal. Los diferentes reportes sugieren que factores como el pH extracelular (5.0 a 5.5), y sustancias como compuestos fenólicos, monosacáridos, acetosiringona y compuestos relacionados, son capaces de inducir a los genes *vir*, responsables de la virulencia de las cepas (Winans 1992).

Otros genes están involucrados en la inserción del fragmento T-DNA al genoma de la planta. El gen *virD1* expresa la proteína VirD1, la cual al parecer cataliza cortes en sitios específicos en bordes en posición *trans*; y el gen *virD2*, expresa a la proteína VirD2, que parece guiar al fragmento T-DNA al núcleo, mediante la

imitación de las proteínas celulares reconocidas por el núcleo de la célula vegetal, así como ayudar a la integración del fragmento al genoma de la planta.

En plásmidos Ri se pueden encontrar también los genes *aux1*, *aux2*, *rolB*, los cuales controlan la biosíntesis de auxinas y opinas. Se cree que los genes *aux* sólo son auxiliares en la producción de raíces pilosas, más no necesarios para que se exprese el fenotipo (Winans 1992; Veena y Taylor, 2007). Sin embargo, los genes de mayor importancia parecen ser aquellos denominados genes *rol* (*rolA*, *rolB* y *rolC*), que son inductores de raíces (esenciales para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de las raíces transformadas); éstos se encuentran en el extremo T_L-DNA del plasmido Ri de tipo agropina y se caracterizan por aumentar la sensibilidad de las raíces transformadas a las auxinas agregadas exógenamente y generar fenotipos característicos. El gen *rolA* está asociado con los internudos cortos, hojas rugosas, etc.; el *rolB* genera estambres cortos, estigmas sobresalidos e incremento de las raíces adventicias sobre los tallos; y el *rolC* es responsable de la reducción en la dominancia apical, acortamiento de los internudos e incremento de las ramificaciones, por lo que las plantas obtenidas a partir de cultivos de raíces pilosas son diferentes fenotípicamente a sus contrapartes (Winans, 1992; Veena y Taylor 2007; Roychowdhury et al., 2013).

En algunas cepas de *A. rhizogenes* se han identificado los genes *iaa*, los cuales también están relacionados con la biosíntesis de auxinas. En diversos trabajos se ha visto que éstos son responsables de la generación de raíces pilosas solo en la superficie apical de las raíces, donde de forma natural existen altas concentraciones de auxinas; y la adición de estos genes da como resultados la generación de tumores en la superficie basal. Por lo tanto, las células que contienen los genes *iaa* sintetizan auxinas adicionales, mientras que las células que contienen los genes *rol* adquieren una mayor sensibilidad a esas auxinas (Winans 1992).

Finalmente, después de todo el proceso de transformación con *A. rhizogenes*, el nuevo equilibrio hormonal induce la formación de raíces proliferantes, que emergen en el sitio lesionado (Gaudin et al., 1994). En este caso, síntoma que produce es

conocido como raíz pilosa, llamado así debido a que las raíces de la planta toman ese aspecto, además de proliferar de una manera desorganizada (Ozyigit, 2012).

3.3.2 Características de las raíces transformadas

Las raíces de las plantas pueden sintetizar, almacenar y secretar una gran cantidad de compuestos. Los metabolitos secundarios son producidos en la raíz de la planta y después son translocados a las partes de la planta donde son requeridos.

El fenotipo de raíz pilosa se caracteriza por un rápido crecimiento independiente de las hormonas, falta de geotropismo, ramificación lateral y estabilidad genética. Debido a su productividad alta y estable, los cultivos de raíces pilosas se han investigado durante varias décadas por su potencial de producir metabolitos valiosos que están presentes en las raíces de tipo silvestre (Giri et al., 2000).

En el cultivo *in vitro* de raíces pilosas, las sustancias producidas en las raíces serán liberadas al medio de cultivo, y estas sustancias pueden ser posteriormente extraídas y empleadas para diversos fines. Se han establecido cultivos de raíces pilosas asépticos a largo plazo a partir de más de 200 especies de plantas superiores, debido a su capacidad para sintetizar una amplia diversidad de metabolitos secundarios y para ajustar sus actividades metabólicas en respuesta al estrés biótico y abiótico. Los metabolitos alcaloides, cumarinas, saponinas, ácidos fenólicos, aceites esenciales, terpenos, glicósidos, lactonas, esteroidales, son ejemplos de sustancias que ya se han estado estudiando mediante esta metodología (Roychowdhury et al., 2013).

La transformación con *A. rhizogenes* tiene fundamentalmente dos aplicaciones: la producción de raíces con alta tasa de crecimiento capaces de sintetizar metabolitos secundarios como productos farmacéuticos, aditivos alimentarios y cosméticos, y por otra parte representa una valiosa herramienta para la estimulación de rizogénesis en especies recalcitrantes (Gelvin, 2009).

El cultivo de raíces pilosas posee también otras ventajas: el procedimiento es relativamente sencillo y de bajo costo; los clones de las raíces son genéticamente y

biosintéticamente estables por grandes periodos, incluso en la criopreservación; se puede producir una gran cantidad de compuestos propios de la planta madre, e incluso, nuevos compuestos; la cantidad obtenida de metabolitos puede ser igual o mayor que en las plantas de origen; y puede haber una producción continua de dichos metabolitos (Roychowdhury et al., 2013).

Durante los últimos años, las raíces pilosas se han aplicado en una amplia gama de estudios fundamentales de bioquímica vegetal, biología molecular y fisiología, así como con fines agrícolas, hortícolas y de cultivo de tejidos a gran escala (Doran, 2002).

El desarrollo de raíces pilosas por la infección por *Agrobacterium rhizogenes* proporciona un excelente sistema experimental para evaluar rápida y eficientemente el efecto de los cambios en la expresión de genes específicos o familias de genes en una variedad de fenotipos de raíces (Choudhury y Pandey, 2018). El uso del sistema de raíces pilosas ha permitido descubrir los detalles de los eventos de señalización y desarrollo utilizando enfoques de genética molecular, genómica, proteómica y biología celular. La transformación de *A. rhizogenes* también ha sido utilizada para dilucidar procesos fisiológicos y rutas biosintéticas, generar moléculas derivadas de plantas, ayudar al mejoramiento molecular, mejorar las estrategias de fitorremediación y producir proteínas recombinantes terapéuticas (Georgiev et al., 2012), y principalmente han abierto una nueva dimensión a la aplicación de cultivos de órganos para la síntesis, acumulación y regulación de la producción de metabolitos secundarios *in vitro* debido a su rápido crecimiento en medios simples sin fitohormonas y su fácil mantenimiento en cultivos a largo plazo, así como también ser capaces de regenerar espontáneamente plantas (plantas transformadas con Ri) (Roychowdhury et al., 2017).

3.4 Regeneración de planta a partir de raíces pilosas

Los cultivos de raíces pilosas han servido como material de origen para la regeneración de plantas transgénicas (Gaudin, 1994). Estas plantas muestran un

fenotipo característico, llamado síndrome de raíz pilosa, que incluye dominancia apical reducida tanto en tallos como en raíces, entrenudos más cortos, alta tasa de crecimiento de raíces en cultivo, hojas arrugadas con mayor ancho a relación de longitud, raíces plagiotrópicas, con geotropismo alterado, morfología floral alterada, floración tardía, fertilidad reducida y producción reducida de polen y semillas (Christey, 1997). La transformación de genes *rol* individuales en plantas ha proporcionado información sobre la función y el fenotipo inducido por estos genes, tanto individualmente y en combinación. En varias especies de plantas, la regeneración de ellas a partir de raíces pilosas podría lograrse en presencia de fitohormonas (Choi et al., 2004; Crane et al., 2006). Por otro lado, solo unos pocos informes describen la regeneración espontánea de brotes a partir de cultivos de raíces pilosas en un medio libre de hormonas (Vinterhalter et al., 1999).

Para que sea útil un sistema de transformación genética, tiene que haber un proceso para generar plantas enteras viables a partir de raíces pilosas, una hazaña que ha resultado ser más difícil de lo esperado en varias especies. De hecho, existe la necesidad de regenerar plantas enteras a partir de raíces pilosas para su uso en aplicaciones de horticultura/floricultura (por ejemplo, creación de nuevas variedades), o en ingeniería metabólica para sobreexpresar genes responsables de la producción de metabolitos secundarios sintetizados en partes aéreas de plantas, ya que, si bien una gran diversidad de metabolitos secundarios se sintetiza en las raíces pilosas, algunos productos finales de gran valor, se almacenan o biosintetizan en las hojas o partes aéreas (Makhzoum et al., 2013).

3.5 Elicitación

Dentro de las estrategias utilizadas para aumentar la producción de metabolitos secundarios la elicitación es la más empleada y explorada. Este término hace referencia a la inducción de la biosíntesis de metabolitos mediante el uso de compuestos o condiciones ambientales que desencadenan las rutas de su producción (Ramírez et al., 2016). Los elicitores son sustancias químicas o biofactores de varias fuentes que pueden inducir respuestas fisiológicas y

morfológicas (Zhao et al. 2005), los cuales han sido utilizados como herramientas para mejorar los rendimientos de metabolitos secundarios que tienen funciones de defensa en las células vegetales (Giorgiev et al., 2007).

Éstos pueden ser agentes abióticos, como iones metálicos y compuestos inorgánicos, o pueden derivarse de otros organismos, como moléculas derivadas de hongos, bacterias, virus o herbívoros, así como productos químicos derivados de plantas que se liberan en el sitio de ataque o se acumulan sistemáticamente luego de un ataque por patógenos o herbívoros. Los elicitores bajo este criterio se pueden clasificar como endógenos y exógenos (Wang y Wu, 2013). Los elicitores endógenos se originan en la planta como resultado de su interacción con el agresor y desempeñan papeles importantes en el sistema de transducción de señales intracelulares. Entre los mejor caracterizados se encuentran los oligosacáridos pécticos, liberados de las paredes celulares de las plantas y los compuestos de señal intracelulares (o segundos mensajeros), como el ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (JA), y compuestos relacionados como el metil jasmonato (MeJA) (Ferrari, 2010) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplos de metabolitos producidos por cultivos de raíces transformadas. Modificado de Georgiev et al., 2007.

Metabolito	Cultivo de raíz pilosa	Actividad Bilógica	Referencia
Ajmalicina, ajmalina	<i>Rauvlfia micrantha</i>	Antihipertensivo	Suda et al. 2003
Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>	Antipalúdico	Weathers et al. 2005
Alcaloides de bencilisoquinolina	<i>Paper somniferum</i> <i>Eschscholzia colifornica</i> <i>Beta vulgaris</i>	Analgésico, antibiótico	Park y Facchini 2000
Betalainas	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Antioxidante, colorante	Pavlov and Bley 2006
Camptotecina	<i>Camptotheca acuminata</i>	Antitumoral	Sito et al. 2001
Glucósidos iridooides	<i>Harpogophytum procumbens</i>	Antiinflamatorio, analgésico y antidiabético	Lorence et al. 2004 Georgiev et al. 2006
3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina	<i>Stizolobium hassjoo</i>	Agente terapéutico contra enfermedad de Parkinson	Sung and Huang 2006
Rutina, hipudulina y siringina	<i>Saussurea involucrata</i>	Antiinflamatorio, antifúngico	Fu et al. 2006
Escopolamina e hiosciamina	<i>Datura innoxia</i>	Anticolinérgico	Dechaux and Boitel-Conti 2005
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Anticancerígeno	Huang et al. 1997
Tiarrubrina A	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Antifúngico, antibacteriano, antiviral	Bhagwath and Hjortso 2000
6-Metoxi-podofilotoxina	<i>Linum álbium, Linum persicum</i>	Anticancerígeno	Wink et al. 2005

La elicitación con compuestos químicos que inducen un cambio fisiológico en la planta y a partir de la cual se activan una serie de mecanismos similares a las respuestas de defensa que se desencadenan tras la infección de un patógeno o un estímulo del medio, afectando así al metabolismo de la planta y aumentando la síntesis de compuestos químicos, ha sido ampliamente utilizado en el cultivo *in vitro* (Baenas et al., 2014).

En los últimos años, se ha desarrollado una tendencia a explotar los elicitores abióticos, ya que generalmente son más baratos que sus homólogos bióticos, y la preparación de algunos elicitores bióticos requiere instalaciones adicionales para cultivar los microorganismos de origen (Giorgiev et al., 2007).

El proceso de elicitación comienza con la percepción de la señal por parte de los receptores específicos del elicitor presentes en la membrana celular de la planta, seguido por el inicio de la cascada de transducción de señales y, en última instancia, cambia el nivel de expresión de varios genes/factores de transcripción reguladores y genes limitantes en las vías de síntesis de metabolitos secundarios (Figura 3) (Halder et al., 2019).

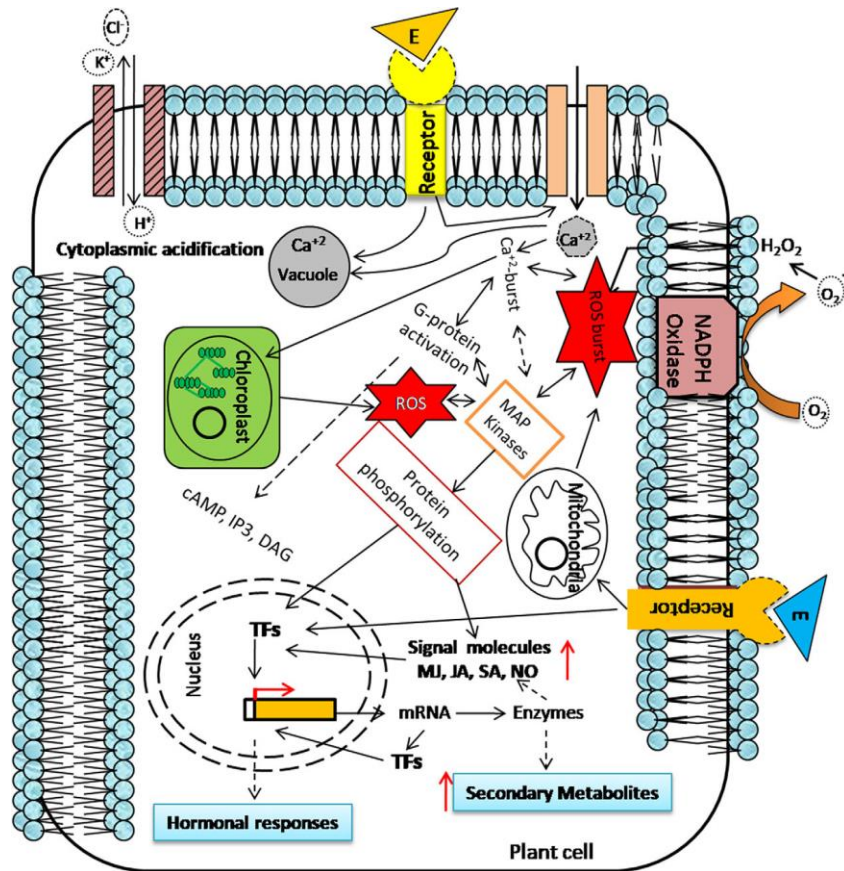


Figura 4. Representación esquemática del modo de acción del elicitor en la célula vegetal. Tomada de Halder et al., 2019.

En los últimos años, se ha observado que la obtención de raíces pilosas con el uso de elicitores conduce a una mayor producción de metabolitos secundarios y ayuda a diseñar trampas metabólicas para permitir la adsorción del producto, evitando la inhibición por retroalimentación y protegiendo a los metabolitos de la degradación en los medios de cultivo (Chandra y Chandra, 2011).

Uno de los compuestos más utilizados como elicitor es el metil jasmonato (MeJA), este compuesto y sus derivados conocidos como jasmonatos, pertenecen a la familia de los derivados de ácidos grasos oxigenados, los cuales son sintetizados por la vía del metabolismo oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados (Dar et al., 2015). Las tres vías principales de la formación de metabolitos secundarios inducidas por los jasmonatos son los terpenoides, alcaloides y fenilpropanoides, siendo estos últimos los que generan la acumulación de compuestos fenólicos.

Muchos estudios han demostrado que los jasmonatos disparan una extensa reprogramación transcripcional de metabolismo a través de un aumento de la regulación de la expresión de genes, que codifican enzimas envueltas en una ruta particular de la síntesis de metabolitos secundarios y conduciendo al reconocimiento de los llamados reguladores transcripcionales (De Geyter et al., 2012; Wasternack, 2015).

El ácido salicílico (AS) es otro de los elicitores más utilizados, éste se encuentra de manera natural en las plantas, como hormona vegetal que forma parte de un amplio grupo de compuestos denominados fenólicos y desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento y desarrollo, además de cumplir el papel de molécula señalizadora para activar mecanismos de defensa de la planta (Cano y Cano, 2014). Este compuesto media las vías de fenilpropanoide y es eficaz para desencadenar la respuesta al estrés a través de la elicitación y juega un papel importante en los procesos bioquímicos (Akhar et al., 2019).

Por su parte, el ácido giberelico (GA_3) como elicitador ha demostrado ser un potenciador de la biosíntesis de polifenoles, principalmente flavonoides y fenoles (Ahmad et al., 2020). Hooley (1994), describe las giberelinas (GA) como hormonas diterpenoides tetracíclicas esenciales para el desarrollo normal de las plantas. Son compuestos isoprenoides, específicamente diterpenos cíclicos, que se sintetizan a partir de unidades de acetato del acetyl CoA en la ruta del ácido mevalónico. Todas las GA se derivan del esqueleto *ent*giberelano, presentan 19 ó 20 átomos de C agrupados en sistemas de cuatro ó cinco anillos y un grupo carboxilo unido al C₇, esencial para su actividad biológica. En general, las GA de 19 carbonos son más activas que las de 20 carbonos. Los niveles de GA en los vegetales están regulados por mecanismos homeostáticos que incluyen cambios en la expresión de una familia de enzimas de inactivación de GA, conocidas como GA-2-oxidasas (Singh et al., 2002). Las GA cumplen un importante papel fisiológico en el desarrollo de las semillas, el desarrollo de la floración, el crecimiento del tubo polínico y la elongación de brotes y tallos. Los cambios en la concentración de la hormona y la susceptibilidad del tejido vegetal influyen en estos procesos.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las plantas han sido consideradas como una fuente importante de producción de compuestos bioactivos conocidos como metabolitos secundarios, los cuales han sido reconocidos debido a su importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica.

