



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD
DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y MOLÉCULAS BIOACTIVAS EN CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Lepechinia caulescens* Ort.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA:

M. en B. VICTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

DIRECCIÓN DE TESIS:

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MOR.

JUNIO 2021.



Este proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Botánica Estructural del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca número 559379/296765. Bajo la dirección de la Dra, Irene de la Concepción Perea Arango y por el siguiente comité revisor:

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irene Perea Arango, por la dirección de esta tesis doctoral, por el apoyo incondicional durante este proyecto, por sus consejos, por la retroalimentación y sobre todo por su amistad.

A cada uno de los integrantes del comité tutorial y de revisión que siempre estuvieron en la mejor disposición de colaborar para que esta tesis concluyera de la mejor manera, muchas gracias por las observaciones realizadas en cada una de las evaluaciones, y por el apoyo con algunos de sus equipos de laboratorio.

A la Dra. Susana Valencia Diaz por la paciencia que me tuvo y por el apoyo brindado.

Al Dr. José de Jesús Arellano, por los consejos brindados y por su disposición de siempre ayudarme cuando lo requería.

A MI Ariadna Zenil Rodríguez, por el apoyo brindado para la parte de cromatografía, pero sobre todo por la amistad.

A los integrantes del Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y Karlina Garcia-Sosa, por la estancia brindada en sus instalaciones y por colaborar en una parte de este proyecto.

A la Dra. Pilar Nicasio Torres, por sus consejos y observaciones en este proyecto, pero sobre todo por su amistad.

A mi amiga de siempre Dra. Adriana Valladarez, por su apoyo para continuar y concluir este proyecto de tesis.

Y sobre todo, a aquellos que formaron parte del Laboratorio de Botánica estructural, compañeros que se volvieron en verdaderos amigos, gracias Manuel, Carlos, Cary, David, Jose Luis, Angelica, Gaby, Leticia, Miriam, Luz clara, Jose, Edmy y todos los que me faltaron, muchas gracias por su apoyo en el laboratorio, por tantos momentos de felicidad, coraje, aprendizaje, pero sobre todo gracias por su amistad y por su tiempo para compartirlo y hacer de esta estancia de lo mejor.

DEDICATORIA

A mis padres, Lília Martínez Ávila y Francisco Vergara Hernández (QEPD), quienes siempre fueron motivo para seguir preparándome, gracias por su apoyo, por los consejos que nunca estuvieron de más, fue una etapa difícil muchas veces de ausencia, pero siempre estuvieron en la mejor disposición de brindarme su apoyo incondicional cuando lo necesite, pero sobre todo gracias por su amor.

A mis Hermanos, Francisco Javier y Ana Lília, quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron al pendiente a lo largo de esta etapa, gracias por su ayuda.

Y a mi futuro contador, Gilberto Puga Castillo, quien me acompañó en gran parte de esta etapa brindándome su apoyo cuando fuera necesario, gracias por formar parte de esto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	
II. ANTECEDENTES	5
II.1 Plantas medicinales, una fuente importante de metabolitos secundarios	5
II.1.1 Terpenos	6
II.1.2 Ácido ursólico y ácido oleanólico, triterpenos de importancia farmacológica	9
II.2 Ácido rosmarínico, una molécula de importancia biológica.	12
II.3 Raíces transformadas, un sistema para la producción de metabolitos secundarios	15
II.4 Elicitación, una estrategia para el incremento de metabolitos secundarios	19
II.4.1 Metil jasmonato, un elicitor en la producción de Msec de plantas medicinales	21
II.5 Modificación de nutrientes en el medio de cultivo para el incremento de biomasa y Msec	24
II.6 Modificación en la fuente de carbono	28
II.7 Generalidades de <i>Lepechinia caulescens</i>	30
II.7.1 Uso de <i>L. caulescens</i> en la medicina tradicional	31
II.7.2 Compuestos químicos en <i>L. caulescens</i>	31
II.7.3 Antecedentes biotecnológicos en <i>L. caulescens</i>	33
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS	36
V. OBJETIVO GENERAL	37
V.1 Objetivos Particulares	37
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
VII. MATERIALES Y METODOS	39
VII.1 Colecta de material vegetal	39
VII.2 Desinfestación y escarificación de semillas de <i>L. caulescens</i>	39
VII.3 Generación de cultivos de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	39
VII.4 Selección de líneas de raíces transformadas	40
VII.5 Mantenimiento de los cultivos de líneas transformadas	41

VII.6 Confirmación de transformación de la línea celular mediante PCR	41
VII.7 Obtención de extractos a partir de cultivos <i>in vitro</i> de <i>L. caulescens</i> y la planta silvestre	40
VII.8 Identificación y cuantificación de AU, AO y AR por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)	42
VII.8.1 Identificación de AR por Cromatografía en capa fina	43
VII.9 Establecimiento de parámetros cinéticos de crecimiento de dos líneas de raíces transformadas y producción de AU y AO	43
VII.10 Efecto de la concentración de sacarosa en cultivos de raíces transformadas	44
VII.11 Efecto de la concentración de NO_3^- y PO_4^{3-} en la producción de biomasa y acumulación de AU y AO en raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	44
VII.12 Efecto del MeJa en la acumulación de AU, AO y AR en líneas de raíces transformadas	45
VIII. RESULTADOS	
VIII.1 Germinación de semillas y obtención de plántulas de <i>L. caulescens</i>	46
VIII.2 Generación de cultivos de raíces transformadas de <i>L. caulencens</i>	46
VIII.3 Identificación y cuantificación de AU y AO por CLAR en cultivo de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	51
VIII.4 Cinética de crecimiento de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	55
VIII.4.1 Determinación de la conductividad del medio de cultivo	59
VIII.4.2 Determinación del pH en el medio de cultivo durante la cinética de crecimiento	60
VIII.4.3 Estudio cinético del consumo de azúcares	62
VIII.4.4 Estudio cinético de la producción de AU y AO	63
VIII.5 Efecto de la concentración de sacarosa en cultivos de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	64
VIII.6 Efecto de la concentración de NO_3^- y PO_4^{3-} en la producción de biomasa y terpenos en raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	68
VIII.7 Efecto del metil jasmonato en la acumulación de AU y AO en raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	75
VIII.8 Efecto de MeJa en la acumulación de AR en raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	77
IX. DISCUSIÓN	84
X. CONCLUSIONES	93
XI. PERSPECTIVAS	94
XII. BIBLIOGRAFÍA	95
XIII. ANEXOS	112
XIV. PUBLICACIÓN	117

ABREVIATURAS

AO	Ácido oleanólico
AR	Ácido rosmarínico
AU	Ácido ursólico
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
MeJa	Metil jasmonato
MS	Murashige y Sckog
Msec	Metabolitos secundarios
PAL	Fenilalanina-amonio-liasa

INDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

FIGURAS

Figura 1. Clasificación de metabolitos secundarios vegetales	6
Figura 2. Síntesis de terpenos y su clasificación de acuerdo a las unidades de isopreno	8
Figura 3. Vía de biosíntesis de AU y AO	9
Figura 4. Estructuras químicas de los triterpenos pentacíclicos	10
Figura 5. Ruta de biosíntesis de ácido rosmarínico	12
Figura 6. Estructura química del ácido rosmarínico	13
Figura 7. Representación esquemática del plásmido Ri de <i>A. rhizogenes</i>	17
Figura 8. Síntesis de ácido jasmónico y metil jasmonato	22
Figura 9. Fotografía de la planta de <i>Lepechinia caulescens</i>	30
Figura 10. Proceso de germinación y obtención de plántulas de <i>L. caulescens</i>	46
Figura 11. Proceso de inoculación y selección de líneas transformadas de <i>L. caulescens</i>	47
Figura 12. Líneas de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	49
Figura 13. Amplificación del gen <i>rol B</i> por PCR	50
Figura 14. Amplificación del gen <i>vir D2</i> por PCR	50
Figura 15. Cromatogramas de los estándares de ácido ursólico y oleanólico	52
Figura 16. Cromatogramas de los extractos diclorometánicos de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	54
Figura 17. Efecto en la biomasa de raíces transformadas crecidas a diferentes concentraciones de sacarosa	65
Figura 18. Regresión lineal entre la acumulación de biomasa del cultivo de raíces transformadas contra la concentración de sacarosa en el medio de cultivo	66

Figura 19 Morfología de las raíces pilosas de <i>L. caulescens</i> crecidas bajo modificaciones de nitratos y fosfatos	69
Figura 20. Identificación de AR en cromatografía en capa fina de extractos diclorometánicos y metanólicos de planta silvestre y raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	78
Figura 21. Determinación de AR por CLAR	78
Figura 22. Cromatogramas de ácido rosmarínico de raíces transformadas y planta silvestre de <i>L. caulescens</i>	80

GRÁFICAS

Grafica 1. Curva de calibración del estándar de ácido ursólico	53
Gráfica 2. Curva de calibración del estándar de ácido oleanólico	53
Gráfica 3. Peso fresco y peso seco vs tiempo de cultivo de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	57
Gráfica 4. Logaritmo natural de peso seco de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	58
Gráfica 5. Conductividad y peso seco vs tiempo de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	59
Gráfica 6. pH y peso seco vs tiempo de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	61
Gráfica 7. Concentración de azúcares vs tiempo de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	63
Gráfica 8. Gráfica de producción de AU y AO en cultivo de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i> durante la cinética de crecimiento	64
Gráfica 9. Acumulación de biomasa de la línea 1 de raíces pilosas cultivadas en medio MS2 modificado en la concentración de nitratos y fosfatos.	70
Gráfica 10. Acumulación de biomasa de la línea 5 de raíces pilosas cultivadas en medio MS2 modificado en la concentración de fosfatos	71
Gráfica 11. Efecto de la concentración de fosfatos en la acumulación de AU y AO en raíces pilosas cultivadas en medio MS/B5 modificado.	73

Gráfica 12. Acumulación de AU en cultivos de L1 de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i> elicidadas con MeJa	75
Gráfica 13. Acumulación de AU en cultivos de L5 de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i> elicidadas con MeJa	76
Gráfica 14. Acumulación de AO en cultivos de L1 de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i> elicidadas con MeJa	76
Gráfica 15. Acumulación de AO en cultivos de L5 de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i> elicidadas con MeJa	77
Gráfica 16. Curva de calibración de ácido rosmarínico	79
Gráfica 17. Acumulación de AR en cultivos de L1 de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	81
Gráfica 18. Acumulación de AR en cultivos de L5 de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i>	82

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de AU y AO en distintas especies de plantas medicinales.	11
Tabla 2. Producción de AR en diferentes especies y tipos de cultivo <i>in vitro</i> .	14
Tabla 3. Producción de Msec en cultivo de raíces transformadas de diferentes especies de plantas medicinales	18
Tabla 4. Producción de Msec en diferentes especies y cultivos <i>in vitro</i> elicitados con MeJa	23
Tabla 5. Producción de Msec en diferentes especies y cultivos modificando la fuente de nitrógeno en el medio	25
Tabla 6. Incremento en la producción de Msec en diferentes especies cultivadas bajo estrés de fosfato	27
Tabla 7. Incremento en la producción de Msec en cultivos <i>in vitro</i> de diferentes especies cultivadas con modificaciones de sacarosa.	29
Tabla 8. Compuestos y estructuras químicas aislados en la especie <i>L. caulescens</i>	32
Tabla 9. Medio MS modificado en sus concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-}	45

Tabla 10. Porcentaje de transformación en explantes de hoja de <i>L. caulescens</i> inoculados con las cepas ATCC 15834, A4 y k599 de <i>A. rhizogenes</i> .	47
Tabla 11. Rendimientos de los extractos diclorometánicos de raíces transformadas	51
Tabla 12. Acumulación de ácido ursólico y oleanólico en líneas de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i> .	55
Tabla 13. Efecto de la concentración de sacarosa en la acumulación de AU y AO en las raíces transformadas cultivadas durante 4 semanas en medio MS modificado.	67
Tabla 14. Producción de AU y AO en líneas de raíces transformadas de <i>L. caulescens</i> crecidas bajo diferentes concentraciones de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$	74
Tabla 15. Producción de ácido rosmarínico en líneas de raíces transformadas elicitadas con metil jasmonato	82
Tabla 16. Producción de ácido rosmarínico en planta silvestre de <i>L. caulescens</i>	83

RESUMEN

La investigación en plantas medicinales se ha incrementado en los últimos años debido a que más del 80% de la población mundial depende principalmente de la medicina a base de plantas, además de que es una fuente importante para la búsqueda de moléculas bioactivas novedosas. Uno de los principales problemas que presentan las plantas medicinales son los bajos rendimientos, y fluctuaciones en la producción de metabolitos secundarios, por ello se han buscado estrategias para aumentar dicha producción. El cultivo de raíces transformadas es una herramienta que nos permite la producción de metabolitos secundarios de forma estandarizada que en ocasiones es mayor al de la planta silvestre. Aunado a esto, el uso de elicitores como el metil jasmonato (MeJa), y las modificaciones en el medio de cultivo (nitratos, fosfatos y la fuente de sacarosa), son estrategias que han sido estudiadas en diferentes especies ofreciendo resultados positivos en el incremento de compuestos bioactivos.