El sistema de cultivo de raíces pilosas utilizando el método de transformación genética vía *Agrobacterium rhizogenes* se propone como una estrategia para incrementar la acumulación de metabolitos secundarios, esto gracias a su estabilidad genética, producción de biomasa y capacidad biosintética comparable o superior a la raíz de la planta nativa. Es por ello, que al ser *D. carota* un cultivo que ha sido reconocido por la producción de compuestos con importantes actividades biológicas, se implementó este sistema como modelo para la obtención de un sistema de cultivo de raíces transformadas, y el uso de elicitores químicos para evaluar su potencial biotecnológico en la producción de compuestos antioxidantes y su efecto en la vía de biosíntesis de carotenoides.

V. HIPÓTESIS

El uso de elicitores químicos (ácido gibérelico, metil jasmonato y ácido salicílico) tiene un efecto en el contenido de compuestos fitoquímicos y en la expresión de genes de la vía de biosíntesis de carotenoides en el cultivo de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* de *Daucus carota*.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Establecer un sistema de raíces genéticamente modificadas con *A. rhizogenes* en *D. carota* para la inducción de compuestos antioxidantes y ruta de biosíntesis de carotenoides.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de tres cepas silvestres de *A. rhizogenes* para la producción de raíces pilosas en zanahoria.
2. Evaluar la condición transgénica de las raíces obtenidas mediante la amplificación por PCR de los genes *rolC*, *aux1* y *virD2*.
3. Establecer un sistema de cultivo para evaluar tres diferentes elicitores: ácido giberélico (20, 10, 5 μM), metil jasmonato (400, 800 μM) y ácido salicílico (400, 800 μM) como inductores de compuestos antioxidantes en las raíces transformadas.
4. Evaluar la expresión de los genes *PDS*, *PSY1*, *PSY2*, *LCY1*, *LCYE*, *ZEP* involucrados en la vía de biosíntesis de carotenoides en las raíces transformadas por medio de qRT-PCR.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cepa bacteriana

Para desarrollar el primer objetivo, se utilizaron las cepas de *Agrobacterium rhizogenes* ATTC15834, BV695 y A4 del cepario del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco. Las bacterias se cultivaron en medio YEB sólido que contiene 5 g/L de extracto de carne, 1 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona, 5 g/L de sacarosa, 1,5% de MgSO₄, 20 g/L de agar y 50 mg/L de rifampicina.

7.2 Extracción de ADN plasmídico

Para confirmar la presencia del plásmido Ri en las cepas de estudio, se realizó una extracción plasmídica de *Agrobacterium rhizogenes* empleando el kit “GeneJET Plasmid Miniprep”; para lo cual, se siguieron las instrucciones del fabricante creciendo las cepas de *A. rhizogenes* en medio YEB líquido con Rf (50 mg/L) durante 48 horas a 28°C, se centrifugaron las bacterias a 4500 rpm y se resuspendió el pellet en 250 µL de solución de resuspensión, se transfirió la suspensión de células a un tubo para microcentrífuga, se agregaron 250 µL de solución de lisis y se mezcló por inversión, se agregaron 350 µL de solución de neutralización y se mezcló por inversión, posteriormente se centrifugó durante cinco minutos para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosómico. Se transfirió el sobrenadante a la columna (GeneJetSpin) por decantación, se centrifugó durante un minuto y se descargó la columna, se lavó la columna agregando 500 µL de solución Wash I y se centrifugó durante 60 segundos. Se agregaron 500 µL de solución Wash a la columna y se centrifugó durante 60 segundos, este paso se repitió con 500 µL de solución Wash, se descargó el sobrenadante y se centrifugó durante un minuto para remover la solución Wash residual, adicionalmente se transfirió la columna en un tubo nuevo y se agregaron 50 µL de Buffer Elution a la membrana de la columna para eluir el DNA plasmídico, se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante dos minutos. Finalmente, se descargó la columna

y se resuspendió en 50 µL de agua inyectable. Se realizó un gel de agarosa al 1% para confirmar la obtención del ADN plasmídico.

Para confirmar la presencia de los genes *rolC*, *aux1* *virD2*, que se encuentran en el plásmido obtenido, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers específicos para los genes de interés (cuadro 2).

Cuadro 2. Primers utilizados para PCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del aplicón
<i>rolC-F</i>	5' TGTGACAACGCAGCGATGAGC 3'	487 pb,
<i>rolC-R</i>	5'GATTGCAAACCTTGGCACTCGC3'	
<i>aux1-F</i>	5'CCAAGCTTGTCAAACTTCAGGG3'	815 pb
<i>aux1-R</i>	5'CCGGATCCAATACCCAGCGCTTT3'	
<i>virD2-F</i>	5'GAGTGGGCAGCCGAGATGTT3'	145 pb
<i>virD2-R</i>	5'ATCTTCAGCCAGCCGTGTCC3'	

La reacción de PCR se programó con una temperatura de desnaturalización de 94 ° C durante tres min, seguido de 35 ciclos de 95°C durante un min, 60° C durante un min, 72°C durante un min, 72°C durante 10 min. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p / v) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

7.3 Transformación de *D. carota* mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

Para realizar la transformación genética de zanahoria, se crecieron las cepas de *A. rhizogenes* (ATCC15834, BV696, A4) en 50 mL de medio YEB líquido con rifampicina (50 mg/L) en agitación durante 24 horas. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 4500 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante, se resuspendió en MS (Murshige y Skoog) sustituyendo la sacarosa por glucosa y se ajustó la

densidad óptica a 0.6 - 0.8 a una longitud de onda de 600 nm. Las zanahorias se lavaron de dos a cuatro veces con detergente y se enjuagaron con agua común, posteriormente se sumergieron en alcohol etílico al 70% (v / v) durante 10 segundos y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 10% durante 30 minutos, se enjuagaron con agua estéril (cinco-seis veces), se flamearon superficialmente y se pelaron. Se cortaron discos de aproximadamente 0.5 cm de grosor y se colocaron en cajas Petri con papel filtro humedecido con medio MS.

La infección del material vegetal se realizó superficialmente en los discos de zanahoria con la suspensión bacteriana (cepas de *A. rhizogenes* ATCC15834, BV696, A4) en medio MS adicionado con acetosiringona 100 mM y se mantuvieron en co-cultivo durante 48 horas a 24°C en oscuridad.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, para la infección *Agrobacterium rhizogenes*, los discos co-cultivados se lavaron tres veces con medio MS con agitación suave y posteriormente se colocaron en medio MS líquido con antibiótico (cefotaxima a 500 mg/L), en agitación continua a 28°C por 30 minutos. Posteriormente, los discos de zanahoria se colocaron en medio MS sólido y se incubaron en oscuridad durante dos a tres semanas, hasta la aparición de raíces.

7.4 Confirmación de transformación genética de raíces pilosas por PCR

Para confirmar que las raíces obtenidas después del periodo de incubación se hayan transformado, se tomó 1 gramo de raíz de zanahoria putativamente transformada y se realizó la extracción de ADN por medio del método de CTAB descrito por Doyle y Doyle (1990). Posteriormente, se realizó una PCR del DNA obtenido con los primers específicos para el gen *aux1* (815 pb) y el gen *rolC* (487 pb). El plásmido Ri de la cepa ATCC15834 de *A. rhizogenes* se utilizó como control positivo y la secuencia del primer específico del gen *virD* (477 bp) presentes en la región de virulencia no transferida del plásmido Ri de *A. rhizogenes* como control negativo para asegurar que el tejido de las raíces transformadas se encuentre libre de células bacterianas. Para llevar a cabo la reacción de PCR se emplearon 50 ng de ADN genómico, 0.2 mM de dNTPs, 1.0 U de Taq ADN polimerasa, 1.0 µM de

cada cebador y 2.5 μL de amortiguador 10 \times Taq ADN polimerasa en un total de 25 μL de reacción, utilizando un termociclador (Rcorbett Research, CG1-96). Emplénadose un programa de desnaturalización inicial a 94 ° C durante cuatro min, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 60 s, 58 °C durante 60 s y 72 °C durante un min. Los productos obtenidos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p / v) y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio.

7.5 Estudio de elicitación

Se utilizó ácido giberélico (GA_3) (SIGMA), metil jasmonato (MeJA) (SIGMA) y ácido salicílico (AS) (SIGMA) para la elicitación de las raíces pilosas. Cada uno de los elicitories se disolvieron en etanol (100%) y fueron filtrados a través de un filtro estéril (MILLIPORE, type GVUP, 0.22 μm). Se utilizaron raíces pilosas de un mes de edad, a las cuales se añadieron GA_3 , MeJA y AS al medio MS en cajas Petri en concentraciones finales de 5, 10 y 20 μM para GA_3 , 400 y 800 μM para MeJA y AS. Utilizando como control raíces pilosas en medio MS con etanol (100%). Se mantuvieron durante 30 días bajo tratamiento a 26 °C en oscuridad.

7.6 Determinación de compuestos fitoquímicos

7.6.1 Preparación de extractos de raíz pilosa

Para la obtención de extractos de las raíces pilosas en los distintos tratamientos de elicitación, se utilizó en método de extracción descrito por Srivastava et al. (2014), pesando 0.5 g de raíz transformada y macerados perfectamente con la ayuda de un molidor de tejidos (Tissue grinder), con 5 mL de metanol al 60%. La muestra se sónico durante 15 minutos y se dejó reposar durante 24 horas, posteriormente las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 10,000 rpm y se colectó el sobrenadante para ser utilizado posteriormente, conservándose a una temperatura de 26 °C en oscuridad.

7.6.2 Determinación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Añibarro-Ortega *et al.* (2020), con modificaciones. Se preparó una solución de ácido gálico de 200 µg/mL (2 mg de ácido gálico + 10 mL de agua destilada); se preparó una solución stock de carbonato de sodio al 7% (1.4 g de carbonato de sodio + 18.6 mL de agua destilada) y se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu al 1 N (SIGMA). A partir de la solución patrón de 200 µg/mL de ácido gálico (en tubos eppendorf protegidos de la luz) se realizó una curva estándar empleando las siguientes concentraciones de ácido gálico (diluciones en agua destilada) (cuadro 3).

Cuadro 3. Concentraciones de la curva estándar de ácido gálico. Determinación de fenoles totales.

Stock (µL)	Agua destilada (µL)	[µg/mL]
1000	0	200
875	125	175
750	250	150
625	375	125
500	500	100
250	750	50
50	950	10
0	1000	0

Para la curva estándar de ácido gálico se tomaron 50 µL de cada dilución, se agregaron 425 µL de agua destilada y 125 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N; se agitó y dejó reposar durante tres minutos, posteriormente se agregó un mililitro de la solución de Na₂CO₃ al 7% e incubó por 15 minutos a 45°C. Se preparó un blanco con todos los componentes excepto la solución de ácido gálico y las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 760 nm con un equipo Thermo Scientific

Multiskan GO. Las muestras problema se analizaron por triplicado mediante el mismo procedimiento anterior sustituyendo el ácido gálico por la muestra de estudio. La concentración de fenoles totales en las muestras se realizó con base a la ecuación de la recta despejando “x” y tomando “y” los valores de las absorbancias obtenidas de cada muestra. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de peso fresco de muestra.

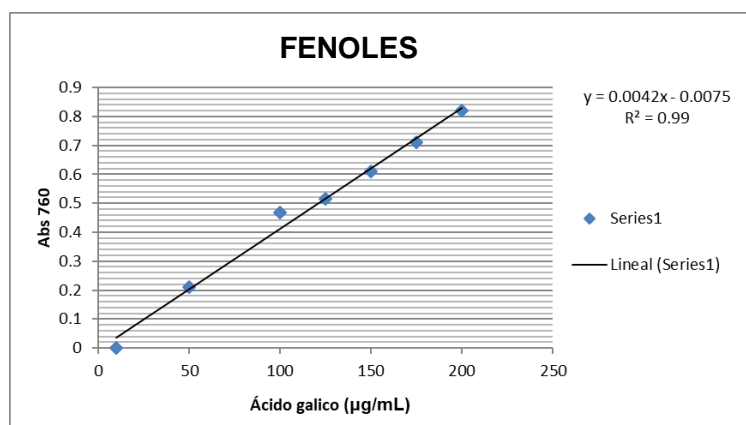


Figura 5. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales.

7.6.3 Determinación de flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Chang *et al.* (2002), con modificaciones. Previamente se realizó una curva de calibración empleando una solución de 1000 µg/mL de quercetina (10 mg de quercetina + 10 mL de metanol al 80%). Se pesó 1 g de cloruro de aluminio al 10% (p/v), y se preparó una solución de acetato de potasio 1 M haciendo un stock de 10 mL (0.981 g de acetato de aluminio), por último, una solución de metanol al 80%. A partir de la solución patrón de quercetina (1000 µg/mL), se realizaron las diluciones para obtener las siguientes concentraciones (cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones de la curva estándar de quercetina para la determinación de flavonoides totales.

Stock (μL)	Metanol 80% (μL)	[μg/mL]
100	900	10
70	930	7
50	950	5
30	970	3
20	980	2
10	990	1
0	1000	0

Para la cuantificación de flavonoides totales de las muestras, se tomaron 100 μL de cada extracto, después se le agregaron 300 μL de metanol al 80%, 20 μL de cloruro de aluminio al 10%, 20 μL de acetato de potasio 1M y 560 μL de agua destilada. La mezcla se agitó vigorosamente y permaneció 30 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a una λ 415 nm con un equipo Thermo Scientific Multiskan GO. Los resultados se expresaron en μg equivalentes de quercetina por gramo de peso fresco de muestra con base a la curva estándar de quercetina (Figura 6).

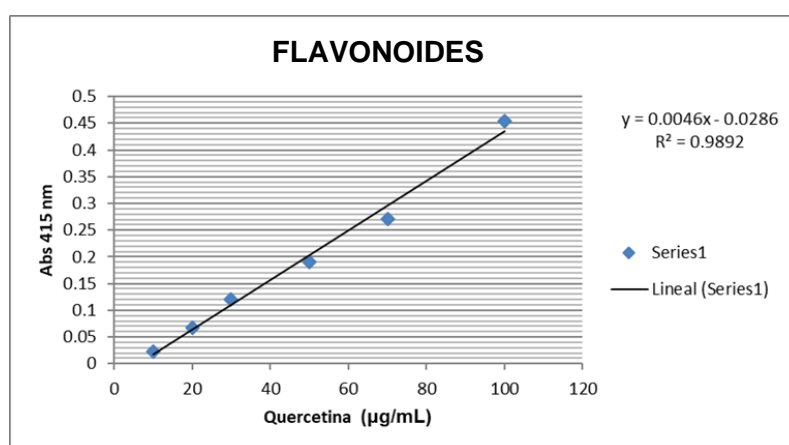


Figura 6. Curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales.

7.6.4 Capacidad antioxidante por el método de DPPH

Se realizó la determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH (2-2 Difenil-p-picrylhydrazilo) de acuerdo a Brand (1995). Este método permite conocer la actividad antioxidante de diferentes muestras contra el radical OH^\cdot . Esta técnica consiste en crear el radical DPPH al hacer reaccionar una cantidad conocida de 2-2 Difenil-p-picrylhydrazilo, obteniéndose una coloración morado intenso (oxidado), que al agregar el antioxidante cambia a amarillo (reducido).

Se realizó una curva de calibración utilizando Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico); 2.5 mg diluido en 10 mL de metanol al 80% (Stock 1000 μM) a partir del cual se realizaron diluciones para obtener las siguientes concentraciones (cuadro 5). Para obtener la solución del radical DPPH se pesó 7.886 mg disuelto en 50 mL de metanol al 80%.

Cuadro 5. Concentraciones de la curva estándar de Trolox. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH.

Stock (μL)	Metanol 80% (μL)	[$\mu\text{g/mL}$]
0	1000	0
50	950	50
100	900	100
200	800	200
400	600	400
600	400	600
800	200	800
1000	0	1000

Para obtener la curva de calibración, se realizó una primera lectura inicial (Abs inicial) a 505 nm con 180 μL del radical DPPH, hasta ajustar la absorbancia a 1.2; posteriormente se agregaron 20 μL de cada una de las diluciones de Trolox y se dejaron reposar las mezclas durante 30 minutos; posteriormente se realizó una segunda lectura para obtener la absorbancia final. Para la determinación de la capacidad antioxidante en las muestras se sustituyeron los 20 μL de Trolox por la muestra de interés. Los resultados se expresaron en micromolar equivalente de Trolox por gramo de peso fresco de muestra.

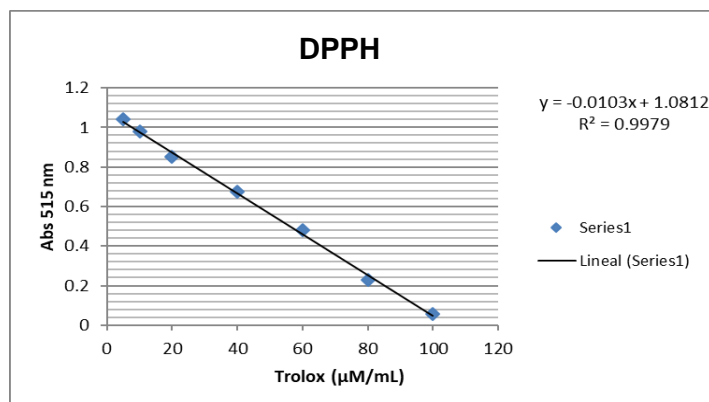


Figura 7. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.

7.6.5 Capacidad antioxidante por el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Capacity)

Otra manera de determinar la capacidad antioxidante que tiene una muestra de interés, es mediante dicha determinación por el método FRAP. El ensayo se basa en la reducción del catión férrico (Fe^{+3}) a ferroso (Fe^{+2}) en pH ácido. El complejo férrico 2, 4, 6 tripiridril-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado azul intenso, medible espectrofotométricamente a 593 nm.

Para realizar dicha determinación, se preparó una curva de calibración a partir de una muestra concentrada de FeSO_4 . 40 mM, de acuerdo con Benzie (1999) (cuadro 6). Se utilizó un buffer de acetato (pH 3.6) 300 mM, 10 mM de TPZT en HCl 40 mM y 20 mM de solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La solución de trabajo (FRAP) se preparó mezclando 50 mL de buffer de acetato, 5 mL de TPTZ y 5 mL de solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Cuadro 6. Concentraciones de la curva estándar de FeSO₄. Determinación de capacidad antioxidante por el método FRAP.

Stock (μL)	Agua destilada (μL)	[μM/mL]
0	1000	0
25	975	0.1
100	900	0.9
200	800	0.8
375	625	1.5
500	500	2
625	375	2.5
750	250	3
1000	0	4

Para obtener las absorbancias de la curva de calibración, se añadieron 250 μL de la solución FRAP a cada pocillo de una placa de plástico de 96 pozos y se incubó por 10 minutos; a continuación, rápidamente se tomaron 40 μL de la solución patrón FeSO₄, se agitó la mezcla por cuatro minutos y finalmente se midió la absorbancia a 593 nm. Los resultados se expresaron en micromol equivalente de FeSO₄ por gramo de peso fresco (Figura 8).

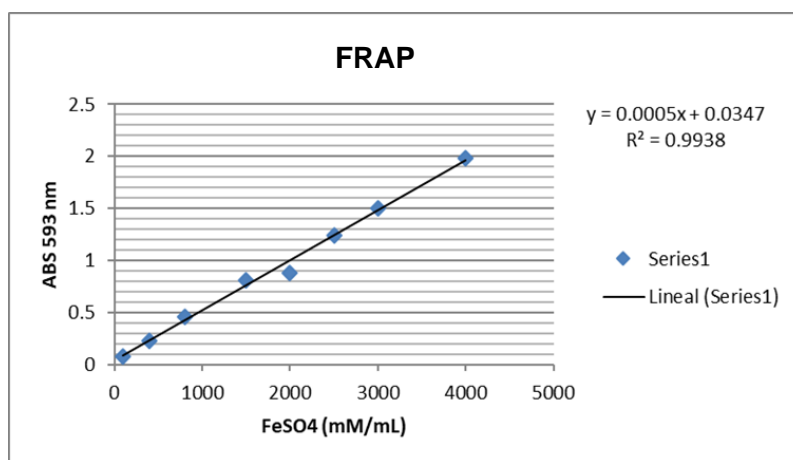


Figura 8. Curva de calibración de FeSO₄ para la determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.

7.7 Determinación de la concentración de carotenoides

7.7.1 Extracción de carotenoides a partir de raíz pilosa

Para la extracción de carotenoides se obtuvieron 200 mg de raíz y el tejido colectado fue macerado en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Posteriormente se agregaron 4 mL de una solución de hexano: acetona: etanol (2:1:1) hasta obtener una mezcla homogénea, la cual se colocó en un tubo de plástico de 15 mL y se agitó vigorosamente durante dos minutos; posteriormente la mezcla se dejó reposar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, las muestras se resuspendieron en 1 mL de acetona. Todo el proceso de extracción de carotenoides fue realizado con la menor cantidad de luz posible y manteniendo las muestras siempre en hielo.

7.7.2 Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría

Para determinar la concentración de carotenoides presentes en las muestras de interés, se midió la absorbancia a distintas longitudes de onda: 474 nm (absorción de carotenoides principalmente) y 645/662 nm (absorción de las clorofilas *a* y *b* (Figura 9).

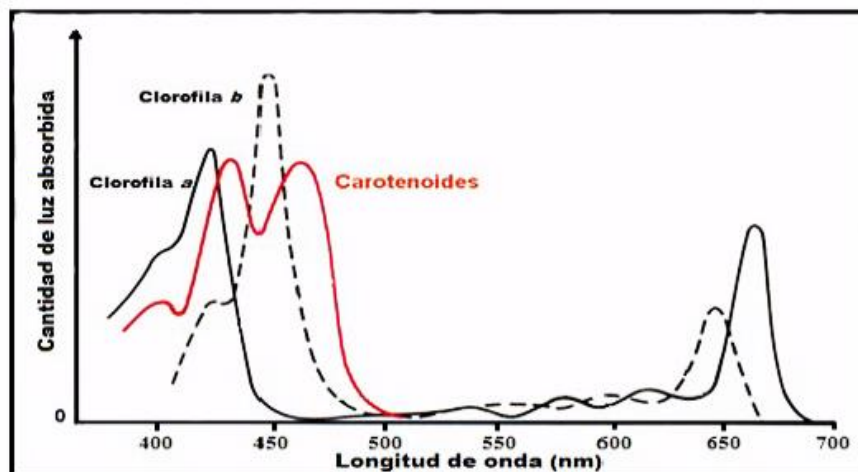


Figura 9. Espectro de absorción de los pigmentos clorofila *a*, *b* y carotenoides.

Las expresiones utilizadas para determinar las concentraciones de carotenoides totales fueron descritas anteriormente por Lichtenthaler y Buschmann (2001). Todas las mediciones se realizaron en una celda de cuarzo utilizando el espectrofotómetro (PerkinElmer, lambda XLS) Los datos obtenidos fueron expresados en mg/g de peso seco. Con las mediciones de absorbancia, se determinó la concentración de clorofila a (*Ca*), clorofila b (*Cb*) y carotenoides totales (*Ct*) mediante las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann (2001), en donde la concentración de los pigmentos queda expresada como µg/mL de extracto. Mediante las siguientes ecuaciones:

$$Ca \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 11,24 \times A_{662} - 2,04 \times A_{645}$$

$$Cb \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = 20,13 \times A_{645} - 4,19 \times A_{662}$$

$$Ct \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{1000 \times A_{470} - 1,9 \times Ca - 63,14 \times Cb}{214}$$

7.8 Tratamientos de elicitación para evaluación de expresión de genes de biosíntesis de carotenoides

Se prepararon soluciones stock de Metil Jasmonato (MeJA) y Ácido Giberelico (GA₃), en etanol. La solución de cada elicitor se esterilizó por filtración y posteriormente se adicionó (400 y 20 µM) a cada matraz individual que contenía 30 mL de medio mínimo para raíz (MM, adicionado con KNO₃, MgSO₄, KCl, KH₂PO₄) con raíces de 10 días de cultivo. Los tratamientos se realizaron por triplicado. Por último, todos los matraces tratados y los matraces control (el control recibió un volumen igual de etanol) se incubaron en oscuridad durante 24 horas.

7.9 Extracción de ARN de raíces pilosas elicitadas

La extracción de ARN se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, empleando el kit de extracción Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research). Para

realizar este procedimiento, se tomó 1 g de muestra de raíz de cada tratamiento y se molió con nitrógeno líquido, posteriormente el tejido se colocó en un microtubo estéril y se homogenizó con 600 μ L de TRIzol; la muestra se mezcló en vortex y se centrifugó para remover partículas de gran tamaño, transfiriéndose 500 μ L del sobrenadante a un microtubo nuevo. Posteriormente se agregó 500 μ L de etanol (95-100%) al sobrenadante, se mezcló y se transfirió a una columna Zymo-Spin IIC, se centrifugó durante un min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se colocaron 80 μ L de DNasa I a cada columna y se dejó incubar a temperatura ambiente por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 400 μ L de Direct-zol RNA PreWash a la columna y se centrifugó. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior. Posteriormente se agregaron 700 μ L de una solución RNA Wash Buffer a la columna y se centrifugó durante dos minutos para remover completamente el líquido de la columna. Se transfirió la columna cuidadosamente a un tubo nuevo libre de RNasas y finalmente para eluir el RNA se agregaron 25 μ L de agua libre de DNasa/RNasa directamente a la columna, la cual una vez colocada en el tubo colector se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto para obtener el RNA en el microtubo.

7.10 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Thermo Fisher Scientific). Se preparó el mix RT 2X, con los componentes necesarios para el número de reacciones requeridas (Cuadro 7), utilizando el RNA extraído previamente de las muestras de raíz.

Cuadro 7. Componentes y volúmenes utilizados para la síntesis de cDNA

Componentes	Volumen / Reacción (µL)
10 X RT Buffer	2.0
25 X dNTP Mix (100 Mm)	0.8
10 X RT Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
Nuclease- Free H2O	4.2
Total por reacción	10.0

Posteriormente, se prepararon en tubos individuales las reacciones de cDNA RT, utilizando 10 µL de mix 2X RT y 10 µL (1 µg/ µL) de muestra de ARN. Posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador para realizar la transcripción inversa, siguiendo los siguientes pasos (cuadro 8).

Cuadro 8. Temperaturas de síntesis de cDNA

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 min	Indefinido

7.11 Expresión de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides por medio de PCR tiempo real (qRT-PCR)

Los genes de la ruta de biosíntesis de carotenos a los cuales se evaluó su expresión en las raíces pilosas bajo los tratamientos con los elicitores fueron *PDS*, *PSY1*, *PSY2*, *LCBY1*, *LCYE*, *ZEP*, emplenados *Actina* como el gen de referencia.

La expresión relativa de los genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides se evaluó a las 24 horas después del tratamiento con Ácido Giberelico (GA₃) y Metil Jasmonato (MeJA). Para la PCR en tiempo real (qRT- PCR).

Los niveles de expresión fueron calculados empleando la siguiente ecuación:

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde: $\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ gen blanco} - Ct \text{ promedio de los genes de referencia})$ tratamiento - $(Ct \text{ gen blanco} - Ct \text{ promedio de los genes de referencia})$ control.

Los niveles de transcripción de genes biosintéticos de carotenoides en condiciones de elicitación se compararon en relación con la condición de control después de la elicitación, que se eligió como condición de referencia.

7.12. Regeneración de plantas a partir de raíces pilosas

Para la inducción de callos y brotes, las raíces pilosas se cortaron en segmentos de dos a tres cm de largo y se transfirieron a medio MS sólido, al cual se adicionaron distintas combinaciones de concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y de ácido naftalencacético (ANA), obteniendo cuatro tratamientos de regeneración de brotes con cinco repeticiones cada uno de ellos: tratamiento uno (0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA), tratamiento dos (0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L ANA), tratamiento tres (1.0 mg/L BAP + 0.1 ANA) y tratamiento cuatro (1.0 mg/L BAP + 0.2 ANA). Una vez establecidos los tratamientos, se mantuvieron a 25°C en un fotoperiodo 16 h, durante 30 días.

Posteriormente, los brotes adventicios se individualizaron y se transfirieron a medio MS sólido sin hormonas para la inducción de raíces.

7.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de ANOVA de una sola vía y prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) mediante el software MINITAB versión 17. Los análisis realizados (Mapa de correlación de Pearson, Heatmap y PCA), se realizaron mediante el software RStudio 4.1.2.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Extracción de ADN plasmídico y confirmación de genes de virulencia

De acuerdo con lo descrito en la metodología, se obtuvo el ADN plasmídico de tres cepas silvestres de *Agrobacterium rhizogenes* (ATCC15834, BV696, A4) (Figura 10).

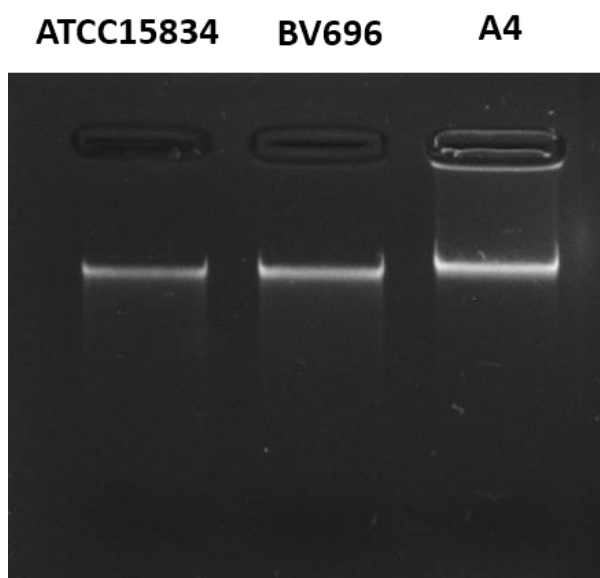


Figura 10. ADN plasmídico de cepas de ATCC15834, BV696, A4 de *Agrobacterium rhizogenes*. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Se verificó la existencia de los genes *rolC*, *aux1* y los genes de virulencia *virD* y *virD2* por medio de PCR, la cual mostró amplificones de 487 pb (*rol C*), 815 pb (*Aux1*) y 145 (*virD2*) pb, en cada una de las cepas (Figura 11).

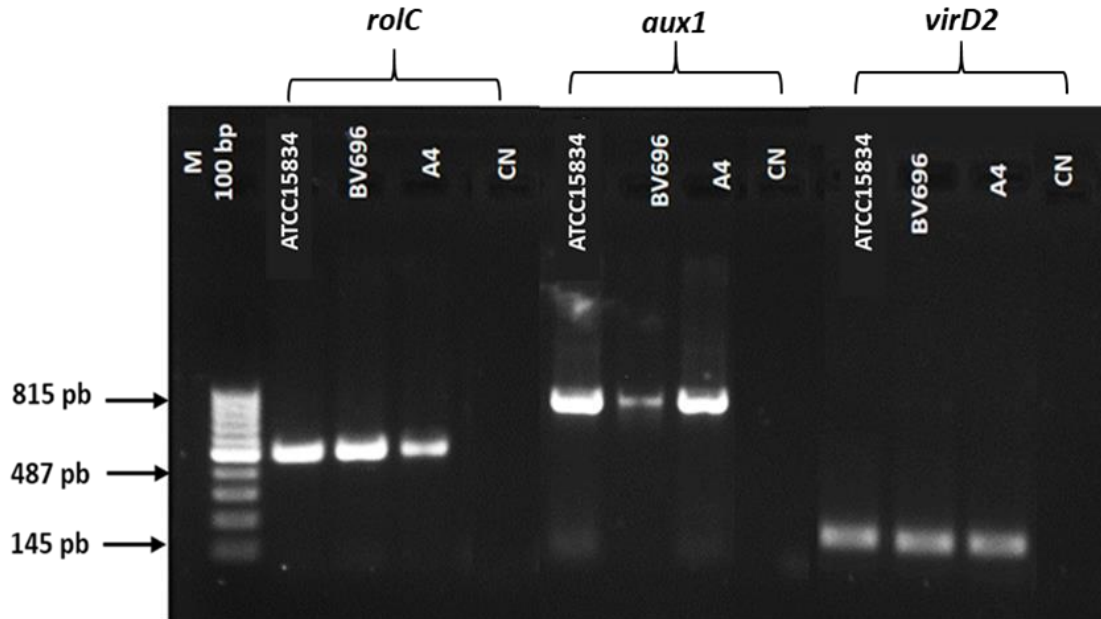


Figura 11. Amplificación por PCR de genes *rolC*, *aux1*, *virD2* de las cepas de *A. rhizogenes* ATCC15834, BV696, A4. Carril 1) M: Marcador de peso molecular (100 bp) marca Thermoscientific; CN: Control Negativo. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

8.2 Transformación genética de *D. carota* con *A. rhizogenes*

El proceso de transformación se realizó en discos de zanahoria infectando la superficie con las suspensiones bacterianas de las cepas de *A. rhizogenes*. La aparición de raíces se observó en los discos de zanahoria inoculados con la cepa de ATCC15834 transcurrido un periodo de 30 días después de la infección. Las raíces generadas se colocaron en medio mínimo (MM) para su crecimiento y se pudo observar el fenotipo característico de raíz pilosa con crecimiento plagiotrópico y acelerado en el medio de cultivo.

La verificación de la naturaleza transgénica de las raíces pilosas se realizó por amplificación de los genes *rolB*, *aux1* y *virD* por medio de PCR, la cual mostró que las raíces contenían el gen *rolB* y *aux1*, el ADN de la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834 fue utilizado como control positivo para dicha prueba (Figura 12).

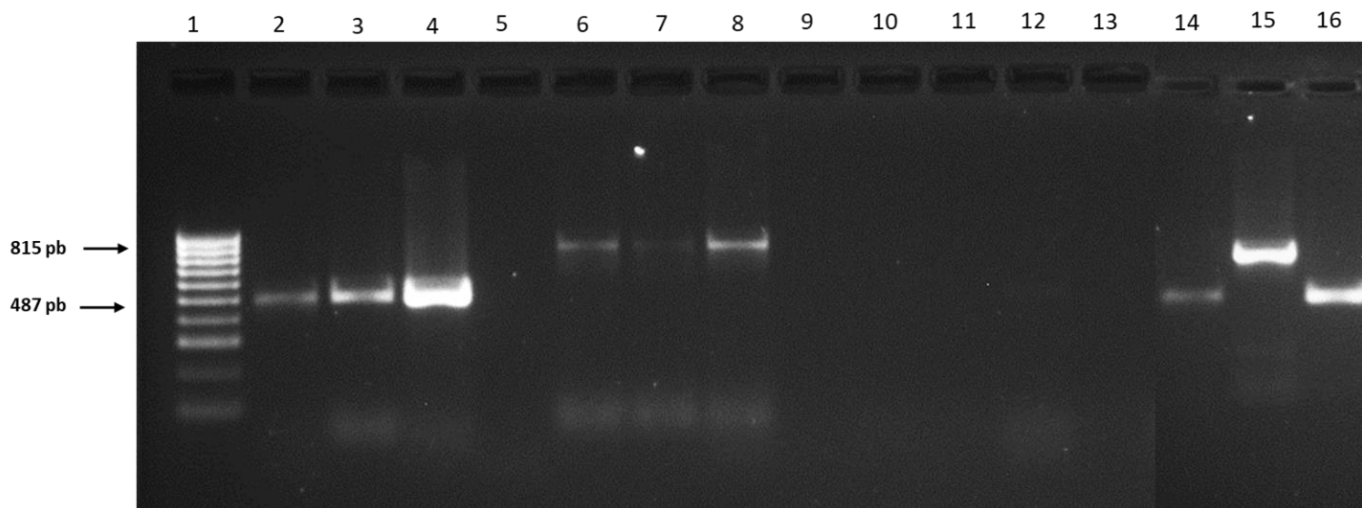


Figura 12. Amplificación por PCR de los genes *rolC*, *aux1* y *virD* a partir de raíces de zanahoria transformadas con *A. rhizogenes* ATCC 15834. Carril 1: Marcador de peso molecular (1000 pb Thermo Scientific). Carriles 2-4: Raíces transformadas con la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834 con presencia del gen *rolC*, Carril 5: Control negativo gen *rolC*, Carril 6-8: Raíces transformadas con la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834 con presencia del gen *aux1*, Carril 6: Control negativo gen *aux1*, Carriles 9-12: Raíces transformadas con la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834 ausencia del gen *virD2*, Carril 13: Control negativo gen *virD2*, Carril 14: Control positivo, DNA de la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834 con presencia del gen *rolC*, Carril 15: Control positivo, DNA de la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834 con presencia del gen *aux1* y Carril 16: Control positivo, DNA de la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834 con presencia del gen *virD*.