En esta investigación, se obtuvieron cultivos 15 líneas de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* con una respuesta de transformación del 75% al utilizar la cepa ATCC 15834 de *Agrobacterium rhizogenes* en explantes de hoja de plántulas germinadas *in vitro*. Las 15 líneas fueron productoras de ácido ursólico (AU) y oleanólico (AO), dos de las quince líneas (L1 y L5) fueron seleccionadas para realizar los experimentos de elicitación y modificaciones de nitratos, fosfatos y sacarosa en el medio de cultivo. 45 g/L de sacarosa fue la concentración en la que se observaron mejores resultados en la producción de biomasa y acumulación de los compuestos de interés. La modificación de NO_3^- y PO_4^{3-} en el medio de cultivo no causaron un efecto positivo en la producción de biomasa y acumulación de AU y AO en los cultivos de raíces transformadas. En los tratamientos de elicitación con MeJa, el mayor rendimiento de AU en L1 se obtuvo con 300 μM de MeJa y un tiempo de exposición de 24 h (0.201 mg/g de peso seco); para L5, 300 μM de MeJa durante 24 h fue el mejor tratamiento con 0.22 mg/g de peso seco. El rendimiento de AO para L1 fue de 0.22 mg/g de peso seco en el tratamiento control de 72 h, mientras que para L5 fue de 0.24 mg/g de peso seco elicitando los cultivos por 24 h con una concentración de 300 μM de MeJa. Con respecto a la acumulación de ácido rosmarínico, la mayor acumulación para L1 fue al elicitar los cultivos por 24 h con una concentración de 100 μM de MeJa obteniéndose un rendimiento de 85.48 ± 1.32 mg/g de peso seco. Para L5 la acumulación de AR fue de 60.27 ± 0.88 mg/g de peso seco en el tratamiento elicitado por 24 h con una concentración de 200 μM de MeJa.

ABSTRACT

Research in medicinal plants has increased in the last few years due to more than 80% of world's population relies on herbal medicine, also because is one of the main source for the discovery of new bioactive compounds. One of the main problems that medicinal plants present is low yields and fluctuations in the production of secondary metabolites. For this reason, strategies have been searched to increase their production. The transformed roots cultures are a tool that allows us a higher secondary metabolites standardized production than in the wild plant. In addition, the use of elicitors such as methyl jasmonate (MeJa) and modifications in the culture medium (nitrates, phosphates, and the source of sucrose) are strategies that have been studied in different species and offer positive results for the increase of bioactive compounds.

In this research, transformed roots cultures of *Lepechinia caulescens* were obtained with a transformation response of 75% using *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834 *in vitro* germinated seedling leaf explants. The 15 lines were producers of ursolic (AU) and oleanolic (AO) acid, two of the fifteen lines (L1 and L5) were selected to carry out the experiments of elicitation and modifications of nitrates, phosphates and sucrose in the culture medium. 45 g/L of sucrose was the concentration in which the best results were observed in biomass production and accumulation of the compounds of interest. The modification of NO_3^- and PO_4^{3-} in the culture medium did not cause a positive effect on biomass production and accumulation of UA and AO in the transformed roots cultures. In the elicitation treatments with MeJa, the highest yield of UA in L1 was obtained with 300 μM of MeJa with an exposure time of 24 h (0.201 ± 0.00 mg/g dry weight); for L5, 300 μM of MeJa during 24 h was the best treatment with 0.22 ± 0.00 mg/g of dry weight. The AO yield for L1 was 0.22 ± 0.00 mg/g of dry weight in the 72 h control treatment, while in L5 it was 0.24 ± 0.00 mg/g of dry weight, eliciting the cultures for 24 h with a concentration of 300 μM of MeJa. Regarding the accumulation of rosmarinic acid (RA), the highest accumulation for L1 was recorded when the cultures were elicited for 24 h with 100 μM MeJa, obtaining a yield of 85.48 ± 1.32 mg/g of dry weight. For L5, the accumulation of AR was 60.27 ± 0.88 mg/g of dry weight in the treatment elicited for 24 h with 200 μM MeJa.

I. INTRODUCCIÓN

La demanda de metabolitos secundarios (Msec) derivados de plantas ha aumentado en todo el mundo. En Medio Oriente, América Latina, África y Asia más del 85% de la población emplea la medicina tradicional, especialmente, medicamentos elaborados a base de plantas. En la Unión Europea, aproximadamente 100 millones de personas, recurren al uso de esta medicina tradicional. Las investigaciones en plantas medicinales cada vez son mayores; algunas especies que se consideran venenosas actualmente han sido bastante estudiadas debido a los compuestos que producen y la importancia farmacológica que tienen. Los terpenos junto con los compuestos fenólicos son considerados dentro de los grupos de Msec de mayor importancia de entre los 100, 000 de compuestos reportados para el reino vegetal.

Uno de los problemas a los que se enfrenta la producción de Msec son los bajos rendimientos en algunas especies medicinales, su sistema de cultivo y la presencia de estructuras químicas tan complejas que es difícil realizar una síntesis química 100% eficiente, por lo que se han buscado estrategias biotecnológicas en las cuales se pueden obtener rendimientos superiores a los de la planta silvestre, así como una acumulación de Msec en cualquier época del año de forma constante sin estar a expensas de las condiciones ambientales como sucede de manera natural.

El cultivo de raíces transformadas provee varias ventajas como ciclos cortos de crecimiento, procesos estandarizados de producción, así como de una calidad de extractos controlable, además de poder escalar su cultivo a biorreactores para tener una producción mayor.

Lepechinia caulescens es una planta medicinal distribuida en gran parte de México, usada de manera tradicional para contrarrestar infecciones gastrointestinales, en el tratamiento de la dismenorrea, hipertensión, diabetes, vómito y diarrea. Dentro de los compuestos identificados en esta planta, encontramos los ácidos ursólico, oleanólico y rosmarínico, los dos primeros ya registrados en cultivo de callos de esta misma especie.

En el presente trabajo, utilizamos la modificación de nutrientes en el medio de cultivo, específicamente los nitratos y fosfatos, la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y la aplicación de metil jasmonato en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, todo esto con la finalidad de incrementar la producción de los compuestos de interés.

II. ANTECEDENTES

II.1 Plantas medicinales, una fuente importante de metabolitos secundarios

Todos los organismos a través de vías metabólicas necesitan transformar e interconvertir una gran cantidad de compuestos orgánicos que le permitirán, vivir, crecer y reproducirse; todo esto lo realizan a través de una red integrada de enzimas específicas y reacciones químicas cuidadosamente reguladas dentro de diversas rutas metabólicas ([Dewik, 2002](#)).

Las plantas al igual que otros organismos sésiles poseen características especiales para defenderse y protegerse tanto de las condiciones ambientales como del ataque de patógenos, ya que ellas no pueden huir ni tampoco poseen un sistema inmunológico para combatir patógenos, por lo que éstas deben sintetizar una enorme variedad de compuestos, llamados Msec ([Wink, 2010](#)).

La biosíntesis de Msec comienza en vías metabólicas básicas como la glucólisis o del ácido shikímico, diversificándose posteriormente en gran medida según el tipo de célula, tejido u órgano, la etapa de desarrollo y las condiciones ambientales ([Broun et al. 2006](#); [Patra, et al. 2013](#)), Estas últimas influyen en la producción y acumulación de Msec durante el crecimiento y desarrollo, ya que, la planta deberá realizar cambios en su morfología, anatomía y funciones fisiológicas para responder a los factores bióticos y abióticos, y así lograr su supervivencia y reproducción ([Ma y Zhang, 2010](#)).

Aproximadamente 100,000 Msec están presentes en el reino vegetal limitados a grupos taxonómicos específicos ([Fang, et al. 2011](#)). Existen tres grupos principales de metabolitos secundarios, terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Fig.1).

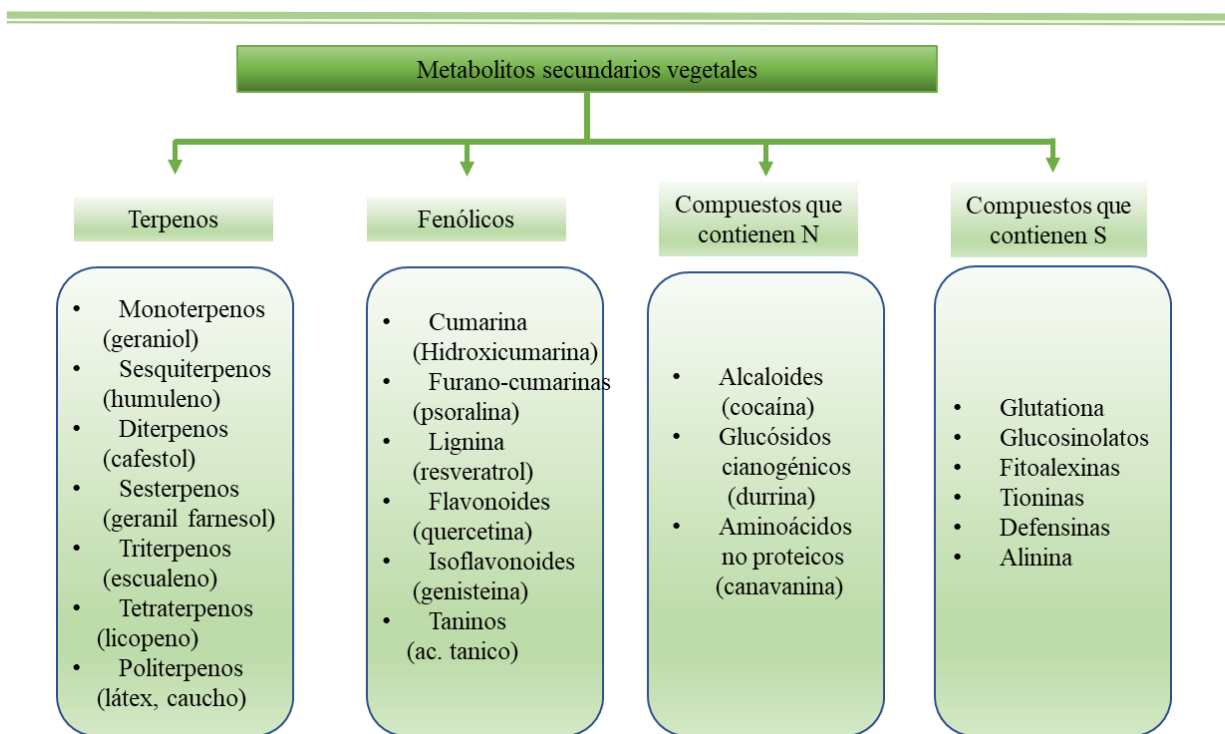


Figura 1. Clasificación de metabolitos secundarios vegetales. Los compuestos entre paréntesis son ejemplos de cada subgrupo, tomado y modificado de [Jamwal, et al. 2018](#).

Los Msec tienen una distribución mucho más delimitada que los metabolitos primarios en todo el reino vegetal, es decir, con frecuencia se encuentran sólo en una especie de planta o en un grupo de especies relacionadas taxonómicamente ([Jamwal, et al. 2018](#)). Algunos Msec de las plantas son constitutivos y, están presentes en sus formas biológicamente activas en plantas sanas. Otros son precursores inactivos y se activan en respuesta a algún daño en el tejido o al ataque de fitopatógenos. En el diccionario de productos naturales se encuentran registrados 33,000 compuestos terpenoides, 16,000 alcaloides y 8,182 flavonoides ([Jain, et al. 2019](#)). Hablaremos enseguida de las características de cada grupo de compuestos.

II.1.1 Terpenos.

Los terpenos son considerados como el grupo de Msec vegetales más importantes y ampliamente distribuidos en varias especies de plantas a nivel mundial. Químicamente, los terpenos son hidrocarburos insaturados disponibles principalmente en resinas y aceites

esenciales. Este grupo de Msec, generalmente se compone de unidades de isopreno que se producen a partir de acetyl-CoA a través de la vía del ácido mevalónico (MVA) ([Velu, et al. 2018](#)). Los diferentes tipos de terpenos (Fig. 1) producidos por las plantas, son usados en la defensa como toxinas y restricción de alimentación contra una gran cantidad de insectos y mamíferos que utilizan las plantas como alimento. Estos compuestos, también son importantes en la dieta humana, ayudando a la prevención y tratamiento contra varias enfermedades, entre ellas el cáncer ([Jamwal, et al. 2018](#)); además de sus aplicaciones en perfumería y productos cosméticos ([Pavlov y Bley 2018](#)).

La vía biosintética de los terpenos se puede describir en cuatro etapas:

La primera implica la formación de isopentenil pirofosfato (IPP), la unidad biológica de isopreno (C5). Las plantas sintetizan IPP y su isómero alílico, dimetil alil difosfato (DMAPP), por una de las dos vías: la conocida MVA o la vía del Metileritritol fosfato (MEP). En la segunda etapa, las unidades C5 básicas se condensan para generar tres difosfatos de prenilo más grandes, Geranil difosfato (GPP, C10), Farnesil difosfato (FPP, C15) y Geranilgeranil difosfato (GGPP, C20). En la tercera etapa, los difosfatos C10-C20 se someten a una amplia gama de ciclizaciones y reordenamientos para producir los esqueletos de carbono parentales de cada clase de terpenos. GPP se convierte en monoterpenos, FPP se convierte en sesquiterpenos y GGPP se convierte en diterpenos. FPP y GGPP también se pueden dimerizar en forma directa para formar los precursores de los Tri y Tetraterpenos, C30 y C40, respectivamente. La cuarta y última etapa abarca una variedad de oxidaciones, reducciones, isomerizaciones, conjugaciones y otras transformaciones mediante las cuales los esqueletos parentales de cada clase de terpenos se convierten en miles de metabolitos terpénicos distintos ([Ashour, et al. 2018](#), Fig. 2).