8.3 Efecto de elicitores en cultivos de raíces pilosas de *D. carota*

El efecto de las diferentes concentraciones de (GA₃), MeJA y AS en las raíces pilosas de *D. carota*, se muestra en la figura 13. Los cultivos de raíces pilosas son un sistema prometedor para la producción de valiosos metabolitos secundarios como productos farmacéuticos, pigmentos y sabores en muchas plantas (Srivastava y Srisvastava, 2007). En el presente trabajo se analizaron los contenidos de fenoles totales, flavonoides totales y antioxidantes por medio de diferentes pruebas como FRAP y DPPH (Cuadro 9).

Se observó que las raíces pilosas elicidadas con GA₃, MeJA y AS, podrían inducir de manera prominente la acumulación de fenoles y flavonoides totales.

En los resultados obtenidos en la evaluación del contenido de flavonoides totales, se pudo observar que el elicitor GA₃ empleado a una concentración de 20 µM fue el más efectivo para la producción de flavonoides, mostrando una diferencia significativamente mayor con 179.17 mg QCE/g p.f, en comparación con el tratamiento control (1.44 mg Eq de QCE/g de p.f) (Figura 14). En cuanto al efecto de MeJA, se observó un resultado favorable con la concentración de 400 µM alcanzando un contenido de flavonoides de 58 mg QCE/g p.f. De la misma manera el tratamiento con AS 800 µM (35.91 mg Eq de QCE/g de p.f) mostró una diferencia significativa en el contenido de estos metabolitos con respecto al tratamiento control, mientras que usando AS a una concentración menor (400 µM) no arrojó diferencia alguna contra el tratamiento control.

Resultados similares fueron reportados por Ahmad et al., (2020) en extractos de raíces de *Stevia rebaudiana*, quienes con una concentración de 2.0 mg/L de GA₃ como elicitor, obtuvieron la máxima concentración de flavonoides. Amani et al., (2019) reportaron que al aumentar la concentración y el tiempo de exposición a MeJA observaron la reducción del contenido de flavonoides en raíces pilosas de *F. carica*. En cuanto al efecto de AS como inductor de estos compuestos, nuestros resultados difieren con lo reportado por Chung et al., (2016), quienes observaron diferencias significativas en el contenido de flavonoides en raíces pilosas de *M. charantia* al aumentar las concentraciones de AS en el cultivo.

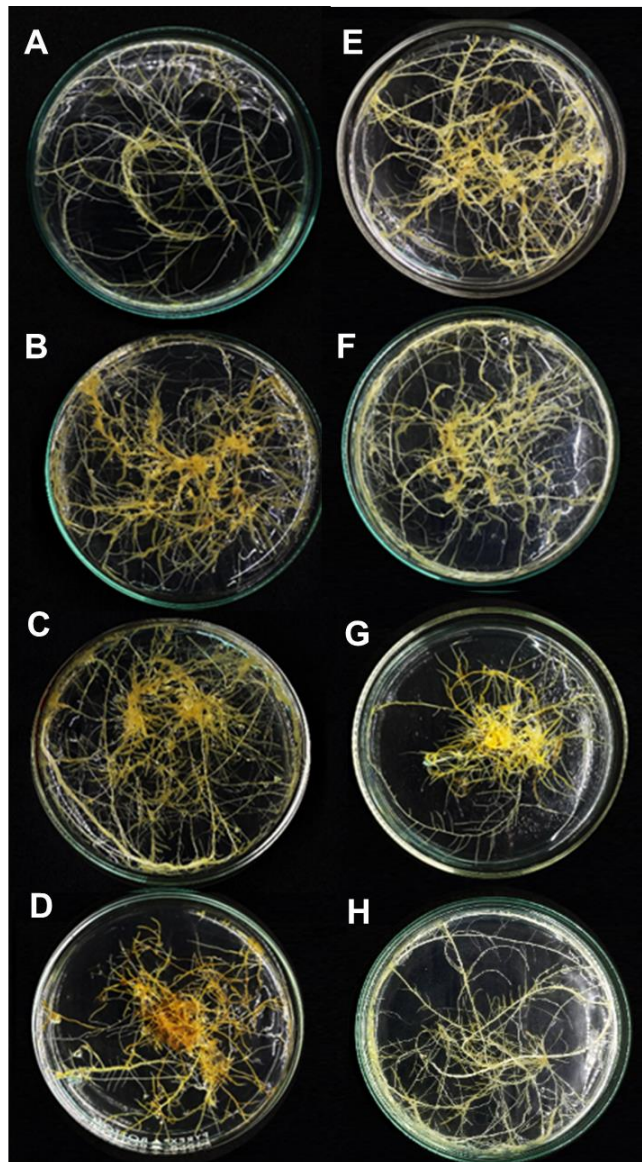


Figura 13. Raíces pilosas de *D. carota* elicidadas con diferentes tratamientos. A) Control; B) GA₃ 20 μ M; C) GA₃ 10 μ M; D) GA₃ 5 μ M; E) MeJA 400 μ M; F) MeJA 800 μ M; G) AS 400 μ M; H) AS 800 μ M.

FLAVONOIDES TOTALES

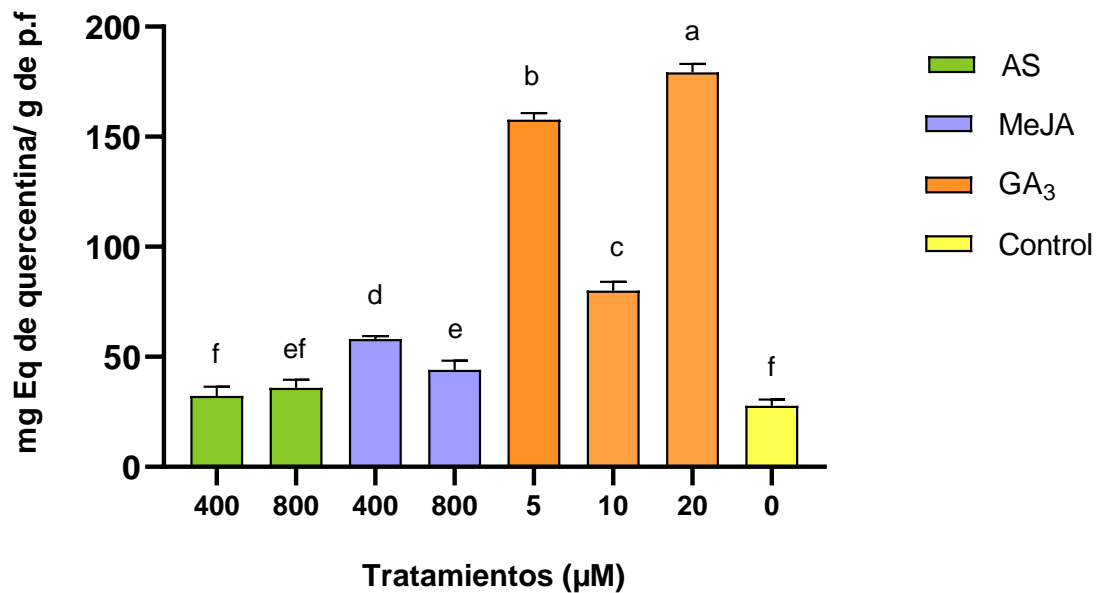


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃, MeJA y AS en el contenido de flavonoides totales en raíces pilosas de *D. carota*. Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí según ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

En cuanto al contenido de fenoles, se observó que las raíces tratadas con 5 y 10 μM de GA₃ dieron como resultado un contenido total de 2.11 y 2.56 mg Eq de GAE/g de p.f respectivamente, sin embargo, la concentración más alta evaluada de GA₃ (20 μM) demostró ser la más eficaz en la biosíntesis de compuestos fenólicos (3.8 mg Eq de GAE/g de p.f), resultados significativamente mayores a los obtenidos en las raíces control no elicitadas (0.27 mg Eq de GAE/g de p.f) (Figura 15). Por su parte, la concentración de 400 μM de MeJA mostró valores similares a los obtenidos con la concentración más baja de GA₃, con 2.27 mg Eq de GAE/g de p.f, reduciendo el contenido de fenoles al aumentar la concentración de este elicitador. A su vez, el tratamiento con AS no mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento control.

Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que se usó GA₃ para mejorar la biosíntesis de compuestos fenólicos como el ácido cafeico y taninos en cultivos

de raíces pilosas de *S. miltorrhiza* y *E. purpurea*, respectivamente (Abbasi et al., 2012; Yuan et al., 2008). Resultados similares fueron reportados por Ahmad et al. (2020) con respecto al efecto de GA₃ como elicitador en raíces, quienes realizaron un estudio con tres concentraciones de GA₃, en donde observaron que a 2.0 y 0.5 mg/L de GA₃ se estimula la producción de compuestos fenólicos mientras que con una concentración de 1.0 mg/L se inhibe la biosíntesis de fenoles.

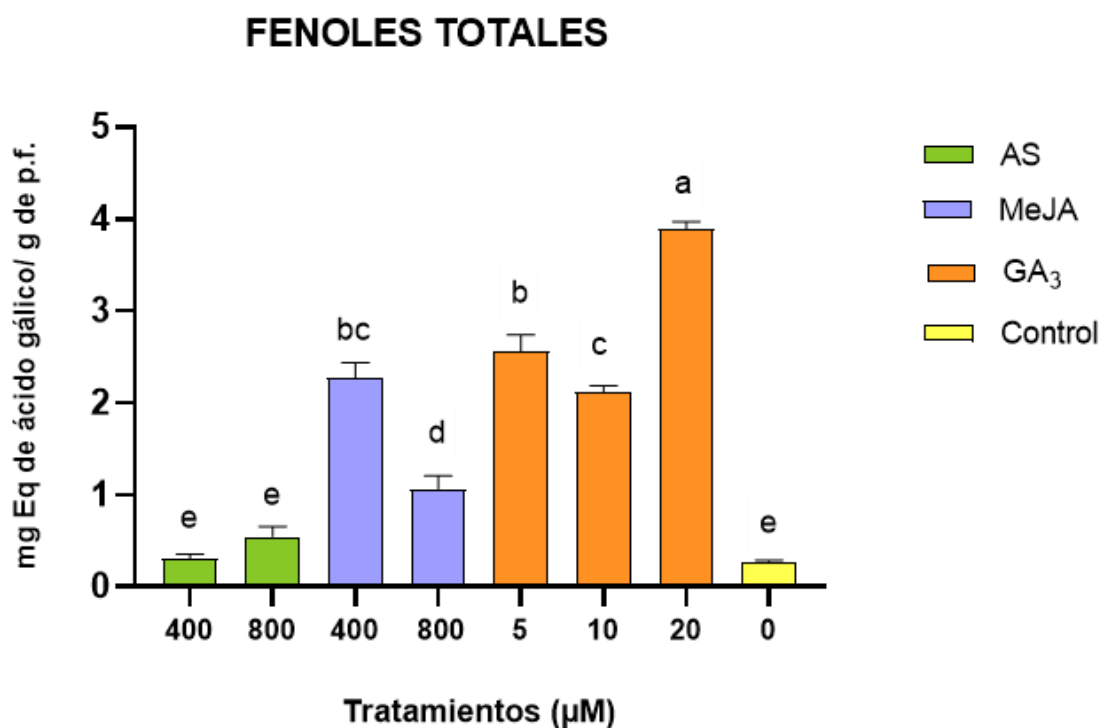


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃, MeJA y AS en el contenido de fenoles totales en raíces pilosas de *D. carota*. Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí según ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

Se analizó el potencial antioxidante de las raíces pilosas tratadas con los elicitores a través de la actividad de eliminación de radicales libres basado en el método DPPH y FRAP. La mayoría de las concentraciones de elicitores evaluadas mostraron una inducción en la capacidad de las raíces para producir compuestos que inhiban la actividad de los diferentes radicales libres empleados por las dos técnicas, lo cual se expresó con diferencias significativas entre cada una de las

concentraciones de elicitors evaluadas con respecto al tratamiento control no tratado de acuerdo a la diferencia de medias de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

En la figura 16, se observa la alta actividad antioxidante que mostraron las raíces tratadas con GA₃ (20 µM) con 667.64 µM TEAC/ g de p.f, valores significativamente mayores a los obtenidos con las raíces control (170.42 µM TEAC/ g de p.f.) al evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de raíz para actuar como eliminadores del radical libre DPPH.

Con valores menores a los obtenidos con GA₃, los tratamientos con MeJA y AS en ambas de sus concentraciones también mostraron un efecto favorable en la acumulación de compuestos antioxidantes en las raíces mostrando valores significativamente mayores a los obtenidos en el tratamiento control.

Los niveles de fenoles y flavonoides totales fueron significativamente mayores en GA₃ 20 µM por lo que se atribuye que esos resultados influyen directamente en el potencial antioxidante. Ahmad et al., (2020) reportó que la actividad de inhibición de los radicales para DPPH era mayor al aumentar la concentración de GA₃ en raíces de *S. rebaudiana*.

Los efectos de MeJA como inductor de compuestos antioxidantes han sido reportados en otras especies de raíces, nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Amani et al., (2020), quienes al evaluar la capacidad antioxidante por el método DPPH en raíces pilosas de *F. carica*, obtuvieron una mayor capacidad antioxidante al aumentar la concentración de MeJA (300 µM).

En el ensayo antioxidante FRAP, donde el poder reductor de las raíces pilosas de *D. carota*, se determinó midiendo la reducción de Fe³⁺ a Fe²⁺, se pudo observar que el efecto de los elicitors fue similar a los expresados en el ensayo con DPPH.

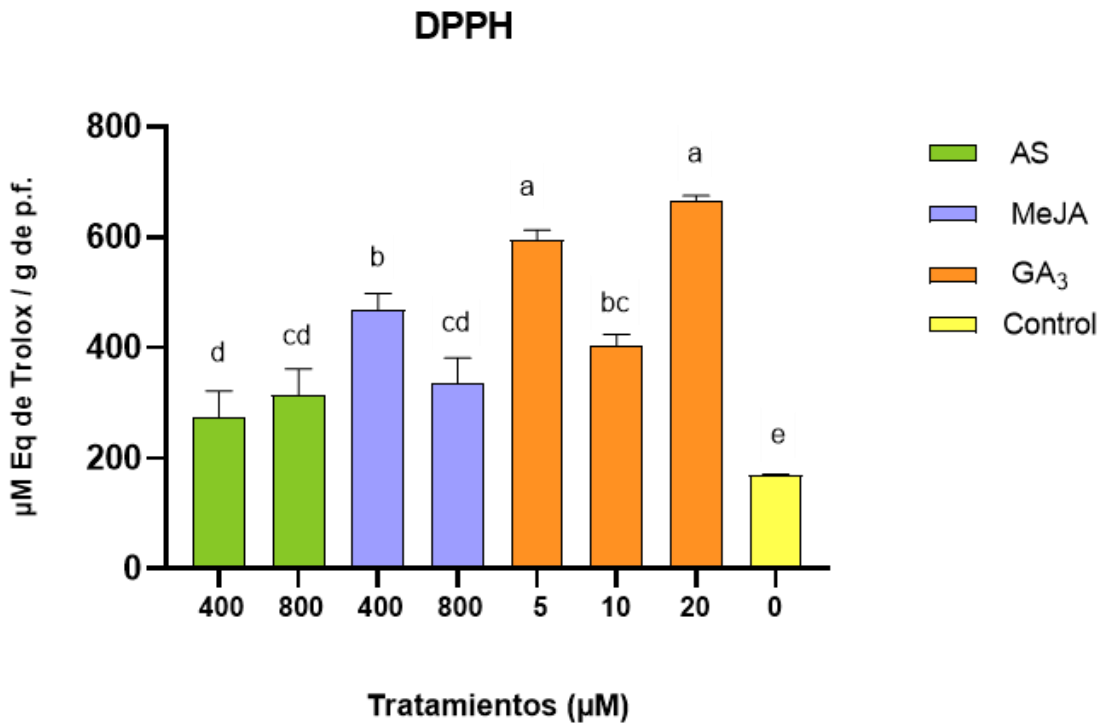


Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃, MeJA y AS en el contenido de antioxidantes mediante el método DPPH en raíces pilosas de *D. carota*. Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí según ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

El poder reductor más bajo se detectó en los extractos de las raíces control con 53.8 mM Eq de FeSO₄/ g de p.f, mientras que las raíces tratadas con GA₃ a 20 µM tuvieron el mayor poder reductor con 133.90 mM de FeSO₄/ g de p.f (Figura 17).

Con valores menores, pero aun significativamente diferentes con respecto al control, los tratamientos con MeJA y AS mostraron un efecto favorable en la producción de compuestos antioxidantes.

Si bien, se observó un efecto favorable en la acumulación de antioxidantes con todas las concentraciones de los elicitores evaluados en ambas pruebas, nuestros resultados concuerdan con Amani et al., (2020), quienes reportaron que todas las muestras de raíces pilosas de *F. carica* tratadas con diferentes concentraciones de MeJA exhibieron menor eficacia en la eliminación del radical DPPH en comparación con el ensayo antioxidante FRAP (Cuadro 9).

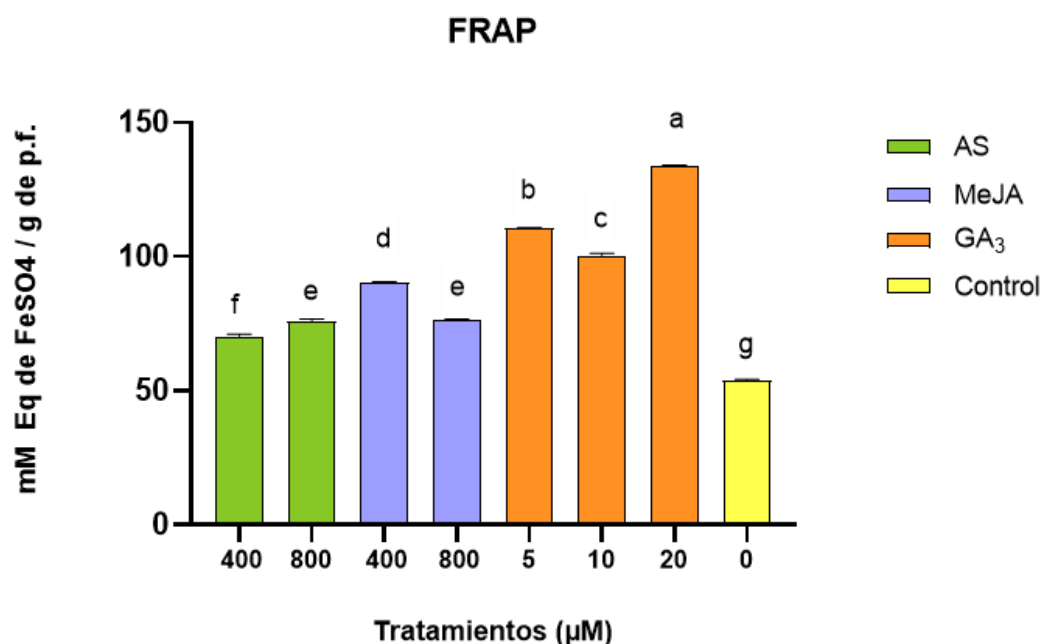


Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃, MeJA y AS en el contenido de antioxidantes mediante el método FRAP en raíces pilosas de *D. carota*. Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí según ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

En numerosos estudios, el efecto benéfico para la salud de *D. carota* ha sido atribuido sus metabolitos secundarios, principalmente a sus compuestos fenólicos, incluyendo antocianinas, vitamina C y poliacilénos, así como a su gran contenido de compuestos carotenoides (Ergun y Susluoglu, 2018).

En los últimos años, el sistema de cultivo de raíces pilosas mediado por *A. rhizogenes* ha sido conocido por ser un prometedor biocatalizador para la producción de metabolitos secundarios. Los resultados encontrados en este trabajo confirman la hipótesis de que la transformación de las plantas brinda una mayor biosíntesis de compuestos fitoquímicos, como compuestos fenólicos y flavonoides en las raíces pilosas. Anteriormente se han obtenido resultados similares para cultivos de raíces pilosas de otras especies de plantas transformadas con el plásmido Ri de *A. rhizogenes*. Por ejemplo, los cultivos de raíces pilosas de *Isatis tinctorial* de 24 días de edad produjeron 1,2 veces más flavonoides que las raíces de dos años cultivadas en el campo (Gai et al., 2015).

Cuadro 9. Resultados de los tratamientos de elicitación en raíces pilosas de *D. carota*.

TRATAMIENTOS	FENOLES TOTALES mg Eq de ácido gálico / g de p.f	FLAVONOIDES TOTALES mg Eq de quercetina / g de p.f	FRAP mM Eq de FeSO ₄ / g de p.f	DPPH μM Eq de Trolox / g de p.f
AS [400 μM]	0.3087 ± 0.04 e	32.3122 ± 4.16 f	70.26 ± 0.78 f	273.754 ± 48.0d
AS [800 μM]	0.5468 ± 0.10 d	35.9167 ± 3.64 ef	76.0.133 ± 0.61 e	314.369 ± 47.3 cd
MeJA [400 μM]	2.2730 ± 0.16 bc	58.000 ± 4.22 d	90.4 ± 0.21 d	469.223 ± 29.1 b
MeJA [800 μM]	1.0643 ± 0.14 d	44.0833 ± 3.64 e	76.3133 ± 0.37 e	336.699 ± 44.9 cd
GA₃ [5 μM]	2.5650 ± 0.17 b	157.75 ± 3.03 b	110.387 ± 0.25 b	594.854 ± 18.9 a
GA₃ [10 μM]	2.1198 ± 0.06 c	80.0833 ± 3.96 c	100.487 ± 0.69 c	403.172 ± 21.1 bc
GA₃ [20 μM]	3.8968 ± 0.07 a	179.17 ± 3.96 a	133.907 ± 0.16 a	667.638 ± 8.35 a
CONTROL	0.2722 ± 0.01 e	27.75 ± 2.84 f	53.88 ± 0.29 g	170.42 ± 1.134 e

Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí según ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

8.4 Cuantificación de carotenoides totales en raíces elicidadas

Como se mencionó anteriormente en el presente trabajo también se determinó el contenido de carotenoides totales en las raíces transformadas de *D. carota*, observándose que su contenido difiere significativamente para cada uno de los tratamientos con respecto al tratamiento control, debido a que todos los elicitores presentan un aumento considerable de estos compuestos en las raíces transformadas. Para el caso de ácido salicílico, a una concentración de 400 μM , se obtuvieron 174.18 $\mu\text{g/g p.s}$ y con 800 μM , 183.63 $\mu\text{g/g p.s}$ lo que equivale a un incremento de 2.18 veces su producción sin tratamiento; mientras que en el tratamiento en el cual se empleó metil jasmonato como inductor a las dos concentraciones 400 μM y 800 μM , el contenido final de carotenos fue de 9.27 y 7.72 veces mayor respectivamente, equivalente a 1.02 $\mu\text{g/g p.s}$ y 617.20 $\mu\text{g/g p.s}$.

Para la elicitación con ácido giberelico los resultados fueron, 728.12 $\mu\text{g/g p.s}$ para la concentración 5 μM , 331.07 $\mu\text{g/g p.s}$ con 10 μM y 779.36 $\mu\text{g/g p.s}$ para 20 μM , siendo ésta última concentración la que mejor resultado presenta en la biosíntesis de carotenoides. Estos datos se observan en la figura 18.

Dicho efecto se da por la manera en que la célula percibe el GA_3 exógeno y los procesos que desencadea dentro de ella; debido a que cuando la célula vegetal percibe a esta fitohormona, se activa una cascada de señales en la que interviene el receptor (GID1) y la proteína DELLA que funciona como transportador, la cual al poliubiquinarse y degradarse, activa las señales de baja expresión de los genes encargados de la síntesis de giberelinas bioactivas ($\text{GA}_{20\text{ ox}}$ y $\text{GA}_{3\text{ ox}}$) (Ueguchi-Tanaka et al., 2007); por lo que cuanto más GA_3 exógeno adquiera la célula, menos expresión de estos genes existe, hasta el paro total de la ruta biosintética.

Carotenoides totales

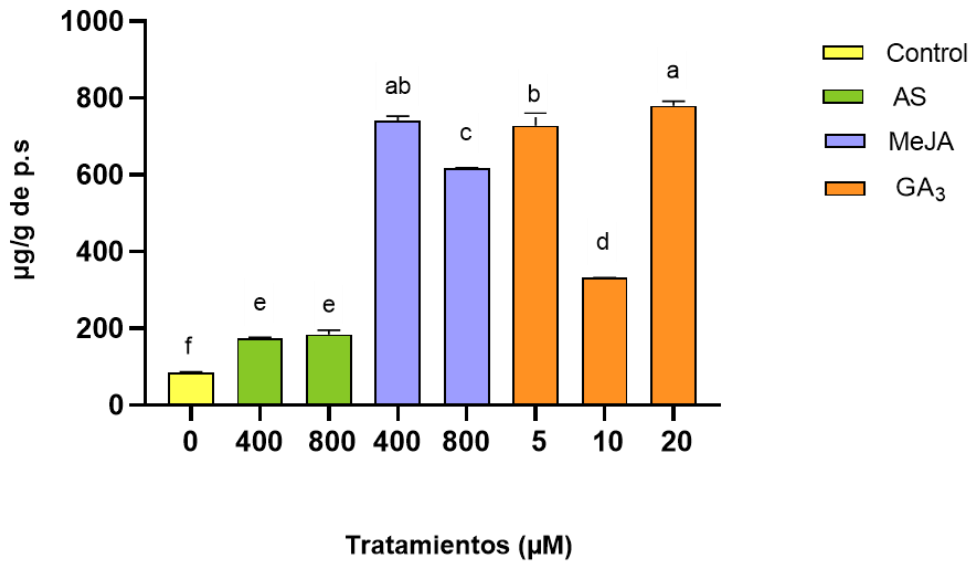


Figura 18. Efecto de diferentes concentraciones de GA₃, MeJA y AS en el contenido de carotenos totales en raíces pilosas de *D. carota*. Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí según ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

Debido a que las giberelinas y carotenoides comparten el mismo precursor (GGPP) para el inicio de sus rutas de biosíntesis, se propone un modelo en el cual el bloqueo de la síntesis de giberelinas y el aumento en la expresión de los genes de la ruta de los carotenoides, provoca que el GGPP producido y acumulado de manera endógena por las raíces tomen pie hacia el drástico incremento en la cantidad de carotenos totales (Figura 19). Particularmente, la sobreexpresión del gen *LCYB1* y *PSY* por la administración exógena de GA₃, repercute en la estimulación de la biosíntesis de pigmentos carotenoides (Moreno-Beltrán et al 2016).

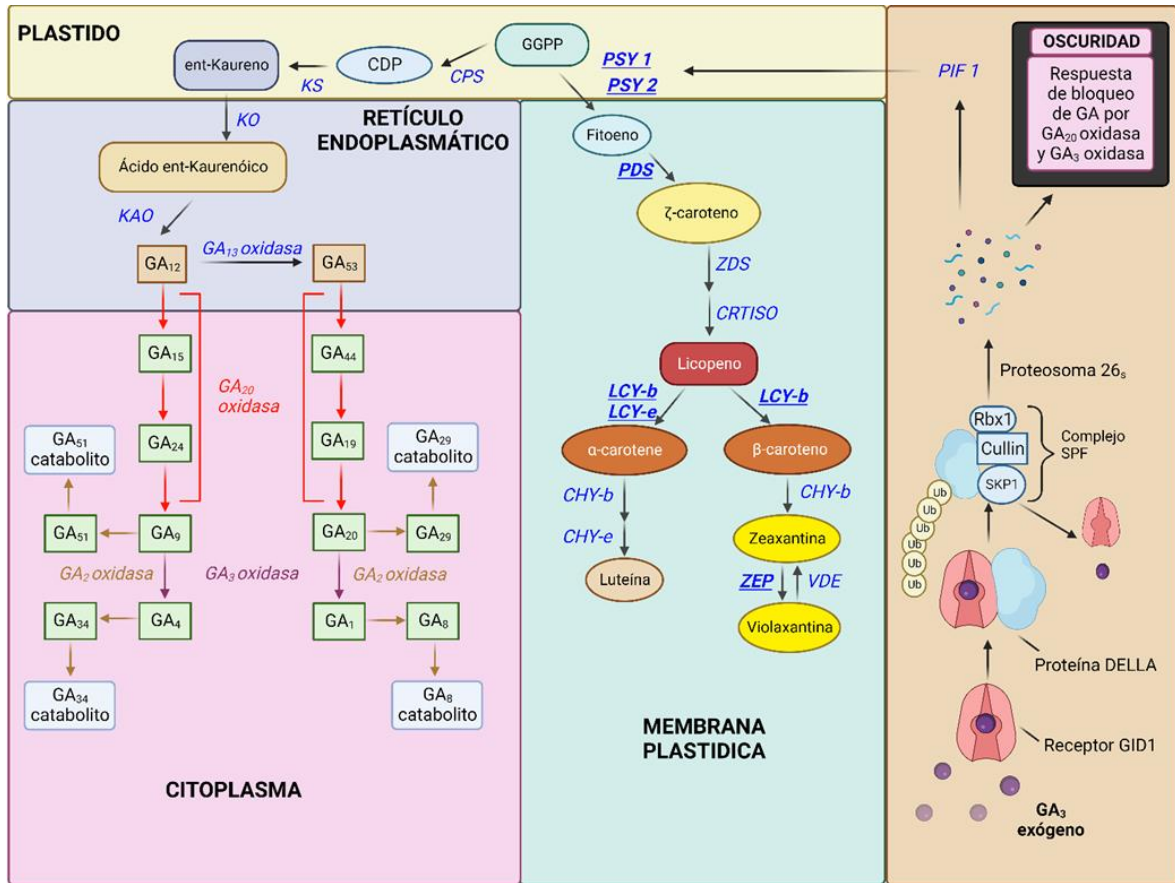


Figura 19. Modelo propuesto de la acción de GA₃ exógeno y su efecto en la biosíntesis de giberelinas y carotenoides endógenos en raíces pilosas de *D. carota* tomado de Moreno-Beltrán et al 2016.

Concordando con dicha idea Stanley y Yuan (2019), hacen mención que el bloqueo de la biosíntesis de giberelinas se da por la falta de luz en el tratamiento de las raíces, lo cual estimula el proceso de biosíntesis de carotenoides. A su vez el mecanismo de señalización de las proteínas DELLA por la estimulación exógena de ácido giberelico produce una sobreexpresión del factor de transcripción PIF1 (Factor de Interacción de Fitocromos 1) que a su vez funciona como regulador de la expresión de los genes *PSY*, haciendo que el GGPP disponible se dirija únicamente hacia la ruta de biosíntesis de carotenoides.

Estos estudios nos dan pauta para reforzar los resultados del alto nivel de expresión de los genes *PSY* obtenidos en las raíces elicidadas con GA 20 μ M, dando la idea clara de que a mayor concentración de ácido giberélico exógeno mayor será la expresión de los genes *PSY* y mayor será el contenido de carotenos totales.

También se establece que el alto contenido de carotenos en dicho tratamiento respecto al control (10 veces más aproximadamente) se da por una doble producción. La primera por el bloqueo de la síntesis de giberelinas debido a la oscuridad en los tratamientos, y la segunda por la estimulación con ácido giberélico exógeno para la sobreexpresión de los genes *PSY*.

8.5 Expresión de genes involucrados en la ruta biosintética de carotenoides en raíces pilosas elicidadas de *D. carota*

Evaluamos el efecto de GA₃ en una concentración de 20 μ M y MeJA en una concentración de 400 μ M en los niveles de expresión de seis genes involucrados en la ruta biosintética de carotenoides en raíces pilosas de *D. carota*, debido a que fueron los elicitores y las concentraciones que demostraron tener mayor efecto en el contenido de fenoles, flavonoides y compuestos antioxidantes. Los genes evaluados fueron: *PSY1*, *PSY2*, *PDS*, *LCYE*, *LCYB* y *ZEP*.

Ya se ha mencionado que los niveles de expresión de genes carotenogénicos y la cantidad de carotenoides varían en respuesta a estreses bióticos y abióticos, así como durante los procesos de desarrollo (Alquezar et al., 2008); esto implica que existe un mecanismo regulador altamente coordinado en la biosíntesis y acumulación de carotenoides; y las hormonas vegetales, en particular, juegan un papel crucial en las respuestas al estrés en las plantas (Divya et al., 2018).

En la raíz de almacenamiento de zanahoria cultivada en la oscuridad, se puede observar una correlación directa entre la acumulación de carotenoides y la transcripción de genes, ya que la renovación de carotenoides es más lenta que en las hojas, porque están protegidas de la luz y del daño por estrés oxidativo. De acuerdo con un aumento en el contenido total de carotenoides en la raíz de almacenamiento, la expresión de la mayoría de los genes, especialmente los

involucrados en la biosíntesis de α -caroteno y el β -caroteno, se induce durante el desarrollo de la zanahoria. Curiosamente, los genes *LCYE* y *LCYB1*, que codifican enzimas directamente involucradas en la síntesis de α -caroteno y el β -caroteno, tienen una expresión aumentada en la raíz de las zanahorias, que también se acompaña de un aumento en la expresión del gen *ZEP* (Fuentes et al. 2012).

Los resultados obtenidos del análisis de expresión, mostraron que el tratamiento con GA_3 a una concentración de 20 μM incrementó considerablemente los niveles de transcripción de los seis genes involucrados en la vía de biosíntesis de carotenoides. Mientras que el tratamiento con MeJA (400 μM) indujo la expresión de los genes *PDS* y *LCYB1*.

Para comenzar con el análisis, evaluamos la expresión de los genes *PSY1* y *PSY2* que resulta en la producción de la enzima fitoeno sintasa, siendo esta enzima el principal precursor en la ruta metabólica de los carotenos; el aumento de su expresión es importante, ya que se encuentra ligado directamente al aumento de biosíntesis de dichos metabolitos. Un claro incremento en la expresión de ambos genes con los tratamientos establecidos en este estudio da la pauta para entender que existe una mayor producción de carotenos en las raíces transformadas de zanahoria.

Con el tratamiento con GA_3 20 μM la expresión relativa de *PSY1* y *PSY2* fue de 7.06 veces y 3.14 veces respectivamente, mientras que el tratamiento de MeJA 400 μM arrojó resultados de expresión relativa de 1.31 veces para *PSY1* y 1.62 veces para *PSY2*, ambos obtenidos a las 24 horas después de la aplicación de elicitores.

Comparado con el trabajo realizado por Wang et al., (2021), en el cual trabajaron con los mismos elicitores, pero a distintas concentraciones (MeJA 400 μM) (GA_3 50 μM), se obtuvieron resultados distintos en la expresión relativa de ambos genes con las raíces de tabaco tratados con metil jasmonato, en donde la expresión disminuye 2 veces en *PSY1* y 0.8 veces en *PSY2* respecto al control utilizado. En el mismo trabajo, en el caso de los tratamientos con GA_3 el aumento de la expresión de los genes *PSY1* y *PSY2* es evidente, debido a que el gen *PSY1* se expresa 8.2 veces y *PSY2* 4 veces más contra el tratamiento control. Los datos obtenidos en nuestro

trabajo presentan cifras similares en cuanto a la producción de carotenoides con el tratamiento de GA₃ debido al aumento en la presencia de estos genes en raíz de zanahoria en comparación con los obtenidos en raíz de tabaco.