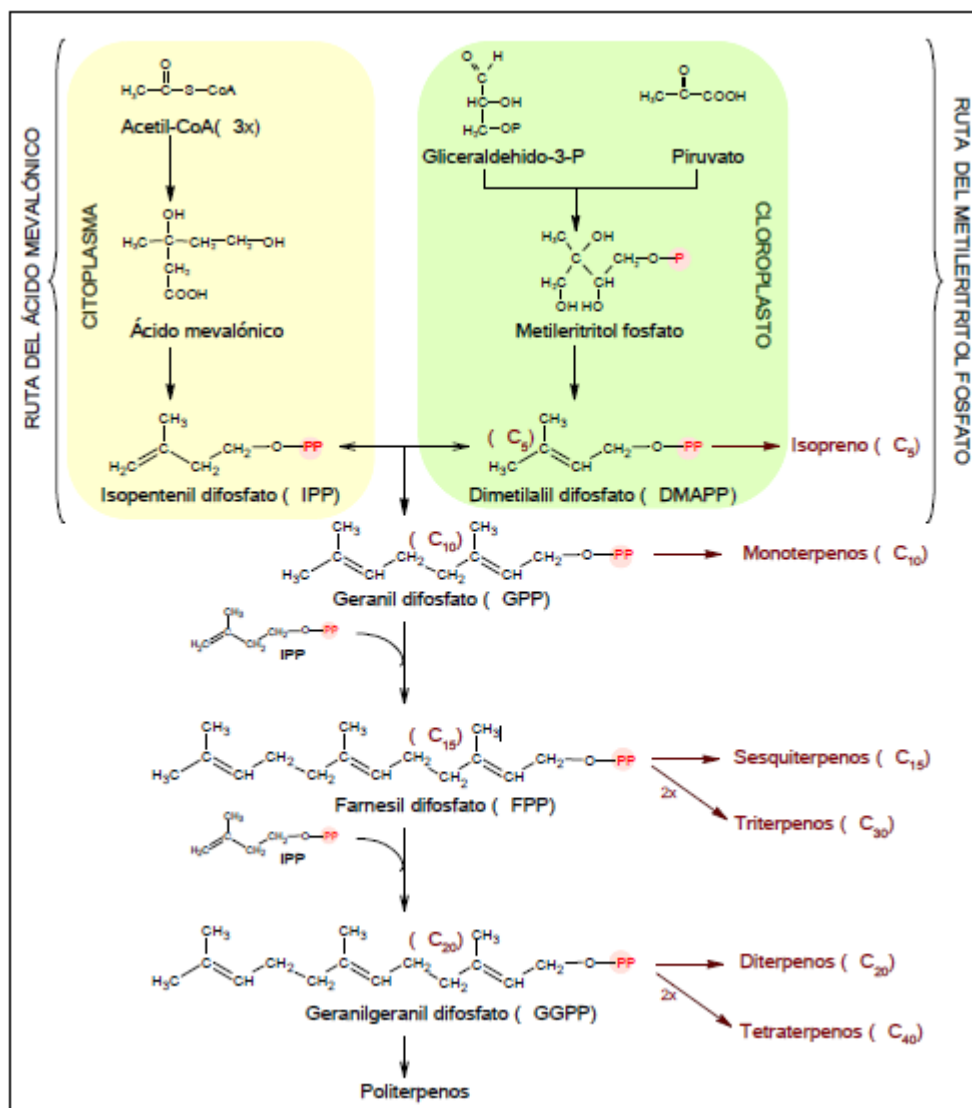


Figura 2. Síntesis de terpenos y su clasificación de acuerdo a las unidades de isopreno.

Los monoterpenos importantes incluyen mentol, eugenol y alcanfor que, según se informa, tienen muy buenas propiedades antioxidantes. Las resinas y el taxol son del grupo de los diterpenos que tienen actividad anticancerígena. Los triterpenos incluyen glucósidos cardíacos como el ácido ursólico, y esteroides los cuales tienen actividad citotóxica, sedante y antiinflamatoria (Martínez et al. 2008).

Los recientes avances en la investigación fitoquímica sobre terpenos han demostrado importantes actividades farmacológicas de las moléculas de este grupo para el tratamiento y

manejo de enfermedades ([Velu, 2018](#)). De los triterpenos más estudiados encontramos a los triterpenos tetracíclicos, como los cicloartanos, damaranos, eufanos y protostanos, también los triperpenos pentacíclicos, entre ellos, los gamaceranos, hopanos, lupanos, oleanos y ursanos ([Shanmugam, et al. 2014](#)). El ácido oleanólico (AO) y el ácido ursólico (AU), pertenecen a estos dos últimos grupos de compuestos.

II.1.2 Ácido ursólico y ácido oleanólico, triterpenos de importancia farmacológica

Los triterpenos, son un grupo de compuestos altamente distribuidos en la naturaleza y abundantes en plantas medicinales, especialmente en hojas, corteza, frutos y semillas (Phillips, et al. 2016 y [Laszczyk, 2009](#)). De acuerdo con el número de unidades de isopreno, los triterpenos pueden ser acíclicos, mono, bi, tri, tetra y pentacíclicos. Los triterpenos pentacíclicos tienen seis unidades de isopreno con una fórmula básica de $C_{30}H_{48}$. Se sintetizan en plantas a partir de una ciclización del escualeno, vía el intermediario, 2,3 óxido escualeno; el cual es considerado un compuesto común para todos los ácidos triterpénicos (Fig. 3), y los productos dependen de la ciclasa específica. La β -amirina sintasa (también denominada β -amirina-ciclasa), se encarga de formar la β -amirina, la cual por oxidación del grupo metilo en el carbono 17 es convertida a ácido oleanólico ([Dewick, 2009](#)); mientras que la α -amirina sintasa, es la enzima encarga de producir α -amirina, precursor del AU ([Misra, et al. 2014](#)).

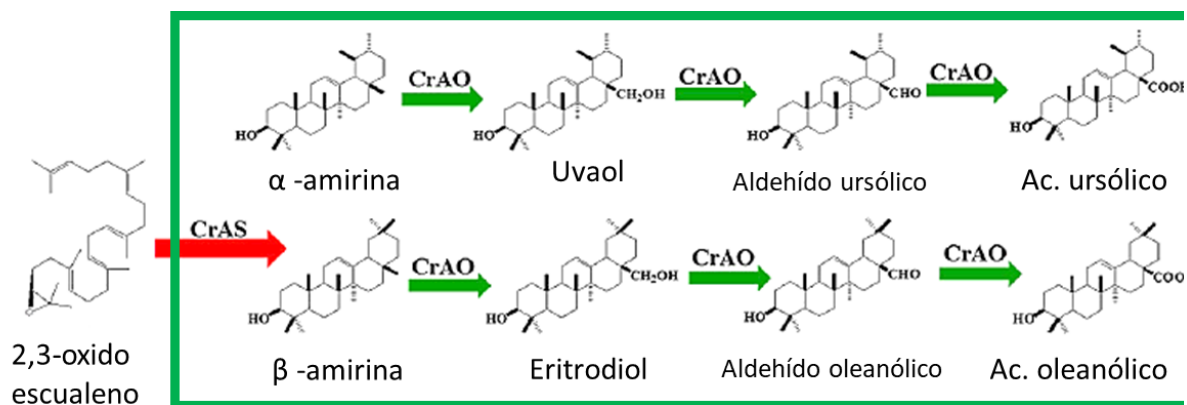


Figura 3. Vía de biosíntesis de AU y AO propuesta por [Huang, et al. 2012](#) en *Catharanthus roseus*. Las enzimas CrAS y CrAO corresponde a *C. roseus* mezcla de amirina sintasa y *C. roseus* amirina C-28 oxidase respectivamente.

El AU (Ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico; Fig. 4a) y AO (Ácido 3 β -hidroxioleano-12-en-28-oico; Fig. 4b) son triterpenos pentacíclicos pertenecientes a la familia de los cicloescualenos.

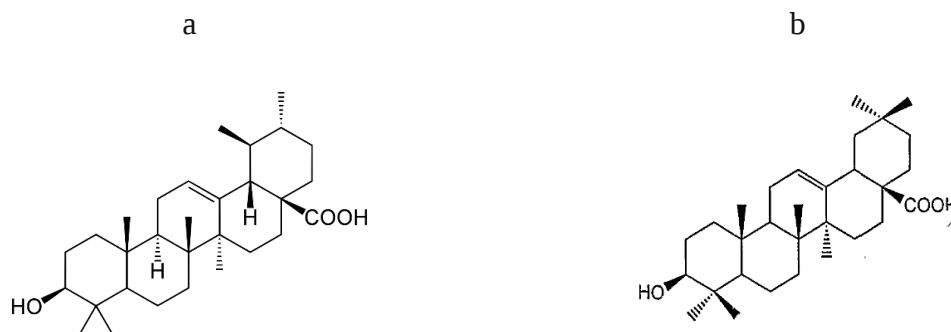


Figura 4. Estructuras químicas de los triterpenos pentacíclicos a) ácido ursólico y b) ácido oleanólico

El AU y AO se encuentran en varias especies de plantas medicinales, incluyendo *L. caulescens* ([Vergara, et al. 2017](#)). Este compuesto ha sido estudiado y se han comprobado varias actividades biológicas como antiinflamatoria ([Zerin, et al. 2016](#)), antioxidante ([Bacanli, et al. 2017](#)), hepatoprotectora ([Gutiérrez-Rebolledo, et al. 2016](#)), tripanocida ([Eloy, et al. 2015](#)), nefroprotectora ([Ding, et al. 2015](#)), cardioprotectora ([Senthil, et al. 2007](#)), antidiabética ([GuzmánÁvila, et al. 2018](#)), y antiviral ([Khwaza, et al. 2018](#)).

El AO abundante en el olivo (*Olea europea*) de ahí su nombre, ha sido detectado en más de 1600 especies de plantas, la mayoría de ellas consideradas como plantas medicinales, entre ellas *Arctostaphylos uva-ursi*, *Calluna vulgaris*, *Crataeva nurvala*, *Sambucus chinensis*, y *Solanum incanum*. El AO se encuentra en la naturaleza, al igual que su isómero, el AU en forma de ácido libre o como aglicona de saponinas terpénicas, además de glicósidos con uno o más azúcares.

Uno de los problemas que presentan estos compuestos al igual que muchos en la naturaleza, es su baja producción y en la gran mayoría de las veces depende de las condiciones ambientales en que la planta se desarrolle, debido a esto se han propuesto alternativas como lo es el cultivo de tejidos vegetales, en las cuales se puede mantener una producción estable y en algunas

ocasiones superior a las reportadas en las plantas silvestres. A continuación, en la tabla 1 se muestran algunos reportes del contenido de AU y AO en plantas medicinales y cultivos *in vitro*.

Tabla 1. Producción de AU y AO en distintos cultivos y especies medicinales.

Especie	Tipo de cultivo	AU mg/g peso seco	AO mg/g peso seco	Referencia
<i>Uncaria tomentosa</i>	Células en suspensión	0.55		Feria-Romero, et al. 2005
<i>Salvia officinalis</i>	Planta silvestre	38.3	15.6	Janicsák, et al. 2006
<i>Salvia fruticosa</i>	Planta silvestre	22.5	7.5	Kummritz, et al. 2014
		31.1	10.8	Kummritz, et al. 2014
<i>Salvia virgata</i>	Planta silvestre	3.5	2.9	Janicsák, et al. 2006
		27.5	5.5	Kummritz, et al. 2014
<i>Salvia officinalis</i>	Células en suspensión	1.53	1.64	Hass, et al. 2014
<i>Olea europea</i>	Hojas “Arbequina”	2.0	29.2	Guinda, et al. 2010
<i>Olea europea</i>	Hojas “Hojiblanca”	2.2	36.6	Guinda, et al. 2010
<i>Ocimum sanctum</i>	Hojas	11.21		Vetal, et al. 2012
<i>Morinda panamensis</i>	Hojas	0.082		Coral, 2013
<i>Lepechinia caulescens</i>	Hojas	16.58	3.89	Vergara et al. 2017

II.2 Ácido rosmarínico, una molécula de importancia biológica

Los compuestos fenólicos (flavonoides y fenilpropanoides) junto con los compuestos que contienen nitrógeno (glucósidos cianogénicos, alcaloides y glucosinolatos) y los terpenos

(isoprenos), son considerados como los tres grupos mayores de Msec, de entre los 100,000 de compuestos presentes en el reino vegetal ([Li, et al. 2020](#)). Los compuestos fenólicos son producidos en respuesta como defensa de las plantas a las condiciones ambientales. Los ácidos fenólicos como ácido rosmarínico (AR), ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido litospermico y ácido cinámico son producidos a través de la vía de los fenilpropanoides ([Hao, et al. 2016](#), Fig. 5).

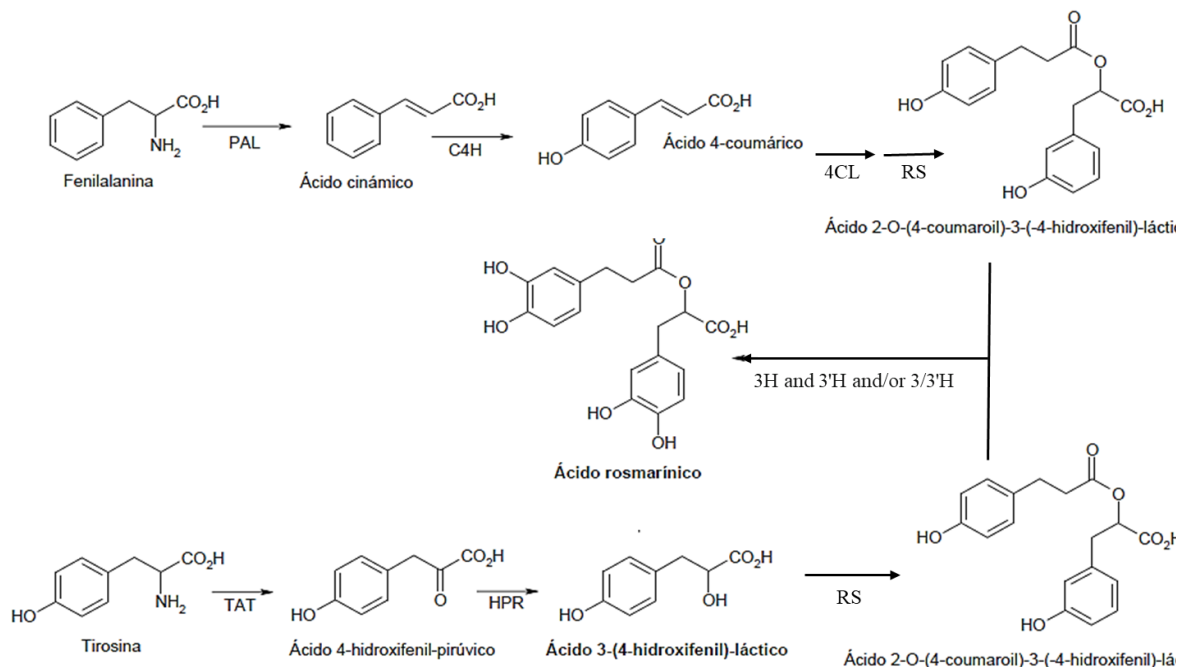


Figura 5. Ruta biosintética propuesta para la formación del ácido rosmarínico PAL: Fenilalanina-amonio-liasa; C4H: Cinámico-4-hidroxilasa; 4CL: 4-coumárico-CoA-ligasa; TAT: Tirosina-aminotransferasa; HPR: Hidroxifenilpiruvato-reductasa, 3-H, 30-H 3- y 30-hidroxilasa (tomada y modificada de [Geller, et al. 2010](#)).

La desaminación de fenilalanina por la enzima fenil amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés), genera ácido cinámico, el cual es convertido por la 4-hidroxilasa y *p*-cumarato 3-hidroxilasa en ácido cafeico como un intermediario importante de la vía de fenilpropanoides. La transformación de tirosina a ácido 4-hidroxifenil láctico es catalizado por las enzimas de la vía derivada de tirosina, la tirosina aminotransferasa (TAT) y 4-hidroxifenil piruvato reductasa (HPPR). En el siguiente paso, el 4-cumaroil-CoA y el ácido 4-hidroxifenil láctico son los productos resultantes de la enzima ácido rosmarínico sintasa (RAS), los cuales se conjuntan en

las dos vías de síntesis de AR, la vía de los fenilpropanoides y la derivada de tirosina. La síntesis del AR es finalizada por la actividad de las enzimas 3-hidroxicinnamoil (3-H) y 3'-hidroxicinnamoil (3'-H) hidroxilasas (Fig. 5) ([Kanatt, et al. 2007](#); [Bimakr, et al. 2011](#); [Bayan y Küsek 2018](#); [Petersen, et al. 2009](#)).

El AR (Fig. 6) es un éster del ácido cafeico y del ácido 3, 4-dihidroxifenil láctico. Se ha descubierto en especies de la familia Boraginaceae y subfamilia Nepetoideae de la familia Lamiaceae (Petersen and Simmonds, 2003). Se aisló e identificó por primera vez por dos químicos italianos, Scarpati y Oriente en 1958 a partir de *Rosmarinus officinalis* ([Petersen, 2013](#)).

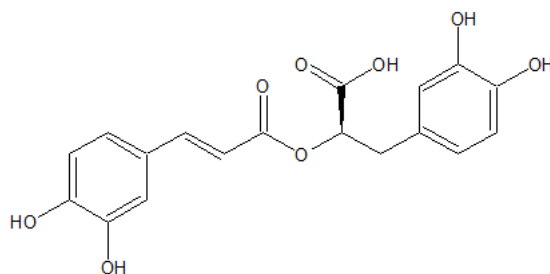


Figura 6. Estructura química del ácido rosmarínico.

La presencia de AR en plantas medicinales, hierbas y especias se ha asociado con efectos beneficiosos y promotores de la salud. En las plantas, la función del AR es la de actuar como un compuesto de defensa acumulado y en los seres humanos tiene una serie de actividades biológicas como antivirales, antibacterianas, antiinflamatorias, anti mutagénicas y antioxidantes. El AR tiene una toxicidad muy baja y se elimina rápidamente de la circulación sanguínea después de la administración intravenosa ([Petersen y Simmonds, 2003](#); [Elufioye y Habtemariam, 2019](#)).

Debido a sus importantes actividades biológicas, el AR, ha sido motivo de investigaciones biotecnológicas en las cuales el principal objetivo es el de encontrar sistemas de producción de dicho metabolito; en las plantas, el AR puede encontrarse en todos los órganos y en diferentes cultivos *in vitro* (brotes, raíces adventicias, raíces transformadas, callos y células en suspensión)

que en algunas ocasiones se encuentra en mayores cantidades que en las especies silvestres ([Petersen, 2013](#)). En la tabla 2, se muestran algunos ejemplos de la producción de AR en diferentes especies y cultivos.

Tabla 2. Producción de AR en diferentes especies y tipos de cultivo *in vitro*.

Especie	Tipo de cultivo	AR mg/g peso seco	Referencia
<i>Ocimum basilicum</i>	Raíces adventicias	40.5	Biswas, 2020
<i>Salvia viridis</i> L.	Brotes	2.4–11.5	Grzegorzcyk-Karolak, et al. 2019
<i>Agastache rugose</i>	Callos	11.5	Xu, et al. 2008
<i>Salvia viridis</i>	Raíces transformadas	35.8	Grzegorzcyk-Karolak et al. 2018
<i>Dracocephalum forrestii</i>	Raíces transformadas	19.97	Weremczuk-Jeżyna, et al. 2016
<i>Salvia przewalskii</i> Maxim.	Raíces transformadas	44.02	Li, et al. 2020
<i>Salvia officinalis</i>	Células en suspensión	1.53	Hass, et al. 2014
<i>Ocimum basilicum</i>	Células en suspensión	10	Kintzios, et al. 2003
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Raíces transformadas	15	Xing, et al. 2018
<i>Salvia wagneriana</i> Polak	Raíces transformadas	0.213	Ruffoni et al. 2016
<i>Agastache rugosa</i> Kuntze	Raíces transformadas	116	Lee, et al. 2008

<i>Mentha spicata</i>	Raíces transformadas	0.55	Yousefian, et al. 2020
-----------------------	----------------------	------	--

De acuerdo con las actividades reportadas, el AR puede tener un gran potencial para mejorar la salud humana, mejorar el rendimiento cognitivo, previniendo el desarrollo de la enfermedad del Alzheimer, los efectos cardioprotectores, reducción en la gravedad de enfermedades renales y la quimio prevención del cáncer. El conocimiento más preciso del AR podría contribuir a su uso apropiado para curar y prevenir una amplia gama de problemas de salud ([Ferreira, et al. 2103](#); [Trócsányi, et al. 2020](#)).

Como hemos observado, la producción de Msec de plantas medicinales es muy importante, de ahí la importancia de buscar nuevas alternativas de producción utilizando herramientas biotecnológicas, como lo es el caso del cultivo de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*.

II.3 Raíces transformadas, un sistema para la producción de metabolitos secundarios

La enfermedad denominada “hairy roots” en plantas superiores, es consecuencia de la infección producida en la célula vegetal por *Agrobacterium rhizogenes*, una bacteria Gram-negativa del suelo perteneciente a la familia Rhizobaceae. Un fragmento de DNA de la bacteria, denominado T-DNA es transferido al genoma de la planta. Este T-DNA contenido en el plásmido denominado root-inducing (Ri) es el causante de la infección ([Rawat, et al. 2019](#)).

Los genes presentes en el T-DNA del plásmido Ri de *A. rhizogenes* (Fig. 7) participan en la conjugación, iniciación, transferencia e integración de T-DNA, y en la biosíntesis de opinas. Dependiendo de la cepa de *Agrobacterium*, el T-DNA tiene un tamaño entre 10 y 30 kb, flanqueado por secuencias de 25 pb, altamente homólogas y repetidas, necesarias para la transferencia del T-DNA ([Bulgakov, 2008](#)).

Las cepas de *Agrobacterium*, en su gran mayoría contienen un solo T-DNA, sin embargo, algunas contienen dos T-DNA independientes (como los que tienen plásmido Ri de tipo agropina), denominados TL-DNA y TR-DNA. El TR-DNA es altamente homólogo con el T-DNA del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, mientras que el TL-DNA es notablemente diferente

siendo este homólogo con el T-DNA transportado por el plásmido Ri de la cepa de *A. rhizogenes* del tipo manopina. Ambos T-DNA se transfieren e integran de manera independiente en el genoma de la planta huésped, siendo esencial la transferencia del TL-DNA para la inducción del síndrome de raíz pilosa, mientras que la transferencia del TR-DNA no provoca formación de raíces a partir de cultivos transformados ([Georgiev, et al. 2007](#)).

La región TL-DNA está compuesta por cuatro genes *rol* (“root loci”), llamados normalmente *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*, los cuales están involucrados directamente en la inducción del fenotipo de raíces pilosas. De este conjunto de loci, el gen *rolB* es de gran importancia en la diferenciación de las células transformadas, así como en la inducción de raíces pilosas por la hidrólisis de las auxinas conjugadas resultando en niveles altos intracelulares de ácido indol-3-acético. La contribución del gen *rolA* es en el desarrollo y la morfología de la raíz. *rolC* es responsable de la reducción y acortamiento de la dominancia apical, y el gen *rolD*, del cual no se tiene evidencia de algún efecto sobre el metabolismo secundario, participa en el crecimiento de las raíces pilosas, así como en la floración de plantas transformadas ([Rawat, et al. 2019](#)). En general, todos estos oncogenes (*rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolD*) ya sea solos o en combinación, están implicados en el crecimiento, desarrollo y metabolismo secundario de raíces pilosas y plantas transformadas ([Bulgakov, 2008](#)).

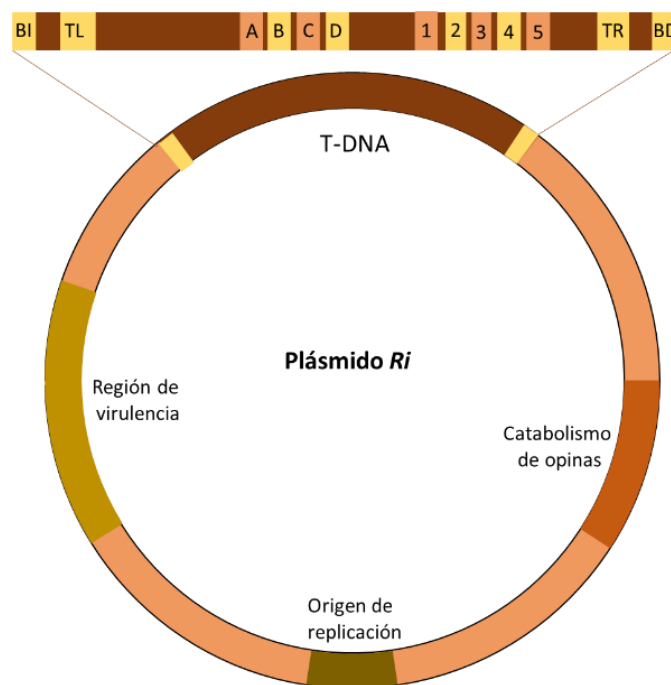


Figura 7. Representación esquemática del plásmido Ri de *A. rhizogenes* (modificado de [Chandra, 2012](#)). BI: Borde izquierdo; TL: DNA de transferencia izquierdo A, B, C y D: genes *rol A*, *B*, *C* y *D* respectivamente; 1: *mas1'* y 2: *mas2'* genes responsables de la síntesis de manopinas; 3: *ags* gen responsable de la síntesis de agropina; 4: *iaaH* y 5: *iaaM* genes responsables de la síntesis de auxinas; TR: DNA de transferencia derecho BD: Borde derecho.

El cultivo de raíces transformadas es considerado un sistema de producción de Msec estable, sin embargo, existen estudios en los que se indica que la inserción de todos o alguno de los genes *rol* repercute en la producción de metabolitos secundarios, así como en el fenotipo del cultivo de raíces transformadas. En raíces transformadas de tabaco obtenidas con la cepa A4 de *A. rhizogenes*, [Moyano y colaboradores](#) (1999) obtuvieron dos morfologías diferentes de raíces, la primera fue un cultivo típico de raíces pilosas con una alta capacidad de producción de alcaloides, y la segunda fueron unas raíces parecidas a callos con un rápido crecimiento y baja producción de alcaloides. En las raíces con formación de callo fue localizado el gen *aux1* localizado en el TR-DNA de *A. rhizogenes*, mientras que en las raíces con crecimiento típico dicho gen sólo se detectó en un 25-60 % de las raíces establecidas. Este estudio demostró el

papel y la importancia de los genes *aux* en la morfología típica de las raíces transformadas “hairy roots”. [Mallol y colaboradores](#) (2001) también reportaron un estudio en raíces transformadas de *Panax ginseng* en el cual los genes localizados en el TR-DNA tienen un efecto sobre la morfología de la raíz pilosa y en la producción de metabolitos secundarios.