Para la expresión de *PDS* se obtuvieron resultados de expresión de 3.95 veces para el tratamiento de elicitación con GA₃ 20 µM y 2.27 veces para las raíces tratadas con MeJA 400 µM. *PDS* es el gen que codifica la enzima fitoeno desaturada, en el paso inicial de biosíntesis de carotenos en zanahoria (Rodriguez-Concepción y Stange, 2013), por lo cual es crucial que *PSD* se exprese para obtener mejores rendimientos en la producción de pigmentos carotenoides. Un estudio realizado por Saini et al. (2014), en el cual utilizaron concentraciones de MeJA 0.1 µM y 0.5 µM mostró resultados mayores a 0.9 veces más de expresión relativa en hojas de *Moringa oleífera* a 24 horas de tratamiento. Otro reporte dado por Divya et al. (2018) en el cual se elicita cilantro a nivel foliar con MeJA 100 µM a 72 horas presentó un aumento de 11.7 veces comparado con el control. En todos los casos se observa una mejora en la producción de carotenos utilizando MeJA, debido a la estimulación y expresión aumentada de los genes relacionados a ellos. Por otra parte, Tuan et al. (2013), hace mención que la elicitación con GA₃ en callos de *S. buicalensis*, produce una supresión de *PDS* de 1.7 veces conforme a lo establecido por el control.

A nivel transcripcional, el gen *LCYB1* se indujo bajo los dos tratamientos de los elicitores probados. Estudios anteriores han demostrado la correlación que existe entre la expresión de *LCYB1* y la acumulación de β-caroteno durante el desarrollo de la raíz de zanahoria (Clotault et al., 2008). En nuestros resultados, se pudo observar un incremento de la expresión de *LCYB1* 5.74 veces en el tratamiento con GA₃; mientras que el tratamiento con MeJA, mostró un incremento de 3.61 veces.

Divya et al. (2018) mostraron en un estudio anterior, que los niveles de expresión del gen *LCYB* como precursor de la biosíntesis de β caroteno aumentaron de manera moderada con metil jasmonato (MeJA) a una concentración de 500 µM en 24 horas, observando un incremento 2.5 veces mayor respecto al control utilizado. Adicionalmente, los mismos autores revelaron que también existe un aumento en la

expresión de 1.8 veces del gen *LCYB* utilizando MeJA a 100 μ M después de 24 horas de la inducción, ambos experimentos realizados en la especie *Coriandrum sativum* en tejido foliar. En comparación con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, se refleja una mayor expresión del gen *LCYB* en el mismo lapso de tiempo (24 horas) y utilizando una concentración de 400 μ M de MeJA, obteniéndose de este modo, una mayor producción de β caroteno en raíz de zanahoria que en hojas de cilantro.

En cuanto a los resultados que muestra la literatura actual sobre las investigaciones relacionadas con el uso de ácido giberélico como inductor de biosíntesis de carotenos y la expresión de los genes de la ruta metabólica de estos compuestos, Keawmanee et al. (2022), hacen mención que con la aplicación de dicho elicitor en un modelo de naranja valencia a una concentración de 500 μ M, se reprime la expresión de los genes *LCYB1* y *LCYB2* dada la alta acumulación de carotenos, dando como resultado un bajo contenido de carotenos en las naranjas elicidadas. Debido a lo anterior, los resultados obtenidos en las raíces pilosas de zanahoria tratadas exógenamente con GA_3 muestran que dicho elicitor funge una acción estimulante para la sobreexpresión de los genes que sintetizan α y β carotenos a partir de licopeno presentes.

Por otra parte, se ha descrito que los genes *LCYE* y *LCYB* son cruciales para la acumulación de carotenoides específicos (α -caroteno, β caroteno, luteína o licopeno) (Perrin et al., 2016). El contenido de carotenos α y β en zanahoria se ha encontrado en una relación 2:1, siendo β -carotenos los de mayor cantidad presentes, con 100 μ g/g p.s contra 50 μ g/g p.s de α -carotenos. El estudio realizado arroja resultados contrastantes a la información revisada en la literatura sobre el tratamiento con GA_3 a una concentración de 20 μ M. En el experimento realizado, se observó una expresión del gen *LCYE* de 4.62 veces más, lo cual se traduce a la producción de licopeno- ϵ -ciclase, enzima que actúa en el metabolismo de la producción de α carotenos (Cunningham et al., 2002).

Se observó también que la expresión de *LCYB*, gen encargado de la producción de la enzima licopeno- β -ciclase precursora de β carotenos se expresa más que *LCYE*, indicando que, en el resultado del contenido de carotenos totales, los β α carotenos

son mayores que los α presentes, a falta de estudios que corroboren dicha idea. Keawmanee et al. (2022) reportan resultados de expresión de dichos genes utilizando también GA₃ 500 μ M como elicitador, en donde el gen *LCYE* antagoniza la expresión de *LCYB*, expresándose más de 16 veces contra una casi nula expresión de *LCYB*, ambos con respecto a su control.

Los resultados obtenidos de la expresión del gen *LCYE* en las raíces elicidadas con metil jasmonato 400 μ M indican que se induce 1.56 veces, cifra alcanzada en la medición a 24 horas post tratamiento. Investigaciones anteriores que también incluyen experimentos con MeJA como elicitador, pero a concentraciones más bajas (0.5 μ M) en un modelo de maíz (Luo et al., 2020), muestra una expresión de 3.3 veces a las 24 horas. Por otra parte, Divya et al. (2018) reportaron en un estudio hecho en hojas de cilantro empleando una concentración de MeJA 500 μ M una expresión relativa del gen *LCYE* de 3 veces a los siete días post tratamiento. En términos generales, el metil jasmonato aumenta el contenido de luteína presente, dando pie a que la biosíntesis de α caroteno incremente por la aparición de la enzima licopeno licopeno- ϵ -ciclase.

En la producción de zeaxantina epoxidasa (gen *ZEP*) para la transformación de β carotenos en xantofilas los resultados en la expresión relativa del gen en la investigación realizada corresponden a 4.98 veces con el tratamiento con GA₃ 20 μ M y 1.42 veces con MeJA 400 μ M, evaluados a las 24 horas.

La acción de los elicitores empleados aumenta el nivel de expresión de genes involucrados en la ruta de biosíntesis de carotenoides y xantofilas. Estos resultados se comprueban con lo reportado anteriormente por Tuan et al. (2013), donde la producción y acumulación de metabolitos secundarios va al alza por el aumento de la expresión de genes de carotenos. Los resultados de la expresión del gen *ZEP* muestran que a 24 horas usando como elicitador GA₃ (50 μ M) se expresa 1.5 veces más que su tratamiento control en callos de *Scutellaria baicalensis*. Por otra parte, Su Fang et al. (2012) aportaron que la expresión de *ZEP* elicitando raíces de *Polygonum minus* con MeJA (100 μ M) da como resultado un incremento de 5.3 veces comparado con su control a 24 horas post tratamiento.

El aumento de biosíntesis de xantofilas se encuentra ligado al aumento de biosíntesis de β carotenos, en tanto la producción de α carotenos o traducido como la expresión al alza de los genes de la ruta de α carotenos, actuarían como antagonistas de la producción de xantofilas en las raíces transformadas de *D. carota*.

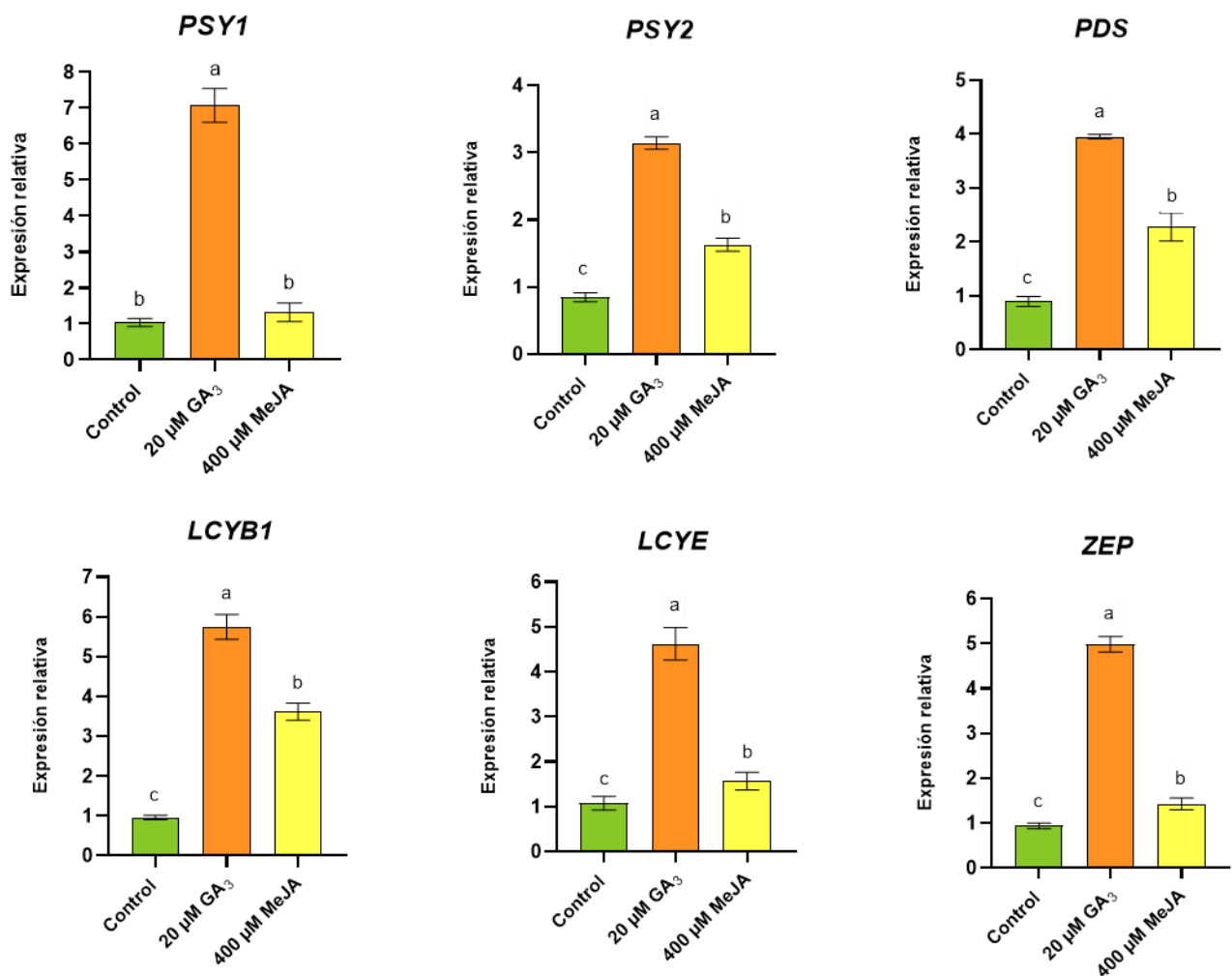


Figura 20. Niveles de expresión relativa de genes implicados en la vía biosintética de carotenoides en raíces pilosas de *D. carota* bajo el efecto de GA₃ y MeJA como elicitores. A) *LCBY1*; B) *LCYE*; C) *PSY1*; D) *PSY2*; E) *PDS*; F) *ZEP*. La altura de cada barra y las barras de error muestran la media y el error estándar, respectivamente, de tres mediciones independientes. Las letras a, b, c indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la prueba de comparación de medias de Tukey.

Para el análisis de correlación de datos entre los resultados de las pruebas fitoquímicas y los resultados de expresión genética se realizó un estudio de componentes principales (PCA) (Figura 21). En (PC1) se describe el 89.4% de la varianza, mientras que (PC2) se explica el 6.4%, dando como resultado una descripción del 95.8% de la varianza inicial.

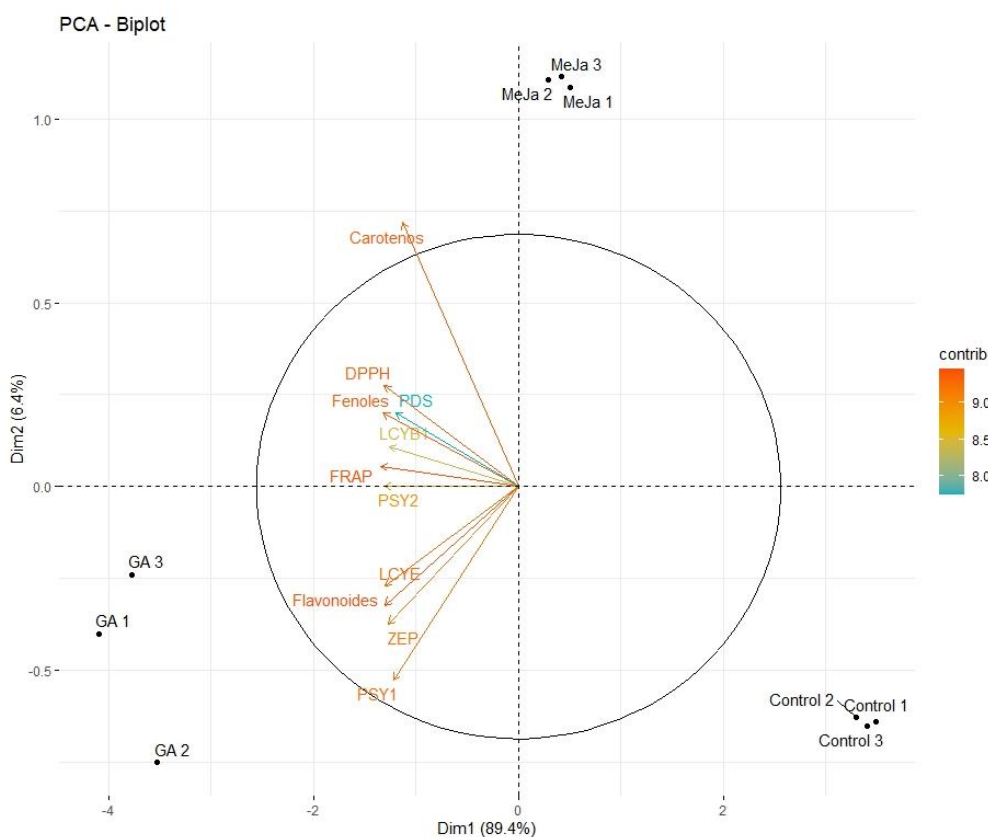


Figura 21. Análisis de componentes principales de determinación de metabolitos secundarios y nivel de expresión de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides en raíces pilosas *D. carota* con la aplicación de los tratamientos con MeJA y GA₃.

Las variables tomadas presentaron diferentes niveles de contribución en la formación de PC1 y PC2. La expresión de los genes *PSY2*, *PDS*, *LCYE* y *LCYB1* junto con la determinación de fenoles, DPPH y FRAP constituyen a la formación de PC1. La determinación de carotenos y flavonoides, junto a la expresión de los genes *PSY1* y *ZEP* fueron los que mayor contribución tuvieron en la formación de PC2.

En el análisis se agruparon los resultados obtenidos de los tres diferentes tratamientos, los tratamientos con mayor diferencia y varianza (control y GA₃) fueron los formadores principales del componente principal 1 describiendo mayor similitud en la expresión de *PSY1*, *LCYE*, *ZEP* y síntesis de flavonoides. Los datos que presentan menor diferencia entre sus varianzas entre el tratamiento de MeJA y GA₃ fueron los obtenidos de la expresión de los genes *PSY2*, *PDS*, *LCYB1*, así como las determinaciones de fenoles y carotenos junto a las capacidades antioxidantes mostradas por FRAP y DPPH.

Se resalta que los datos que corresponden a los resultados arrojados por el tratamiento control respecto a los otros dos tratamientos son muy diferentes indicando así que la aplicación de los elicitors metil jasmonato y ácido giberélico en raíces de zanahoria tienen efectos favorables para una sobreexpresión de genes que intervienen en la ruta de biosíntesis de carotenos y en la respuesta antioxidante provocada por el aumento en la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides.

Basándonos en la revisión descrita por Zhao et al. (2022), la estimulación con ambas fitohormonas favorece a la expresión del complejo de transcripción MYB el cual se encarga de regular la síntesis de metabolitos responsables de la capacidad antioxidante de las plantas, haciendo concordar los resultados obtenidos en este trabajo con lo anteriormente descrito.

Para una mejor visualización de los datos arrojados como resultados en relación con los tratamientos aplicados, se realizó un heatmap de tratamiento vs variable, en donde se observa un balance general del trabajo reflejando que la elicitación en el modelo de raíces transformadas de zanahoria teniendo como propósito estimular la producción de compuestos antioxidantes, es mejor con ácido giberélico a 20 µM que con metil jasmonato, debido a que GA₃ es una hormona que en el metabolismo

natural de la zanahoria, está mayormente relacionada con las rutas de síntesis de diferentes pigmentos y metabolitos antioxidantes (Tuan et al., 2013). El tratamiento con MeJA también exhibe un aumento en la producción de metabolitos y por ende en la expresión de genes de la ruta de carotenoides comparados con las raíces que sirvieron como tratamiento control. Los resultados que más destacan en cuanto a incremento con el tratamiento de metil jasmonato son la síntesis de fenoles y carotenoides, la expresión del gen *LCYB1* y la cuantificación de la capacidad antioxidante mediante DPPH. La expresión del gen *LCYB1* regula directamente la producción de carotenos, específicamente es el activador para la síntesis de β -carotenos (Clotault et al., 2008), dicho esto, se respalda lo presentado por este tratamiento.

Otro dato de relevancia es que metil jasmonato induce una mejor respuesta en la biosíntesis de fenoles y a su vez la capacidad antioxidante que estos compuestos ejercen, es detectada de mejor manera por la técnica de capacidad antioxidante DPPH. Caso distinto el tratamiento en donde se elicó con ácido giberélico, el metabolito antioxidante con mayor producción son los flavonoides y la manera de cuantificar su capacidad de neutralizar radicales libres es mediante el método de FRAP. Avalos-Llano et al. (2021) describen el comportamiento de correlación lineal que tienen los compuestos fenólicos con la determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH, respaldando su afirmación en un experimento con vinos.

Lo presentado por el tratamiento control, da la pauta para describir el aumento de todas las variables determinadas con los tratamientos aplicados tomando sus resultados como una producción y expresión normales en el modelo de raíces de *D. carota* (Figura 22).

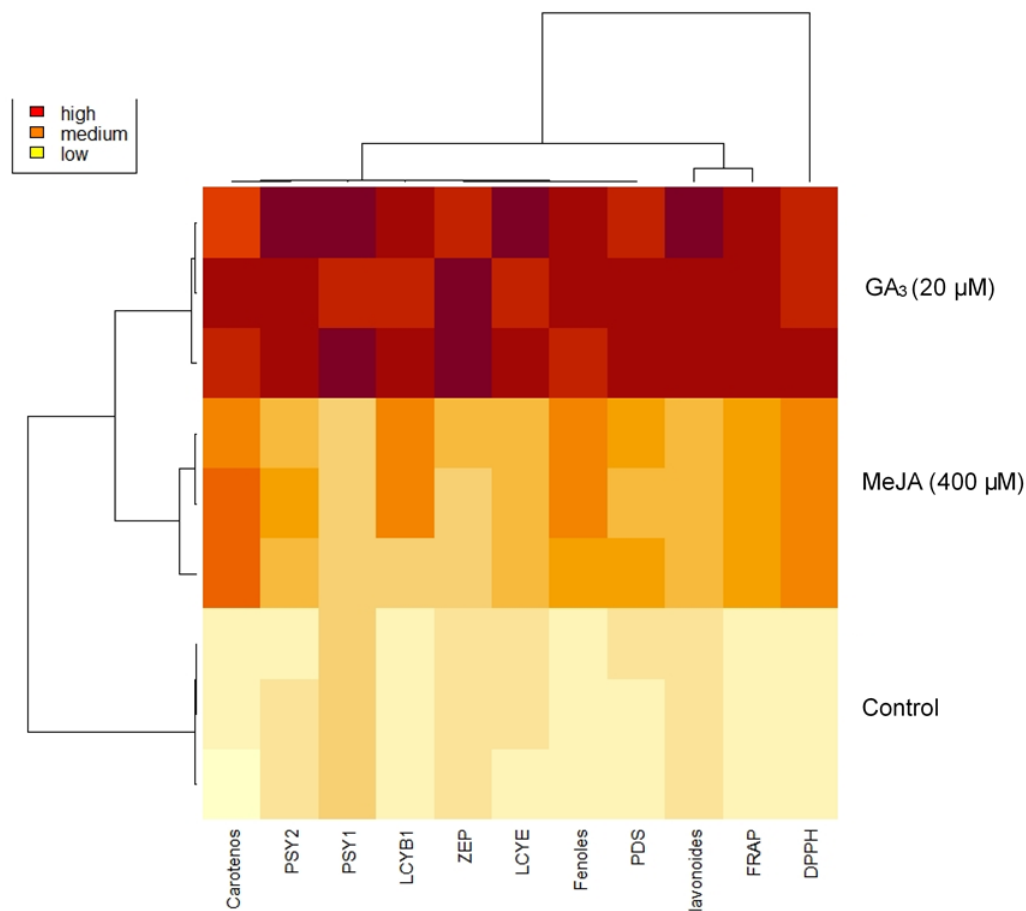


Figura 22. Heatmap de relación tratamiento vs determinaciones. Se ven incluidas expresiones de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides y la producción de metabolitos secundarios, donde el incremento de tonalidad roja indica incremento en la expresión y producción de compuestos fitoquímicos, respecto al tratamiento aplicado.

8.6 Regeneración de plantas a partir de raíces transformadas de *D. carota*

Evaluación de reguladores de crecimiento en la inducción de callos y brotes

Se aplicaron tratamientos de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) para la estimulación de las raíces transformadas de *D. carota* a un proceso de organogénesis (Cuadro 10).

Se implementaron cuatro concentraciones de los reguladores de crecimiento combinadas de manera distinta como tratamientos. El (1) 1.0 mg/L BAP + 0.2 mg/L ANA, (2) 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA, (3) 0.5 mg/L BAP + 0.2 mg/L ANA y (3) 0.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L ANA, tomando también un grupo control al cual no se le aplicó tratamiento alguno.

Cuadro 10. Efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y ANA en la inducción de brotes en callos formados a partir de raíces pilosas.

Combinación de reguladores de crecimiento

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	Número de brotes/callos
0.5	0.1	11 ± 2.24
0.5	0.2	19.4 ± 1.34
1.0	0.1	22 ± 2.0
1.0	0.2	29.2 ± 1.30
0	0	7.4 ± 1.81

Los segmentos de raíz de la línea transformada comenzaron a engrosarse y formar pequeños callos verdes en los extremos cortados (Figura 23). Después de tres semanas en medio de inducción la mayoría de los segmentos de raíces pilosas formaron callos verdes y el crecimiento del callo aumentó con el tiempo.

Los callos formaron brotes adventicios, sin embargo, el crecimiento y textura de los tejidos variaron dependiendo de la composición reguladora de crecimiento del medio.

El medio complementado con una concentración de 0.5 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de ANA, mostró la formación de callos color verde pálido con textura suelta y crecimiento vigoroso y algunos callos comenzaban a diferenciarse en brotes

adventicios. Mientras que al aumentar la concentración de ANA (0.2 mg/L) en la misma concentración de BAP (0.5 mg/L), el crecimiento de callo era menor, más compacta y con mayor formación de brotes.

Al aumentar la concentración de BAP (1.0 mg/L) en el medio y con una concentración de 0.1 mg/L ANA, se observa la formación de callos con poca formación de brotes, parte de los cuales comenzaron a tornarse marrones. La combinación de BAP y ANA en una concentración de 1.0 mg/L y 0.2 mg/L respectivamente mostró la formación de callos compactos, con una coloración verde y la mayor formación de brotes observada de las concentraciones de reguladores de crecimiento evaluadas.

Para el tratamiento uno, se obtuvieron 29.2 ± 1.30 ; para el 2, 22 ± 2.0 en el caso del grupo tres el número de brotes fue 19.4 ± 1.34 y en el tratamiento cuatro el resultado fue de 11 ± 2.24 . El grupo control arrojó 7.4 ± 1.817 brotes por callo (Figura 24 y 25).



Figura 24. Regeneración de planta a partir de raíces pilosas de *D. carota*.

Regeneración de plantas

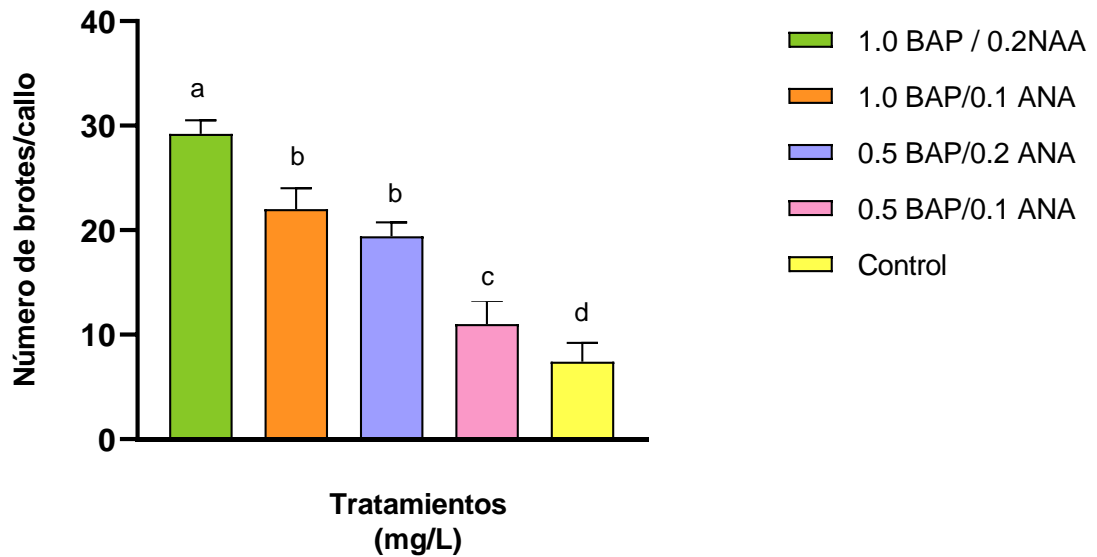


Figura 25. Efecto de diferentes concentraciones de BAP y ANA en la formación de brotes adventicios por callos regenerados a partir de raíces pilosas de *D. carota*. Medias con las mismas letras no son significativamente diferentes entre sí según ANOVA de una vía y comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$).

La regeneración de plantas a partir de raíces transformadas necesita de la implementación de hormonas vegetales (citoquinas) como BAP para la formación de yemas axilares, las cuales tienen potencial para el nacimiento de nuevos brotes, así como la floración y la formación de fruto, y las auxinas que ayudan al enraizamiento de esquejes y la inducción a floración (Suárez y Salgado, 2008).

Los tratamientos en los que la cantidad de fitohormonas era mayor, obtuvieron un mayor número de brotes formados a partir del callo generado, por lo que la sinergia de ambas hormonas favorece a la organogénesis en el modelo de raíz transformada de zanahoria.

IX. CONCLUSIONES

- Se pudieron obtener raíces pilosas de *D. carota* a través de la transformación mediada por *A. rhizogenes*, siendo la cepa ATCC 1834 la única efectiva para desarrollar este proceso de modificación genética.
- El elicitador GA₃ a 20 µM, fue el mejor inductor para la síntesis de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidantes de las raíces de *D. carota* transformadas con *A. rhizogenes*
- Nuestros resultados mostraron que en todos los casos la capacidad antioxidante de los extractos de las raíces pilosas tratadas con las diferentes concentraciones de elicitores, fue mayor en comparación con los resultados obtenidos en las raíces no tratadas, lo que sugiere que los elicitores GA₃, MeJA y AS, tienen un efecto positivo en la producción de compuestos antioxidantes en raíces pilosas de *D. carota*.
- La mayor producción de carotenoides totales en las raíces transformadas de *D. carota*, se refleja en aquellas que se sometieron al tratamiento con GA₃, ya fue el elicitador con el mayor rendimiento obtenido.
- Las raíces pilosas de zanahoria tratadas exógenamente con GA₃ muestran que dicho elicitador funge una acción estimulante para la sobreexpresión de los genes que sintetizan α y β carotenos a partir de licopeno presentes.
- El estrés hormonal causado por metil jasmonato induce la producción de metabolitos secundarios como sistema de defensa vegetal (Singh y Drivedi, 2018). La elicitación mediante esta hormona presentó diferencias en la expresión de los genes *LCYB1*, *LCYE*, *PSY2*, *PDS* y *ZEP*.
- La información encontrada revela que la concentración utilizada de GA₃ favorece la obtención de un alto contenido de carotenos para aumentar el valor nutrimental de la zanahoria con raíces transformadas.
- Se reporta el contenido final de carotenos totales obtenido en las raíces transformadas y elicidadas con GA₃ 20 µM es de 779.36 µg/g p.s dejando claro el incremento en biosíntesis comparado con el control con 87.78 µg/g p.s de carotenos.

- El incremento de la expresión de dichos genes con el tratamiento MeJA 400 μ M es representado por el aumento en la producción de carotenos con 741.105 μ g/g p.s.
- Los resultados obtenidos como número de brotes formados por cada tratamiento fueron significativamente diferentes respecto al control, siendo BAP y ANA (1.0 mg/L, 0.2 mg/L) el que mejor resultados mostro con 29 brotes por callo.
- El incremento en la formacion de brotes a partir de callo es directamente proporcional al aumento en la dosis de las hormonas BAP y ANA en raíces pilosas de zanahoria.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, B.H., Stiles, A.R., Saxena, P.K., Liu, C.Z. 2012. Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 168: 2057–2066.
- Ahmad, A., Ali, H., Khan, H., Begam, A., Khan, S., Ali, S., Abbasi, B. 2020. Effect of gibberellic acid on production of biomass, polyphenolics and steviol glycosides in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Plants*, 9(4): 420.
- Akhtar, M., Swamy, M., Sinniah, U. 2019. Natural bio-active compounds. *Natural Bio-active Compounds*, 2
- Alquezar, B., Rodrigo, M.J., Zacarías, L. 2008. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. *Phytochemistry*, 69(10): 1997– 2007.
- Amani, S., Mohebodini, M., Khademvatan, S., Jafari, M. 2020. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Ficus carica* L. for the efficient production of secondary metabolites. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(5): 2185-2197.
- Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W. 2006. Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20: 72–83.
- Añibarro-Ortega, M., Pinela, J., Ciric, A., Martins, V., Rocha, F., Sokovic, M., Barata, A., Carvalho, A., Barros, L., Ferreira, I. 2020. Valorization of table tomato crop by-products: Phenolic profiles, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities. *Food and Bioproducts Processing*, 124: 307-319.
- Arscott, S.A., Simon, P.W., Tanumihardjo, S.A. 2010. Anthocyanins in purple-orange carrots (*Daucus carota* L.) do not influence the bioavailability of beta-carotene in young women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:2877–2881.

- Auldridge, M.E., McCarty, D.R., Klee, H.J. 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:315–321.
- Avalos Llano, K., Sgroppo, S., Avanza, J. 2021. Actividad antioxidante y contenido en fenoles totales en vinos de origen nacional. *FACENA*, 19: 11-19.
- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D. 2014. Biotic elicitors effectively increase the glucosinolates content in Brassicaceae Sprouts. *American Chemical Society*, 62(8): 1881-1889.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., Bollinger, W. H. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials *Science*, 228:1154–1160.
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., Nothnagel, T. 2006. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, 224:1028–1037.
- Benzie, I., Strain, J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Berlin, J., Beier, H., Fecker, L., Forche, E., Noe, W., Sasse, F., Schiel, O., Wray, V. 1985. Conventional and new approaches to increase the alkaloid production of plant cell cultures. In: *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Neumann, K. H., Barz, W., and Reinhard, E., Eds. Springer-Verlag, Berlin, 272–280.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839–851.
- Bouvier, F., Rahier, A., Camara, B. 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research*, 44: 357–429.

- Brand, W., Cuvelier, M., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 28: 25-30.
- Cano, L., Cano, N. 2014. Determinación del efecto del elicitor ácido acetilsalicílico sobre el control de mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.), en el cultivo de haba (*Vicia faba* L.). Tesis de licenciatura.
- Casanova, E. 2005. Influence of *rol* genes in floriculture. *Biotechnology Advances*, 23:3.
- Cazzonelli, C.I., Pogson, B.J. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Plant Science* ,15:266–274
- Chandra, S. 2012. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters*, 34:407-415.
- Chandra, S., Chandra, R. 2011. Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochemistry reviews*, 10(3): 371-395.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3): 178-182.
- Charlwood, B.V., Charlwood, K.A. 1991. Terpenoid production in plant cell culture. In: *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. Harborne, J. B., and Tomas-Barberan, F., Eds., Clarendon Press, Oxford, 95–132.
- Chaudhuri, K.N. 2006. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation. *Plant Cell Reports*, 25:1059.
- Choi, P., Kim, Y., Chung, H., Choi, D., Liu J. 2004. Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Reports*, 22: 828 – 831.

- Choudhury, S., Pandey, S. 2018. Use of hairy root system to study signaling pathways during nodule formation. En: *Hairy Roots*. Springer, Singapore, pp 243- 273.
- Christey, M. 1997. Transgenic crop plants using *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. In: Doran PM, ed. Hairy roots: culture and applications. Amsterdam: *Harwood Academic Publishers*, 7: 99-111.
- Chung, I.M., Thiruvengadam, M., Rekha, K., Rajakumar, G. 2016. Elicitation enhanced the production of phenolic compounds and biological activities in hairy root cultures of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.
- Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M., Geoffriau, E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *Journal of Experimental Botany*, 59:3563–3573.
- Crane, C., Wright, E., Dixon, R., Wang, Z. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens* -transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes* -transformed hairy roots. *Planta*, 223: 1344 – 1354.
- Cunningham, F.X. 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Applied Chemistry*, 74(8): 1409-1417.
- Cunningham, F.X., Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49:557–583.
- Dar, T., Uddin, M., Khan, M., Hakeem, K., Jaleel H. 2015. Jasmonates counter plant stress: A review. *Environmental and Experimental Botany*, 115: 49-57.
- Dawda, H.G., Mukundan, U., Rai, A. 1997. Establishment and studies of hairy root cultures. In: *Recent Advances in Biotechnological Applications of Plant Tissue*

- and Cell Culture*. Ravishankar, G. A., and Venkataraman, L. V., Eds. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, 240–244.
- De Cleene, M., De Ley, J. 1981. The host range of infectious hairy roots. *The Botanical Review*, 47: 147–194.
- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., Goossens, A. 2012. Methyljasmonate induced bioformation of myricetin, quercetin and kaempferol in red raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 11639-11644.
- Dias, A.D., Gomes, A. 1995. Efecto del tratamiendo de semillas con ácido gibérellico en el rendimiento del cultivo de arroz de regadío. *Current Agricultural Science and Technology*, 1(2).
- DiCosmo, F., Misawa, M. 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13: 425–453.
- Divya, P., Puthusseri, B., Savanur, M.A., Lokesh, V., Neelwarne, B. 2018. Effects of methyl jasmonate and carotenogenic inhibitors on gene expression and carotenoid accumulation in coriander (*Coriandrum sativum* L.) foliage. *Food Research International*, 111: 11-19.
- Doran, P. M. 2002. Properties and applications of hairy-root cultures. In: *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. Okasman-Caldenty, K. M., and Barz, W. H., Eds. Marcel Dekker Inc., New York, 143–162.
- Doyle, J., Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Dunemann, F., Böttcher, C. 2021. Enhanced production of falcarinol-type polyacetylenes in hairy roots of cultivated carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*).
- Ergun, M., Süslüoğlu, Z. 2018. Evaluating carrot as a functional food. *Middle East Journal of Science*, 4(2), 113-119.

- FAOSTAT. 2014. Database on agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Ferrari, S. 2010. Biological elicitors of plant secondary metabolites: mode of action and use in the production of nutraceuticals. *Bio-Farms for Nutraceuticals. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698: 152-166.
- Flores, H. E., Vivanco, J. M., Loyola-Vargas, V. M. 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Science*, 4: 220–226.
- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J.C., Handford, M., Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. 2012. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology*, 79: 47–59.
- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J.C., Handford, M., Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. 2012. Light-dependent changes in plastid differentiation influence carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Molecular Biology*, 79:47–59.
- Gai, Q.Y., Jiao, J., Luo, M., Wei, Z.F., Zu, Y.G., Ma, W., Fu, Y.J. 2015. Establishment of hairy root cultures by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Isatis tinctoria* L. for the efficient production of flavonoids and evaluation of antioxidant activities. *PLoS One*, 10(3), e0119022.
- García, A.Á., Carril, E. 2011. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Gaudin, V., Vrain, T., Jouanin, L. 1994. Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 32(1):11-29.
- Gelvin, S. B. 2009. *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant physiology*, 150(4): 1665-1676.