En general podemos decir que la expresión de los genes *rol*, así como el T-DNA insertado en la planta hospedera causan una alteración en la morfología, así como en el metabolismo secundario ([Chandra, 2012](#)). Los Msec son una clase de moléculas presentes en las plantas que, a pesar de no ser esenciales para la vida, le proveen un mejor estado físico, estas moléculas regulan el equilibrio hormonal, regulan genes y además están involucrados en la defensa contra daños de tipo biótico y abiótico ([Mauro, et al. 2017](#)).

Dentro de los problemas que se presentan en las plantas medicinales para la producción de Msec son la dificultad del cultivo así como los bajos rendimientos, además muchas de estas moléculas presentan estructuras complejas que son difíciles de realizar a través de una síntesis química, es por ello la necesidad de buscar estrategias biotecnológicas como lo es el cultivo de raíces transformadas, este sistema de cultivo presenta varias ventajas entre ellas ciclos cortos de crecimiento, procesos estandarizados de producción así como de una calidad controlable, aunado a esto, es posible escalar este cultivo a biorreactores para tener producciones mayores, tanto de biomasa como de Msec. La tabla 3 nos muestra algunos de los Msec producidos en cultivo de raíces transformadas de plantas medicinales.

Tabla 3. Producción de Msec en cultivo de raíces transformadas de diferentes especies de plantas medicinales.

Msec	Especie	Referencia
Ácidos fenólicos	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Yan, et al. (2006)
	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Xiao, et al. (2010)
Paclitaxel	<i>Taxus x media var.</i>	Syklowska-Baranek, et al. (2009)

Triterpenos	<i>Centella asiatica</i>	Kim, et al. (2010)
Catarantina	<i>Catharanthus roseus</i>	Wang, et al. (2010)
Ginsenosido	<i>Panax quinquefolius</i>	Mathur, et al. (2010)
Alcaloide benzilisoquinolina	<i>Macleaya cordata</i>	Huang, et al. (2018)
Estilbeno	<i>Nicotiana tabacum</i>	Hidalgo, et al. (2017)
	<i>Arachis hypogaea</i>	Pilaisangsuee, et al. (2018)
Witanolido A, Witanona, y Witaferina A	<i>Withania somnifera</i>	Sivanandhan, et al. (2013)
Diterpenos	<i>Salvia sclarea</i>	Kuzma, et al. (2009)
Ácido rosmarínico	<i>Coleus blumei</i>	Baue,r et al. (2009)
	<i>Prunella vulgaris</i>	Ru, et al. (2016)

En general, la producción de Msec en cultivo de raíces transformadas está controlada por la acumulación de biomasa y por el rendimiento y contenido de metabolitos. La acumulación de biomasa está influenciada por los parámetros que controlan el crecimiento y la multiplicación de células / órganos cultivados, mientras que el rendimiento y contenido de metabolitos es controlado por diversos factores que influyen en la biosíntesis de Msec ([Murthy, et al. 2014](#)).

Existen diversas estrategias que ayudan a incrementar tanto la biomasa como la producción de metabolitos, entre ellas se encuentran es el uso de “elicitores”, los cuales causan cierto tipo de estrés en el cultivo beneficiando con esto el rendimiento de algún metabolito en particular.

II.4 Elicitación, una estrategia para el incremento de metabolitos secundarios

Una de las limitaciones que presentan los sistemas de cultivos de tejidos vegetales son los bajos rendimientos de Msec. Se sabe que las funciones principales de los Msec en plantas son protegerlas de ataques de insectos, herbívoros y patógenos, así como también para sobrevivir a

estreses tanto bióticos como abióticos. Estos principios de defensa de las plantas han servido como base para desarrollar estrategias para incrementar la producción de Msec. Dichas estrategias incluyen tratamiento con varios elicitores, compuestos de señalización y estrés abiótico ([Zhao, et al. 2005](#)).

Por tal motivo, el término “elicitación” es descrito como una de las estrategias para incrementar la producción de Msec, lo cual implica la manipulación de las vías bioquímicas y metabólicas a través de la inducción de “estrés”, sirviendo esto como modelo para entender y caracterizar la función de los factores de estrés en cultivos de células y tejidos vegetales (Dörnenburg and Knorr 1995). La definición del término “estrés” se refiere a cualquier factor ya sea biótico o abiótico que modifica tanto positiva o negativamente el funcionamiento, crecimiento o reproducción de la planta. Dentro de los factores abióticos tenemos como ejemplos la salinidad, deficiencia de nutrientes, radiación excesiva (luz ultravioleta, radiación solar), sequía, inundaciones, temperaturas extremas de frío o calor, pH del suelo y contaminantes antropogénicos. Dentro de los factores bióticos podemos citar como ejemplo la herbivoría causada por vertebrados e invertebrados herbívoros, así como también enfermedades causadas por microbios como hongos, bacterias y virus, y la competencia entre otras especies ([Cheynier, et al. 2013](#)).

Los diferentes tipos de estrés en general provocan estímulos que hacen responder a la planta activando o regulando una cascada de señalización, seguido de la modulación de la maquinaria de expresión de genes conduciendo a la síntesis de proteínas de respuesta a estrés o de compuestos bioactivos de gran importancia. Cuando la membrana de la planta reconoce las señales de estrés, moléculas de señalización endógenas como ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (AJ), ácido salicílico (AS) y etileno (ET) regulan el sistema de defensa tanto sinérgica como antagónicamente ([Ismail, et al 2011](#)).

Para determinar la eficacia para un buen rendimiento de biomasa y acumulación de Msec, se deben seguir varias estrategias y tomar en consideración varios parámetros en un tratamiento de elicitación, como el tipo de elicitador, concentraciones, duración de exposición, programa de tratamiento, tipo de cultivo, línea celular, medio composición, presencia o ausencia de regulación del crecimiento, y edad o etapa del cultivo ([Halder, et al. 2019](#)).

Las diferentes opciones que existen de elicitación han sido usadas en el sistema de cultivo de células y tejidos vegetales, el cual como se ha mencionado, tienen un potencial limitado para aumentar la producción de Msec debido a su naturaleza indiferenciada principalmente. De esta manera, en un sistema de raíces transformadas, la producción de metabolitos secundarios se puede incrementar a través de la manipulación en la composición de los nutrientes en el medio, la fuente de nitrógeno y el tipo y concentración de la fuente de carbono ([Sivanesan y Murugesan 2008](#); [Mehrotra, et al. 2015](#)). Además, existen reportes en los cuales también se emplean elicitors de tipo biótico y abiótico con el mismo objetivo de incrementar la producción de metabolitos de interés, algunos de los más utilizados son MeJa, AJ, AS, polisacáridos, extractos de levadura u hongos, metales pesados, entre otros ([Vasanthaiah y Kambiranda, 2011](#)). En el presente trabajo, utilizamos la modificación de nutrientes en el medio de cultivo, específicamente los nitratos y fosfatos, la concentración de sacarosa en el medio de cultivo y la aplicación de metil jasmonato en diferentes concentraciones y tiempos de exposición, todo esto con la finalidad de incrementar la producción de los compuestos de interés.

II.4.1 Metil jasmonato, un elicitor en la producción de Msec de plantas medicinales

El jasmonato fue identificado y purificado por primera vez en la forma de éster metílico, llamado metil-jasmonato, esto se logró utilizando flores de *Jasmin grandiflorum*. En *Arabidopsis* la metilación es catalizada por la ácido jasmónico carboxil metiltransferasa con la participación del S-adenosil L-metionina ([Seo, et al. 2001](#)).

El ácido jasmónico y su derivado éster MeJa, son sintetizados a partir del ácido linolénico (Fig. 8) ([Yendo, et al. 2010](#)). Ambos compuestos actúan como segundos mensajeros en procesos fisiológicos desencadenando respuestas de defensa (incluida la biosíntesis de Msec) contra ataque de fitopatógenos y herbívoros, facilitando así la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales.

MeJa es una hormona vegetal que funciona como una molécula señal clave que afecta varias funciones bioquímicas y fisiológicas, provocando varios efectos sobre la tolerancia de la planta tanto a estreses bióticos como abióticos ([Takahashi y Hara 2014](#)).

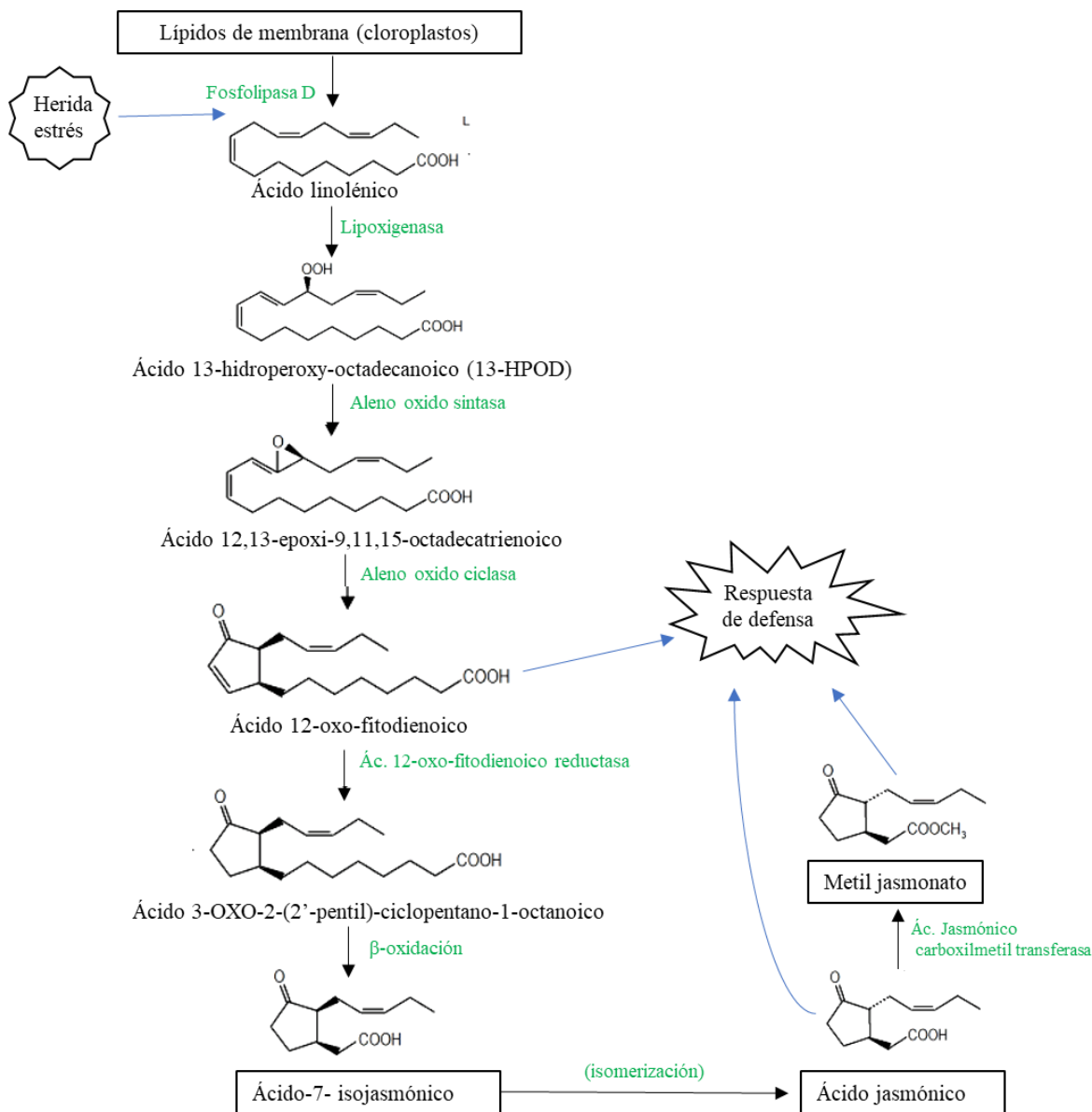


Figura 8. Síntesis de ácido jasmónico y metil jasmonato a partir del ácido linolénico. Tomado y modificado de [Yu, et al. 2019](#) y [Cheong y Choy, 2003](#).

Como regulador de crecimiento vegetal, el MeJa afecta la germinación de las semillas, el crecimiento de las raíces, el gravitropismo, la formación de tricomas, el desarrollo embrionario,

el desarrollo de la plántula, la formación de tubérculos, la maduración de frutos, la senescencia de la hoja y la acumulación de compuestos fenólicos ([Yu, et al. 2019](#)).

La aplicación exógena de MeJa, tiene diferentes efectos, en los que podemos resumir los siguientes:

- * Activa la expresión de genes de defensa, como genes relacionados con patogénesis, inhibidores de proteinasas y proteínas antifúngicas ([Zhu y Tian, 2012](#)).
- * Afecta los sistemas antioxidantes, como las actividades de las enzimas relacionadas con la defensa ([Hristova y Popova, 2002](#)).
- * Induce la acumulación de compuestos de defensa (como compuestos fenólicos)
- * Regula la fotosíntesis como el cierre de estomas ([Yu, et al. 2019](#)).

Debido a la estimulación que producen los jasmonatos sobre las células y tejidos, al emular un estrés biótico o abiótico, que repercute en alteraciones y modificaciones de las actividades genéticas y bioquímicas, estos son utilizados tanto en plantas completas como en cultivos *in vitro* para incrementar los rendimientos de los Msec. En algunos casos, la aplicación de elicitores promueve la biosíntesis de Msec no detectados previamente en la planta o en sus cultivos ([Caretto, et al. 2011](#); [Akula y Ravishankar, 2011](#)). En la tabla 4 se presentan algunos estudios realizados en diferentes cultivos de especies medicinales, en los cuales es empleado el MeJa para incrementar la acumulación de metabolitos secundarios de valor farmacéutico.

Tabla 4. Producción de Msec en diferentes especies y cultivos *in vitro* elicitados con MeJa.

Msec	Especie	Concentración de MeJa usado p/elicitación	Cultivo	Referencia
Tanshinonas	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	100 µM	Raíces transformadas	Liang et al. 2012
Contenido total de fenólicos y flavonoides	<i>Artemisia absinthium</i>	1.0 mg/l	Células en suspensión	Pérez-Hernández, et al. 2019

Ginsenosidos	<i>Panax ginseng</i>	10 µM	Raíces transformadas	Choi, et al. 2005
Ácido betulínico	<i>Ocimum basilicum</i> , <i>Ocimum kilimandscharicum</i> , <i>Ocimum sanctum</i> , <i>Ocimum grattisimum</i>	200 µM	Callos	Pandey, et al. 2015
Ác. rosmarínico	<i>Eryngium planum</i> L	100 µM	Callos	Kikowska, et al. 2012
Triptolido	<i>Tripterygium wilfordii</i>	50 µM	Raíces transformadas	Zhu, et al. 2014
Dopamina	<i>Portulaca oleracea</i>	100 mM	Raíces transformadas	Moghadam, et al. 2014
Alcaloides de morfina	<i>Papaver orientale</i>	100 µM	Raíces transformadas	Hashemi, et al. 2016
Saponinas	<i>Eryngium planum</i> L	100 µM	Plántulas y callos	Kikowska, et al. 2019
AU y AO	<i>Ocimum basilicum</i>	2500 µM	Plantas completas	Misra, et al. 2017

La concentración de MeJa influye en la acumulación de compuestos bioactivos debido a los diferentes mecanismos tanto fisiológicos como bioquímicos que causa en las plantas, sin embargo, todos estos efectos siempre varían de acuerdo a factores como concentración del elicitor utilizado, tiempo de exposición, tipo de cultivo en el que se utiliza y sobre todo la especie que se trabaje ([Yu, et al. 2019](#))

II.5 Modificación de nutrientes en el medio de cultivo para el incremento de biomasa y Msec

La acumulación de biomasa y Msec en el cultivo in vitro de órganos y células vegetales está influenciado por diversos factores como son el tipo de medio basal, las sales mayores en el

medio, el tipo y niveles de carbohidratos, nitrato, fosfato y reguladores de crecimiento ([Murthy, et al. 2014](#)).

Las sales de nitrato y amonio son las principales fuentes de nitrógeno soluble. Diversos estudios indican que el nitrato es la forma preferida que conduce a un incremento en la acumulación de sustancias bioactivas ([Dlugoz, et al. 2018](#)). Su asimilación se puede realizar mediante transporte activo a través de transportadores especializados; así como transporte pasivo, en el cual los iones de amonio pueden migrar a través de canales iónicos ([Taylor y Bloom, 1998](#)).

En los cultivos de células vegetales, la fuente de nitrógeno afecta significativamente la proliferación de células vegetales, el crecimiento de la raíz y la producción de Msec ([Zhang, et al. 2011](#)).

Existen diferentes estudios relacionados con la modificación en la fuente de nitrógeno y se ha observado que los resultados obtenidos sobre la producción de Msec, en la gran mayoría de los casos depende de la especie de estudio, líneas y sistemas de cultivo, en algunos casos, se ha observado claramente la influencia del nitrato en la producción de alcaloides ([Bensaddek et al. 2001](#); [Chashmi, et al. 2008](#)), en otros estudios, los niveles reducidos de amonio, combinados con un aumento en los nitratos, favoreció el incremento de triterpenos ([Praveen 2011](#); [2013](#)); y la eliminación del nitrato en el medio de cultivo, indujo una mayor acumulación de compuestos orgánicos en *Chrysanthemum cinerariaefolium* ([Rajashekaran, et al. 1991](#)).

En la tabla 5 podemos observar el incremento de diferentes Msec al modificar la fuente de nitrógeno en diferentes cultivos y especies.

Tabla 5. Producción de Msec en diferentes especies y cultivos modificando la fuente de nitrógeno en el medio.

Msec	Especie	Tratamiento	Cultivo	Referencia
Asiaticósidos	<i>Centella asiatica</i>	Reducción de nitrógeno total (40 mM)	Brotes	Rozita, et al. 2005

Escopoletina, tomentina y ác. esferálcico	<i>Sphaeralcea angustifolia</i>	Nitrogeno total 2.42 mM/ alta concentración de cobre (2.35 μ M)	Células en suspensión	Pérez-Hernández, et al. 2019
Saponinas	<i>Talinum paniculatum</i> Gaertn.	Incremento de nitrato de amonio (3800 mg/l)	Raíces transformadas	Manuhara, et al. 2015
Compuestos fenólicos	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Reducción de nitratos e incremento de amonio	Plantas completas	Kováčik y Klejdus, 2014
Ác. rosmarínico	<i>Lavandula vera</i>	Iones de amonio (0.09 gr/L)	Raíces transformadas	Ilieva y Pavlov 1999
Ác. rosmarínico	<i>Mentha aquatica</i>	Nitrogeno (15 mM)	Raíces transformadas	Yousefian, et al. 2020
Wilforgina y wilforina	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Ammonio/nitrato 10:50 y 0.3125 mM de fosfato	Raíces transformadas	Zhang, et al. 2020
Compuestos fenólicos	<i>Salvia viridis</i>	Diferentes medios MS, B5 y WP	Raíces transformadas	Grzegorzczuk-Karolak 2020
Withanolido-A	<i>Withania somnifera</i>	37.60 mM de NO_3^-	Células en suspensión	Nagella, y Murthy, 2011
Saponinas	<i>Panax quinquefolium</i>	40 mM de NO_3^-	Células en suspensión	Zhang y Wang, 2011

Como se observa en los distintos estudios realizados, se debe tener un balance total de nitrógeno, tomando en consideración la relación de nitrato y amonio utilizada en los medios de cultivo para obtener un buen rendimiento de biomasa y una mayor acumulación de Msec en las diferentes especies de plantas medicinales.

Otro de los macronutrientes esenciales para un buen desarrollo de la planta es el fosfato inorgánico, ya que es indispensable para varias moléculas funcionales involucradas en muchos procesos fisiológicos en las plantas ([Peret, et al. 2011](#)).

Se conoce que la concentración de fosfato en un medio basal utilizado para el cultivo de raíces transformadas no necesariamente ofrece un buen crecimiento y producción de Msec. En diferentes estudios se ha observado que una concentración óptima de este compuesto depende de la especie (tabla 6), algunos autores afirman que muchas veces una concentración de fosfato en donde se obtiene una mayor acumulación de Msec podría no favorecer el crecimiento y la biomasa en el cultivo de raíces pilosas ([Shinde, et al. 2010](#); [Praveen y Murthy 2013](#); [Liu, et al. 2016](#))

Tabla 6. Incremento en la producción de Msec en diferentes especies cultivadas bajo estrés de fosfato.

Msec	Especie	Tratamiento	Cultivo	Referencia
Isoflavonas	<i>Psoralea corylifolia</i>	Reducción de fosfato (0.625 mM)	Raíces transformadas	Shinde, et al. 2010
Betalainas	<i>Beta vulgaris</i>	Reducción de fosfato	Raíces transformadas	Pavlov e Ilieva 2005
Compuestos fenólicos	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Reducción de fosfato (0.0124 mM)	Raíces transformadas	Liu, et al. 2016
Compuestos fenólicos y tanshinonas	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Reducción de fosfato (0.062 mM)	Raíces transformadas	Liu, et al. 2018
Gingenosidos	<i>Panax ginseng</i>	Reducción de fosfato (1.25 mM)	Raíces transformadas	Huang, et al. 2010
Ácido cicórico	<i>Echinacea purpurea</i>	Ausencia de fosfato	Raíces transformadas	Salmanzadeh, et al. 2020

Fenilpropanoides, flavonoides, y glucosinolatos	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Reduccion de fosfato	Raíces transformadas	Pant, et al. 2015
Saponinas	<i>Panax notoginseng</i>	Aumento de fosfatos (3.75 mM)	Células en suspensión	Zhang y Zhong 1997

Diversos estudios han demostrado que el estrés por limitación de fosfato trae como consecuencia una mayor acumulación de Msec, debido a que el crecimiento se detiene y se dejan de producir metabolitos primarios para dar paso a la producción de Msec ([Salmanzadeh et al. 2020](#)).

De acuerdo con varios estudios, se ha determinado que la nutrición de fosforo afecta varias vías metabólicas asociadas con piruvato, glucosa, sacarosa y almidón. Al mismo tiempo, las condiciones de inanición de fosfato inorgánico resultan en un decremento en los niveles de azúcares fosforilados en plantas, debido probablemente a las bajas cantidades de fructoquinasa y hexoquinasa ([Park, et al. 2012](#); [Dietz y Foyer, 1986](#); [Rychter y Randall, 1994](#)).

II.6 Modificación en la fuente de carbono

La fuente de carbono es de suma importancia para un buen crecimiento y productividad en los cultivos. La sacarosa es una de las fuentes de carbono más utilizada en el cultivo de tejidos vegetales, es considerada la principal fuente de energía y un componente importante en la biosíntesis de Msec ([Praveen y Murthy, 2012](#); [Nagella, et al. 2013](#)).

En diferentes estudios se ha observado que la producción de biomasa está directamente relacionada con el consumo de azúcares ([Wu y Zhong, 1999](#)).

Asimismo, la producción de Msec está influenciada por la concentración de sacarosa utilizada en los diferentes sistemas de cultivo de tejidos, en algunas especies una mayor concentración de sacarosa favorece el incremento en el rendimiento de los Msec. En la tabla 7 se presentan las concentraciones de sacarosa empleadas para incrementar el contenido de Msec en cultivos de raíces transformadas de plantas de interés medicinal.

Tabla 7. Producción de Msec en cultivos *in vitro* de diferentes especies cultivadas con modificaciones de sacarosa.

Msec	Especie	Tratamiento	Cultivo	Referencia
Gingenosidos y polisacáridos	<i>Panax ginseng</i>	Sacarosa 4 y 6%	Raíces adventicias	Huang, et al. 2010
Ácidos fenólicos	<i>Pelargonium sidoides</i>	Sacarosa 3%	Raíces transformadas	Yousefian, et al (020
Azadiractina	<i>Azadirachta indica</i>	Sacarosa 4%	Raíces transformadas	Srivastava y Srivastava, 2012
Plumbagina	<i>Plumbago europaea</i>	Sacarosa 2-3 %	Raíces transformadas	Beigmohamadi, et al. 2020
Gingenósidos	<i>Talinum paniculatum</i>	Sacarosa 5%	Raíces transformadas	Manuhara, et al. 2015
AU y AO	<i>Salvia fruticosa</i>	Sacarosa 3%/ <i>Trichoderma virens</i>	Células en suspensión	Kümmritz, et al. 2016
Compuestos fenólicos	<i>Momordica charantia L</i>	Sacarosa 3%	Raíces transformadas	Thiruvengadam, et al. 2015
Glucósido esteviol	<i>Stevia rebaudiana (Bert.)</i>	Sacarosa 10%	Raíces adventicias	Ahmad, et al. 2021

Se conoce que la concentración de sacarosa tiene gran influencia en el crecimiento de las raíces transformadas, sin embargo, su efecto como sustrato debe distinguirse de su papel físico como soluto activo osmótico en el medio y como modulador de la expresión génica ([Lourenço, et al. 2002](#)).

Como se puede observar en los diferentes estudios descritos en la tabla anterior, la concentración de sacarosa tiene efectos significativos en el crecimiento de las raíces y la producción de

metabolitos secundarios, sin embargo, se puede concluir que la concentración óptima de sacarosa en los medios de cultivo para obtener mayores rendimientos de biomasa y producción de Msec es muy variable y depende de las diferentes especies de plantas ([Beigmohamadi, et al. 2019](#)).

II.7 Generalidades de *Lepechinia caulescens*

L. caulescens es una planta herbácea perteneciente a la familia Lamiaceae, se caracteriza por ser perenne, y a menudo formar colonias extensas; su tallo es ascendente, hasta de 80 cm de alto, simple o poco ramificado, levemente pubescente; hojas con pecíolos hasta de 6 cm de largo, las superiores sésiles, limbo ovado a ovado-lanceolado, de 2.5 a 15 cm de largo por 1.5 a 7 cm de ancho, ápice agudo o acuminado, margen crenado, base cuneada a truncada, escasamente pubescente; inflorescencia en forma de espiga terminal apretada, brácteas anchamente ovadas, acuminadas; cáliz acampanado, de 6 a 8 mm de largo, hasta de 12 mm en fruto, dientes linear-lanceolados, pilosos, con puntitos resinosos, cristalinos; corola blanca, de 7 a 9 mm de largo; estambres insertos en el tubo de la corola, inclusos; pericarpio ovoides, de más o menos 2 mm de largo, lisos de color negro (Fig. 9) ([Rzedowski, 2001](#)).