- Georgiev, M., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., Xu, J. 2012. Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends in Biotechnology*, 30: 528–537.
- Georgiev, M.I., Pavlov, A.I., Bley, T. 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6): 1175-1185.
- Giri, A., Narasu, M.L. 2000. Transgenic HRs: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18:1-22.
- Hager, T.J., Howard, L.R. 2006. Processing effects on carrot phytonutrients. *Horticultural Science*, 41:74–79.
- Halder, M., Roychowdhury, D., Jha, S. 2018. A critical review on biotechnological interventions for production and yield enhancement of secondary metabolites in hairy root cultures, in: Srivastava, V., Mehrotra, S., Mishra, S. (Eds.), *Hairy Roots*, Springer Nature, Singapore, pp. 21–44.
- Halder, M., Sarkar, S., Jha, S. 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in life sciences*, 19(12), 880-895.
- Hooley, R. 1994. Gibberellins: perception, transduction and responses. *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*, 293-319.
- Hu, Z. B., Du, M. 2006. Hairy root and its application in plant genetic engineering. *International Journal of Plant Biology*, 48: 121–127.
- Keawmanee, N., Ma, G., Zhang, L., Yahata, M., Murakami, K., Yamamoto, M., Kato, M. 2022. Exogenous gibberellin induced greening through the regulation of chlorophyll and carotenoid metabolism in Valencia oranges. *Plant Physiology and Biochemistry*, 173: 14-24.

- Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., and Malone, D. M. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59: 39–52.
- Kim, Y. J., Wyslouzil, B. E., and Weathers, P. J. 2002. Invited review: secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 38: 1–10.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), 2-4.
- Luo, H., He, W., Li, D., Bao, Y., Riaz, A., Xiao, Y., Liu, C. 2020. Effect of methyl jasmonate on carotenoids biosynthesis in germinated maize kernels. *Food chemistry*, 307: 125525.
- Maass, D., Arango, J., Wust, F., Beyer, P., Welsch, R. 2009. Carotenoid crystal formation in Arabidopsis and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels. *PLoS One*, 4: e6373.
- Makhzoum, A.B., Sharma, P., Bernards, M.A., Trémouillaux-Guiller, J. 2013. Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications. In *Phytochemicals, plant growth, and the environment* (pp. 95-142). Springer, New York, NY.
- Mishra, A., Sharma, K., Misra, R. 2012. Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions* 7: 95–120.
- Montilla, E.C., Arzaba, M.R., Hillebrand, S., Winterhalter, P. 2011. Anthocyanin composition of black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) cultivars Antonina, Beta Sweet, Deep Purple, and Purple Haze. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59:3385–3390.

- Moreno, J. C., Cerda, A., Simpson, K., Lopez-Diaz, I., Carrera, E., Handford, M., Stange, C. 2016. Increased *Nicotiana tabacum* fitness through positive regulation of carotenoid, gibberellin and chlorophyll pathways promoted by *Daucus carota* lycopene β -cyclase (Dclcyb1) expression. *Journal of experimental botany*. 67(8), 2325-2338.
- Mukundan, U., Dawda, H. G., Ratnaparkhi, S. 1997. Hairy root culture and secondary metabolite production. *Agro Botanica*, Mumbai, India. 27:29-43.
- Naik, P. M., Al-Khayri, J. M. 2016. Abiotic and biotic elicitors—role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plant, in: Shanker, A. K., Shanker, C. (Eds.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*, InTech, Rijeka, pp. 247–277.
- Ozyigit I. 2012. *Agrobacterium tumefaciens* and its use in plant biotechnology. En: *Crop Production for Agricultural Improvement*. M. Asharaf (Ed). 317-361p.
- Perrin, F., Brahem, M., Dubois-Laurent, C., Huet, S., Jourdan, M., Geoffriau, E., Gagne, S. (2016). Differential pigment accumulation in carrot leaves and roots during two growing periods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(4): 906-912.
- Ramírez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R., Palazon, J. 2016. Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2): 182.
- Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. 2013. Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Archives of biochemistry and biophysics*, 539(2): 110-116.
- Rokem, J. S., Goldberg, I. 1985. Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: methods for yield improvement. In: *Advances in Biotechnological Processes*. Alan R. Liss Inc., New York, 241–274.

- Rowychowdhury, D., Majumder, A., Jha, S. 2013. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: Prospects and challenges. En Chandra S, Lata H, Verma A. (eds): *Biotechnology for medicinal plants*, 462 pp. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Rudrappa, T., Neelwarne, B., Kumar, V., Lakshmanan, V., Venkataramareddy, S. R., Aswathnarayana, R. G. 2005. Peroxidase production from hairy root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Electronic Journal of Biotechnology*, 8: 185–197.
- Saini, R.K., Harish, Prashanth, K.V., Shetty, N.P., Giridhar, P. 2014. Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Acta physiologiae plantarum*, 36(10): 2695-2704.
- Shanks, J. V., Morgan, J. 1999. Plant “hairy root” culture. *Current Opinion Biotechnology*, 10: 151–155.
- Singh, A., Dwivedi, P. 2018. Methyl-jasmonate and salicylic acid as potent elicitors for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(1):750-757.
- Singh, D. P., Jermakow, A. M., Swain, S. M. 2002. Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14(12): 3133-3147.
- Srivastava, S., Cahill, D.M., Conlan, X.A., Adholeya, A. 2014. A novel *in vitro* whole plant system for analysis of polyphenolics and their antioxidant potential in cultivars of *Ocimum basilicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41):10064–10075.
- Srivastava, S., Srivastava, A.K. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnoogy*, 27: 29-43.

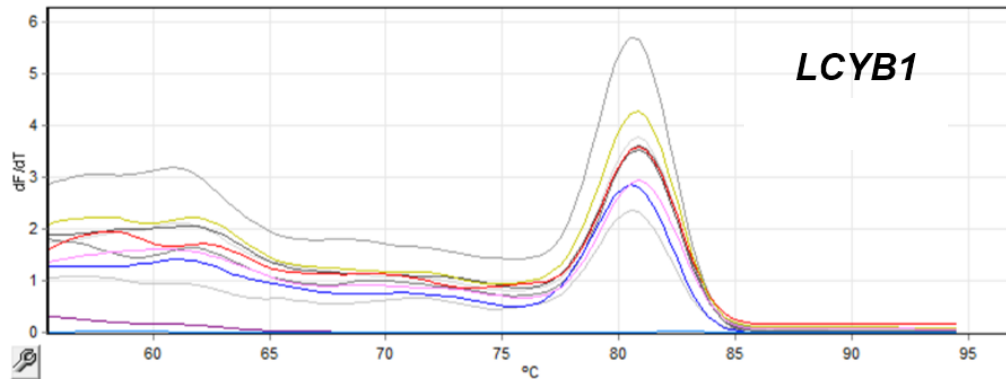
- Stanley, L., Yuan, Y. W. (2019). Transcriptional regulation of carotenoid biosynthesis in plants: so many regulators, so little consensus. *Frontiers in Plant science*, 10, 1017.
- Suárez, I., Salgado, J.A. 2008. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. *Temas Agrarios*, 13(1): 40-48.
- Su-Fang, Ee., Oh, J.M., Mohd Noor, N., Kwon, T.R., Mohamed-Hussein, Z.A., Ismail, I., Zainal, Z. 2013. Transcriptome profiling of genes induced by salicylic acid and methyl jasmonate in *Polygonum minus*. *Molecular Biology Reports*, 40(3): 2231-2241.
- Surles, R.L., Weng, N., Simon, P.W., Tanumihardjo, S.A. 2004. Carotenoid profiles and consumer sensory evaluation of specialty carrots (*Daucus carota*, L.) of various colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:3417–342.
- Tepfer, D. 1990. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Physiology*, 79: 140–146.
- Tuan, P.A., Kim, J.K., Lee, S., Chae, S.C., Park, S.U. 2013. Molecular characterization of carotenoid cleavage dioxygenases and the effect of gibberellin, abscisic acid, and sodium chloride on the expression of genes involved in the carotenoid biosynthetic pathway and carotenoid accumulation in the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(23): 5565-5572.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Matsuoka, M. 2007. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *The Plant Cell*, 19(7): 2140-2155.

- Veena, V., Taylor, C. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43: 383-403.
- Vinterhalter, B., Orbovic, V., Vinterhalter, D. 1999. Transgenic root cultures of *Gentiana punctata* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 68(4): 275 – 280.
- Wallaart, T. E., Pras, N., Quax, W. J. 1999. Isolation and identification of dihydroartemisinic acid hydroperoxide from *Artemisia annua*: a novel biosynthetic precursor of artemisinin. *Journal of Natural Products*, 62:1160–1162.
- Wang Z, Zhang L, Dong C, Guo J, Jin L, Wei P, Wang R. 2021. Characterization and functional analysis of phytoene synthase gene family in tobacco. *BMC Plant Biology*, 21(1): 1-18.
- Wang, J. W., Wu, J.Y. 2013. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures, in: Doran, P. M. (Ed.), *Biotechnology of Hairy Root Systems. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 55–89
- Wasternack, C. 2015. How jasmonates earned their laurels: past and present. *Journal of plant growth regulation*, 34(4):761-794.
- Winans, S. 1992. 2-Way chemical signaling in agrobacterium plant interactions. *Microbiological reviews*, 56: 12-31.
- Yuan, Y., Huang, L., Cui, G., Mao, Y., He, X. 2008. Effect of gibberellins and its synthetic inhibitor on metabolism of tanshinones. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 6: 2.
- Zarate, R., Verpoorte, R. 2007. Strategies for the genetic modification of the medicinal plants *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Phytochemistry Reviews*, 6:475.

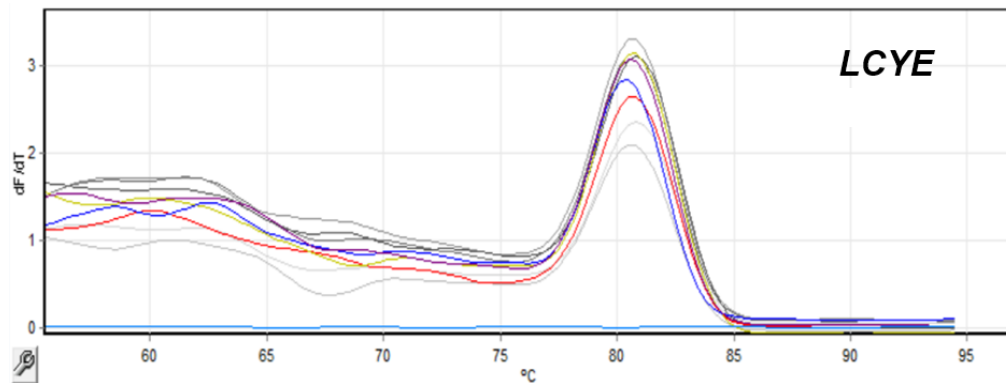
Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23:283–333.

Zhao, X., Zhang, Y., Long, T., Wang, S., Yang, J. 2022. Regulation mechanism of plant pigments biosynthesis: anthocyanins, carotenoids, and betalains. *Metabolites*, 12(9): 871.

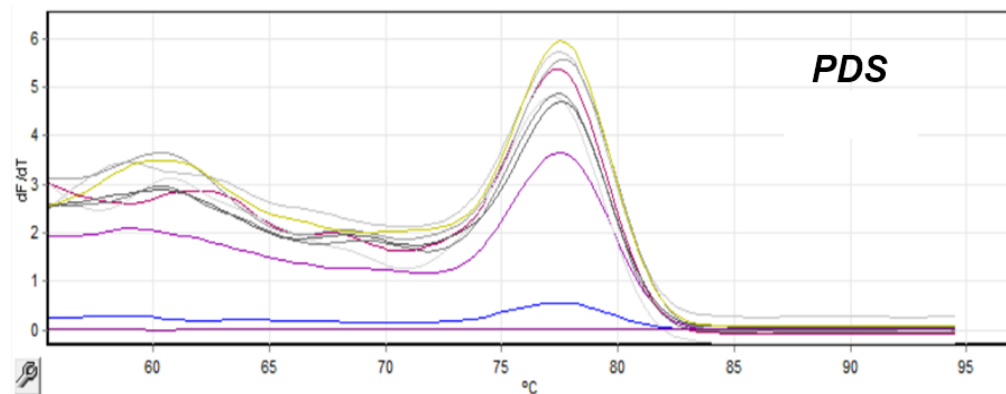
XI. ANEXOS



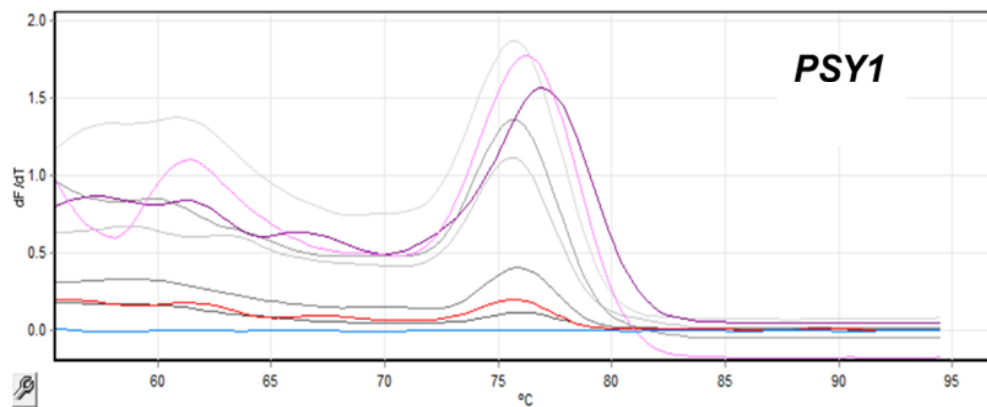
Anexo 1. Análisis de curva melting qRT-PCR para el gen *LCYB1*.



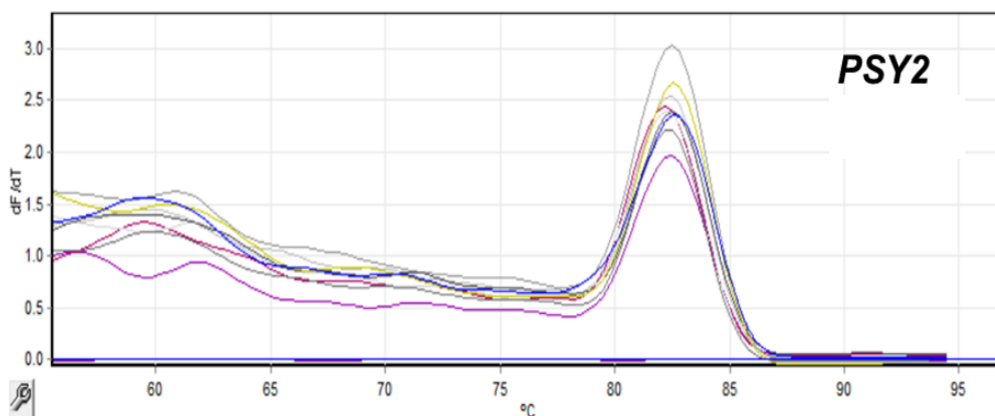
Anexo 2. Análisis de curva melting qRT-PCR para el gen *LCYE*.



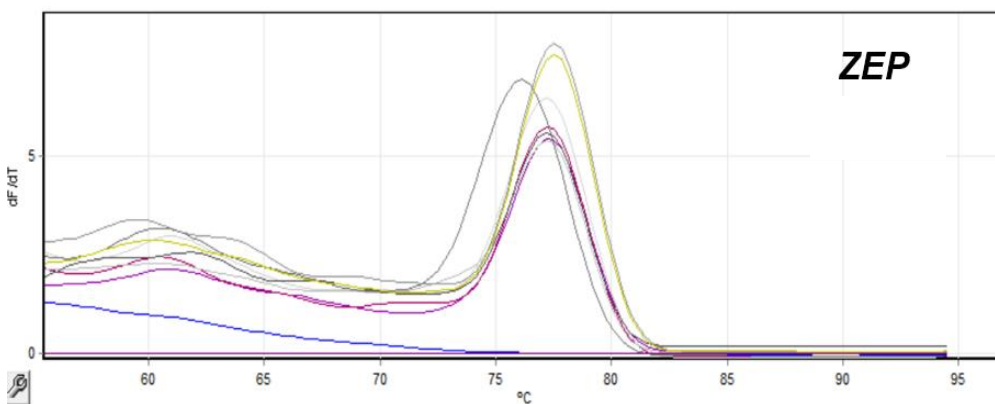
Anexo 3. Análisis de curva melting qRT-PCR para el gen *PDS*.



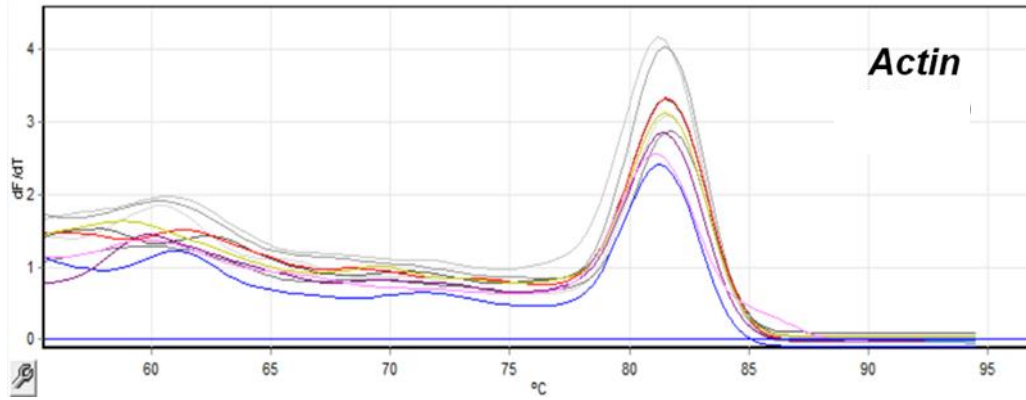
Anexo 4. Análisis de curva melting qRT-PCR para el gen *PSY1*.



Anexo 5. Análisis de curva melting qRT-PCR para el gen *PSY2*.



Anexo 6. Análisis de curva melting qRT-PCR para el gen *ZEP*.



Anexo 7. Análisis de curva melting qRT-PCR para el gen *Actin*.