Figura 9. Espécimen de la planta de *Lepechinia caulescens* en el sitio de colecta. Fotografía tomada por M. en B. Victor M. Vergara Martínez

Esta especie se distribuye ampliamente en las partes montañosas más húmedas del Valle de México, a una altura entre los 2250 y 3300 metros sobre el nivel del mar (msnm). En bosque de coníferas mixtos, en claros cercanos a los bosques y a veces a la orilla de arroyos o cerca de cultivos.

Podemos encontrar a *L. caulescens* distribuida en varios estados del país como son Chihuahua, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y el Estado de México ([Rzedowski, 1987](#)).

II.7.1 Uso de *L. caulescens* en la medicina tradicional

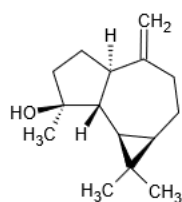
L. caulescens, también llamada “bretónica”, es usada en la medicina tradicional mexicana para contrarrestar infecciones gastrointestinales, en el tratamiento de la dismenorrea, hipertensión, la diabetes, vómito y diarrea ([Pérez-Hernández et al. 2008](#) y [Ávila-Acevedo, et al. 2005](#); [Alarcón-Aguilara, et al. 1998](#)). También, es empleada como abortivo y en el tratamiento de enfermedades de los riñones. Además, hace parte de las plantas usadas en baños de temazcal para contener la hemorragia postparto, el cólico del puerperio y de la menstruación ([Monroy-Ortíz y Castillo-España, 2007](#)).

Investigaciones farmacológicas sobre *L. caulescens* reportan sus efectos espasmolítico ([Estrada-Soto, et al. 2007](#) y [Pérez-Hernández, et al. 2008](#)) y antihipertensivos ([Estrada-soto, et al. 2012](#)), su actividad vasorelajante ([Aguirre-Crespo et al. 2006](#)), anti-*Vibrio cholerae* ([Avila-Acevedo, et al. 2004](#)) y efectos anti-hiperglucémicos ([Alarcón-Aguilara, et al. 1998](#); [Andrade-Cetto, et al. 2005](#)).

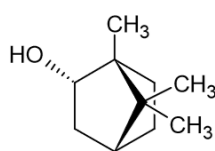
II.7.2 Compuestos químicos en *L. caulescens*

Debido a los diferentes usos que se le atribuyen a esta especie, se han realizado varios trabajos de interés químico, en los cuales se aislaron compuestos como flavonoides ([Delgado, et al. 1994](#)), esteroles y ácido abietanoico ([Aguirre-Crespo, et al. 2006](#)). En la tabla 8 podemos observar todos los compuestos registrados para esta especie.

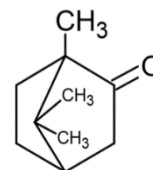
Tabla 8. Compuestos y estructuras químicas aislados en la especie *L. caulescens*.



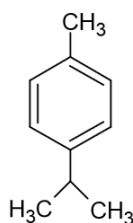
Espatulenol



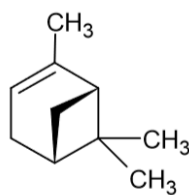
Borneol



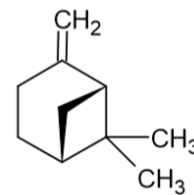
Canfor



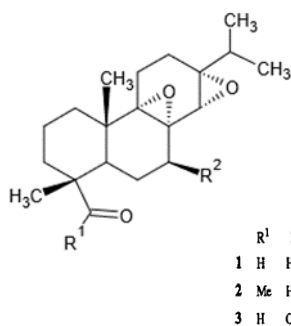
p-cimeno



α-pineno



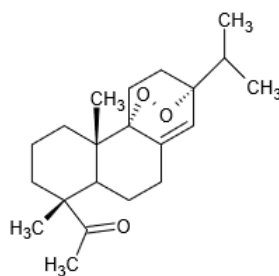
β-pineno



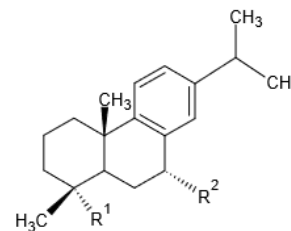
R¹=R²=H; Ácido 8α, 9α, 13α, 14α-diepoxiabietan-18-oico.

R¹=CH₃; R²=H: Ácido 8α(9α), 13α(14α)-diepoxiabietan-18-oato de metilo.

R¹=H; R²=OH: Ácido 7β-hidroxi 8α, 9α, 13α, 14α-diepoxiabietan-18-oico.

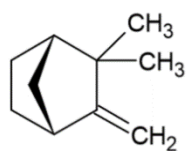


Ácido metil éster 9α, 13α-epidioxiabiet-8(14)-en-18-oico.

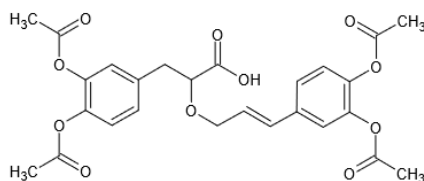


3 R¹ = CO₂H, R² = H
4 R¹ = CH₂OH, R² = OH

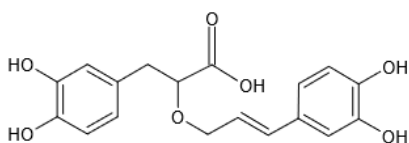
Ácido dehidroabiético (3) y alcohol 9β-hidroxidehidroabietol (4)



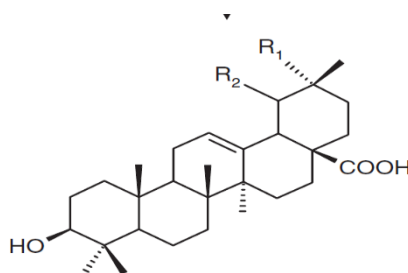
Canfeno



Ácido tetracetil rosmarínico



Ácido rosmarínico



R₁ = H; R₂ = CH₃ (Ursolic acid)
R₁ = CH₃; R₂ = H (Oleanolic acid)

Ácido ursólico y Ácido oleanólico

[Delgado, et al. 1994](#); [Pérez-Hernández, et al. 2008](#); [Castillo-Romero, 2004](#); [Aguirre-Crespo, et al. 2006](#).

Dentro de los compuestos mencionados en el cuadro anterior AU, AO y AR, son compuestos de importancia biológica encontrados en varias especies de la familia Lamiácea.

II.7.3 Antecedentes biotecnológicos en *L. caulescens*

Debido a los compuestos de importancia farmacológica encontrados en esta especie, se han establecido diferentes sistemas de cultivos in vitro en los cuales se han obtenido la producción de AU y AO. Vergara 2013, estableció un cultivo de callos a partir de explantes de hojas provenientes de plántulas germinadas in vitro, utilizando medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con reguladores de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 6-Bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 2 mg/L y 0.1 mg/L respectivamente. En los extractos metanólicos íntegros de dichos callos, se logró observar en cromatografía en capa fina, compuestos con Factor de Retardo (RF) similares a los estándares de AU y AO. En 2017, [Vergara](#) y colaboradores, comprobaron la presencia de AU y AO por HPLC en los cultivos de

callos y lograron incrementar la producción de dichos compuestos utilizando MeJa y ácido salicílico como elicitores en los cultivos, los mejores tratamientos fueron al utilizar 50 μ M de MeJa durante 8 h y 50 mg/L de ácido salicílico.

JUSTIFICACION

Las bajas concentraciones de compuestos bioactivos que producen las plantas medicinales hacen necesaria la búsqueda de alternativas de producción de compuestos con actividades biológicas. Una alternativa para esto es el uso de la biotecnología vegetal, siendo el cultivo de raíces transformadas una estrategia viable debido a las características que presentan, entre ellas el rápido crecimiento de la biomasa, la estabilidad genética y la alta producción de metabolitos secundarios que produce comparada con las plantas silvestres y en algunos estudios se ha observado la síntesis de nuevos compuestos con mayor potencial farmacológico.

Lepechinia caulescens es una planta medicinal distribuida en gran parte del territorio mexicano, tradicionalmente usada por los pobladores para contrarrestar infecciones gastrointestinales, vómito y diarrea, en el tratamiento de la dismenorrea, hipertensión, y diabetes. Estudios farmacológicos han comprobado la actividad antihipertensiva y antidiabética atribuida a *L. caulescens*. Dentro de los compuestos identificados en la planta, encontramos ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido rosmarínico, tres compuestos que han sido motivo de estudio debido a las diferentes actividades biológicas y farmacológicas que presentan, para tratar y prevenir diversas enfermedades. Es por ello que en este trabajo se estableció un sistema de cultivo de raíces transformadas productoras de ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido rosmarínico bajo condiciones de estrés, las cuales se han reportado que ayudan a incrementar la producción de metabolitos secundarios. En este sentido, los cultivos fueron elicitados con metil jasmonato, una molécula señal importante para el incremento de metabolitos secundarios en diferentes cultivos *in vitro*, además de realizar modificaciones en el medio de cultivo en la fuente de nitrógeno, fosfato y sacarosa, elementos importantes para potencializar la producción de biomasa y compuestos bioactivos.

HIPÓTESIS

Las cepas de *A. rhizogenes* ATCC 15834, A4 y K599 son capaces de transformar explantes de *L. caulescens* y generar cultivos de raíces pilosas productoras de AU, AO y AR.

La modificación en la concentración de sacarosa y de los iones NO_3^- , PO_4^{3-} el medio de cultivo, así como el uso de MeJa como elicitador, promueven el incremento de la biomasa y acumulación de AU, AO y AR en los cultivos de líneas transformadas de *L. caulescens*.

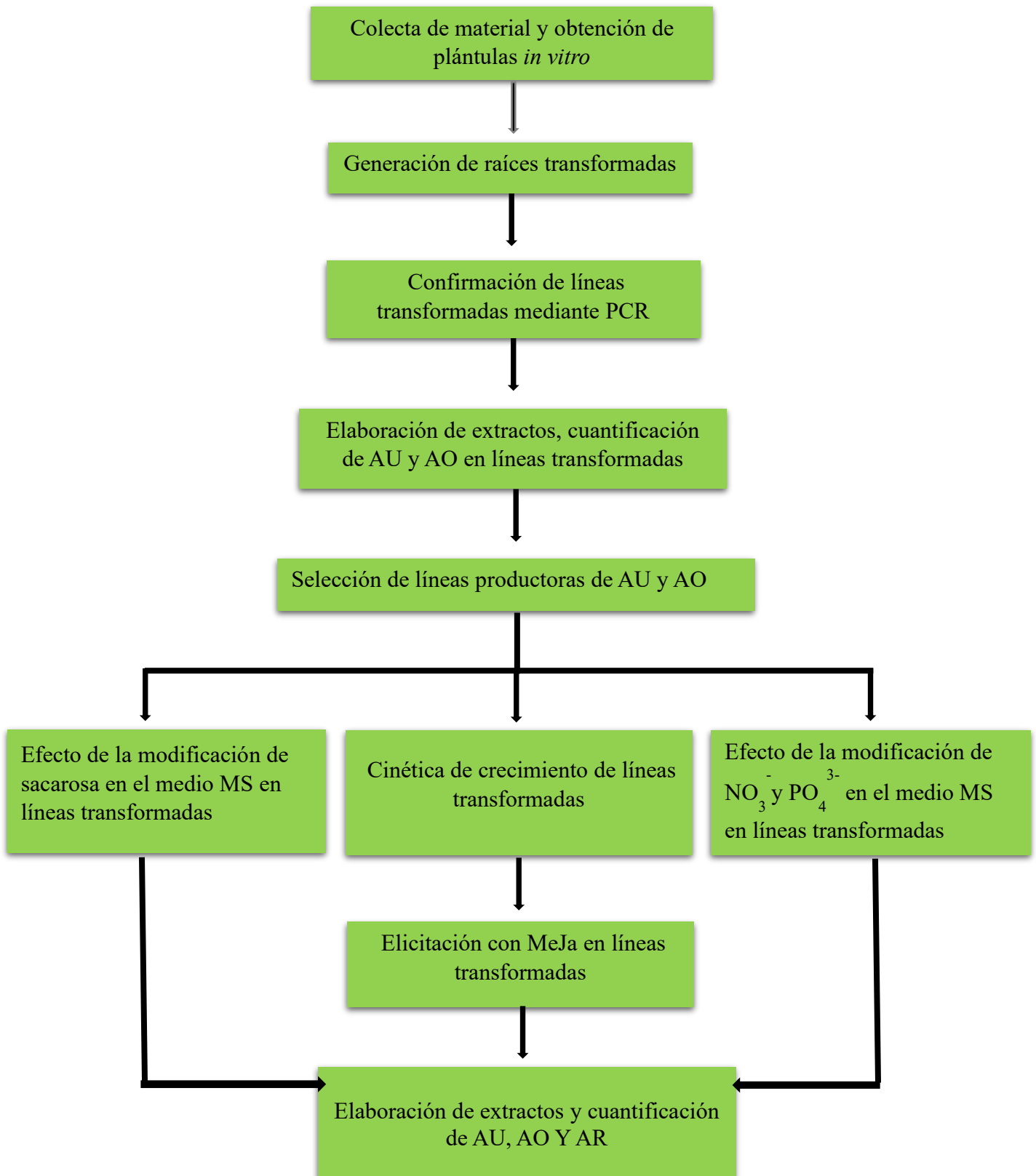
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la modificación de sacarosa, NO_3^- , PO_4^{3-} y metil jasmonato en cultivos de líneas de raíces transformadas de *L. caulescens* para la producción de biomasa y acumulación de AU, AO y AR.

Objetivos Particulares.

- Establecer e identificar los cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* productoras de AU, AO y AR, así como determinar los parámetros cinéticos del cultivo.
- Evaluar el efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de biomasa y acumulación de AU y AO en cultivos de raíces de *L. caulescens*.
- Evaluar el efecto de la concentración de NO_3^- , PO_4^{3-} sobre la producción de biomasa y acumulación de AU y AO en cultivos de raíces de *L. caulescens*.
- Evaluar el efecto de elicitación con metil jasmonato en diferentes concentraciones y tiempo de exposición sobre la producción de biomasa y acumulación de AU y AO en cultivos de raíces de *L. caulescens*.
- Determinar el rendimiento de AU, AO y AR en planta silvestre de *L. caulescens*.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y METODOS

VII.1 Colecta de material vegetal

Plantas silvestres y semillas maduras de *L. caulescens* fueron colectadas en la comunidad de Tlalnepantla, localizada en los límites del Estado de Morelos con el Estado de México (carretera Federal Cuautla-Xochimilco) a una altitud de 2823 msnm. Un ejemplar de la especie fue herborizado e identificado taxonómicamente, quedando registrado con número 32444 en el herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

VII.2 Desinfestación y escarificación de semillas de *L. caulescens*

Mediante el método de flotación se seleccionaron las semillas para la germinación *in vitro*, el cual consistió en colocarlas en un contenedor con agua durante una hora, luego las semillas flotantes fueron eliminadas y con la ayuda de una pinza de disección se seleccionaron solo aquellas que precipitaron y permanecieron firmes al tacto al ser presionadas con las pinzas. La desinfección de la superficie de las semillas se realizó en la campana de flujo laminar, el primer paso consistió en un enjuague con Tween 20 durante 1 min, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril, el siguiente paso, fue colocar una solución de etanol al 70% durante un minuto, transcurrido este tiempo, nuevamente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril. En el siguiente paso se sumergieron las semillas en una solución de hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 50% durante 15 min, ya por último se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces.

Una vez realizado el proceso de desinfección, se llevó a cabo una escarificación mecánica de la semilla, la cual consistió en remover una fracción de la testa con ayuda del bisturí, las semillas desinfectadas y escarificadas fueron sembradas en frascos con medio de cultivo MS ([Murashige y Skoog, 1962](#)) para su germinación. Las plántulas obtenidas después de cuatro semanas fueron utilizadas para la generación de raíces transformadas.

VII.3 Generación de cultivos de raíces transformadas de *L. caulencens*

Para la generación de raíces transformadas se tomaron en consideración los siguientes factores: tipo de cepa de *A. rhizogenes*, densidad óptica del cultivo bacteriano, tiempo de cocultivo y tipo de explante. Las cepas utilizadas de *A. rhizogenes* fueron ATCC 15834, K599 y A4. Los cultivos

bacterianos se evaluaron a dos densidades ópticas (DO) de 0.5 y 0.7 a 600 nm; el tiempo de cocultivo fue de 24 o 72 h y el tipo de explante utilizado fue hoja y peciolo de plántulas germinadas *in vitro* de 4 semanas de edad.

El proceso de transformación genética vegetal consistió en sumergir los explantes por 10 segundos en la solución bacteriana correspondiente a la densidad óptica antes mencionada para cada tratamiento; el excedente de la solución se quitó con ayuda de papel filtro estéril, los explantes fueron cocultivados en cajas de Petri conteniendo medio MS por 24 o 72 h dependiendo del tratamiento, como control se sembraron explantes sin haberlos sumergidos en ninguna solución bacteriana. Transcurrido el tiempo de cocultivo, los explantes se enjuagaron con agua destilada estéril durante un minuto, se secaron en papel filtro estéril y se colocaron en medio semisólido (MS1) compuesto de micro y macronutrientes del medio Murashige y Skoog ([Murashige y Skoog, 1962](#)) adicionado con sacarosa (30 g/l), vitaminas de Gamborg ([Gamborg, et al. 1968](#)), mio-inositol (0.1 g/l), y antibiótico (400 mg/l de cefotaxima y 400 mg/l de ceftriaxona) y gelificado con 3 g/l de phytigel®, pH 5.7. Se colocaron 20 explantes por tratamiento, tomándose como unidad experimental un explante. Los datos de formación de raíces y el número de raíces por explante se registraron cada 5 días durante 4 semanas de cultivo.

El porcentaje de transformación fue calculado con la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de transformación} = \frac{\text{No. de explantes con respuesta}}{\text{No. de explantes totales}} \times 100$$

VII.4 Selección de líneas de raíces transformadas

Las raíces generadas a partir de las diferentes condiciones de infección se individualizaron después de cuatro semanas y fueron sembradas en cajas de Petri con 30 ml de medio MS1 semisólido en condiciones de oscuridad a 25 °C. Las raíces generadas se individualizaron y aquellas que lograron crecer bajo estas condiciones, las denominamos líneas transformadas. Las líneas se multiplicaron en medio MS1 sin antibiótico en las mismas condiciones de cultivo.

VII.5 Mantenimiento de los cultivos de las líneas transformadas

Las líneas de raíces transformadas fueron subcultivadas cada cuatro semanas en frasco tipo “tarro” de 400 ml de capacidad conteniendo 20 ml de medio MS2 constituido de micro y macronutrientes MS adicionado con sacarosa (30 g/l), vitaminas de Gamborg, mio-inositol (0.1 g/l), y gelificado con 0.8 g/l de phytigel®, pH 5.7. Las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente.

VII.6 Confirmación de transformación mediante PCR

Se utilizó un Kit ZR plant/Seed DNA MicroPep™ de ZYMO RESEARCH para la extracción de DNA de los cultivos de las diferentes líneas de raíces transformadas y plántula germinada *in vitro*.

El gen *rolB* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos:

5'ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCCACGA3' y

3'TTAGGCTTCTTTCATTCGGTTTACTGCAGC5'

del cual resulta un fragmento de 780 pb ([Bonhomme, et al. 2000](#)). Como control se utilizó el gen *vir D2*; dicho gen se encuentra fuera de la región del T-DNA del plásmido Ri y no es transferido a la planta, Los siguientes oligonucleótidos específicos se emplearon para la amplificación de un fragmento de 338 pb del gen *vir D2* ([Li, et al. 2016](#)):

5'ATGCCGATCGAGCTCAAGT3' y

3'CCTGACCCAAACATCTCGGCTGCCA5'

Las reacciones de PCR para ambos genes se llevaron a cabo utilizando la Taq DNA polimerasa recombinante (Vivantis) y el termociclador (Axygen Maxygene) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min y 72 °C por 1 min y una extensión final de a 72 °C por 5 min.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados por tinción con bromuro de etidio en un fotodocumentador provisto de un transiluminador de luz ultravioleta (BioDoc-it).

Como control negativo se utilizó DNA genómico de raíces no inoculadas de plántulas de *L. caulescens* y una reacción de PCR en la que se sustituyó el DNA blanco por agua.

VII.7 Obtención de extractos a partir de cultivos *in vitro* de *L. caulescens* y de planta silvestre

Para la obtención de los extractos, se utilizó material seco de planta silvestre (hojas y raíz) y raíces transformadas provenientes de los diferentes tratamientos, para ambos casos la biomasa obtenida fue secada en un horno de secado marca Binder (modelo FD-115) a una temperatura de 30 °C, la biomasa de raíces transformadas fue molida hasta pulverizarla con ayuda de un mortero, para el caso del material silvestre, se utilizó una licuadora para molerla y pulverizarla. Con la biomasa pulverizada se realizaron maceraciones exhaustivas empleando disolventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol) en una relación de 10 ml por cada gramo de biomasa, durante 72 h de maceración (por triplicado). Los extractos obtenidos de la planta silvestre fueron filtrados y concentrados al vacío a presión reducida utilizando un rotaevaporador Heidolph®, para el caso de los extractos obtenidos de raíces transformadas, se filtraron y se dejaron secar en una campana de extracción, ya que el volumen recolectado es poco. Una vez secos, todos los extractos fueron analizados por CLAR.

VII.8 Identificación y cuantificación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La identificación y cuantificación de AU y AO en los extractos diclorometánicos obtenidos (planta silvestre y líneas de raíces transformadas) se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas. Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa C18 X Bridge 2.5 µm (Waters)® (4.6 x 75), el método de separación fue por elución isocrática, como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol:agua ácida (H₃PO₄) 83:17 (v/v), el flujo de trabajo fue de 0.9 ml/min, con un volumen de inyección de 10 µL el tiempo de corrida fue de 22 min y monitoreados a una longitud de onda de 205 nm. Todas las muestras fueron disueltas en metanol grado HPLC.

El método para la identificación y cuantificación de AR en extractos metanólicos obtenidos fue por elución en gradiente, las condiciones para la fase estacionaria son igual a las descritas anteriormente; para el caso de la fase móvil la elución por gradiente se realizó con disolventes A (acetonitrilo) y B (0.1% solución de ácido fórmico). El gradiente fue de la siguiente manera (todas las concentraciones son v/v A:B): 5 min 90:10% A:B; 20 min 74:26% A:B; y 10 min

90:10 A:B%. el flujo de trabajo fue de 1 ml/min, el estándar utilizado fue AR de Sigma Chemical Co (purity: ≥ 90). Los disolventes utilizados fueron grado HPLC. El monitoreo de las muestras se realizó a una longitud de onda de 230 nm y el volumen de inyección fue de 10 μ L.

Una curva de calibración se realizó para cada metabolito evaluado y los resultados de la cuantificación se registraron en mg/g de peso seco de tejido. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANAOVA de una vía, y una prueba de Tukey, todo esto se realizó con el programa Statistica 7.

VII.8.1 Identificación de AR por Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de sílica gel como fase estacionaria, las dimensiones fueron de acuerdo con las muestras analizadas. La fase móvil empleada para el análisis consistió de butanol:metanol:agua, en proporciones 7:2:1 (en volumen) respectivamente. Como reveladores se ocuparon, ácido fosfomolibdico y 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH). Todas las muestras se prepararon al 1% disueltas en metanol. Colocando 4 puntos con ayuda de un capilar tanto de los estándares como cada una de las diferentes muestras que se analizaron. El RF fue calculado con el cociente entre la distancia (b) recorrida por el centro de la mancha y la distancia (a) recorrida simultáneamente por la fase móvil.

$$RF = b/a$$

VII.9 Establecimiento de parámetros cinéticos de crecimiento de dos líneas de raíces transformadas y producción de AU y AO

Se realizó una cinética en cultivo tipo lote inoculando 2 g de raíces (PF) en frascos tipo “tarro” de 400 ml de capacidad con 20 ml de medio MS2. El cultivo se mantuvo en oscuridad a 25 °C durante 30 a 35 días, cada 5 días se realizó una colecta por triplicado. Los parámetros evaluados fueron biomasa (peso fresco y seco), pH, conductividad, consumo de azúcares y acumulación de AU y AO.

Después de cada cosecha las raíces se filtraron con ayuda de un embudo Buchner y una bomba de vacío, registrando el peso fresco (g) con ayuda de una balanza, posteriormente las muestras se secaron en un horno marca Binder (modelo FD-115) a 28 °C durante 48 h, transcurrido este tiempo se registró el peso seco.

La conductividad del medio de cultivo se midió con un conductímetro marca Conductronic, modelo PC18. Por otro lado, la determinación de la concentración de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) se realizó por CLAR, utilizándose una columna Capcell Pak NH₂ UG80 S5 de 4.6 mm x 150 mm de la marca Shiseido, las condiciones utilizadas fueron una fase móvil, 80:20 acetonitrilo:agua y un flujo de operación de 1 ml/min.

VII.10 Efecto de la concentración de sacarosa en cultivos de raíces transformadas

El efecto de la concentración de la sacarosa sobre la producción de biomasa y acumulación de AU y AO en las raíces transformadas se evaluó utilizando 15, 30, 45 y 60 g/l del disacárido en 20 ml de medio MS2 vertido en frascos tipo “tarro” de 400 ml y un inóculo de 2 g (PF). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 25 °C, después de cuatro semanas las raíces fueron colectadas y secadas en un horno marca Binder (modelo FD-115) a 28 °C por 48 h para determinar el peso seco y acumulación de AU y AO. Un análisis de regresión lineal se realizó con las 6 muestras obtenidas de cada línea para determinar el efecto de la sacarosa en la acumulación de biomasa, los datos se analizaron con el programa Statistica 7.0.

VII.11 Efecto de la concentración de NO₃⁻ y PO₄⁻³ en la producción de biomasa y acumulación de AU y AO en raíces transformadas de *L. caulescens*

En el medio MS2 modificado en la concentración de KNO₃, NH₄NO₃ y KH₂PO₄ se sembraron 2 g de peso fresco de raíces transformadas. Después de cuatro semanas de cultivo en las mismas condiciones reportadas anteriormente se determinó el peso fresco y acumulación de AU y AO. En la tabla 9 se observan los dieciséis tratamientos empleados, como control se utilizó el tratamiento B2, el cual contiene la concentración habitual de NO₃⁻ y PO₄⁻³ del medio MS2. El efecto de NO₃⁻ y PO₄⁻³ en la acumulación de biomasa y producción de AU y AO en las diferentes líneas fue analizado mediante un ANOVA de dos vías, y para determinar las diferencias significativas entre los diferentes factores, se realizó una prueba de Tukey, todos los análisis se realizaron utilizando el programa Statistic 7.0, se utilizaron 5 muestras de cada tratamiento.

Tabla 9. Medio MS modificado en sus concentraciones de NO_3^- y PO_4^{3-} .

PO_4^{3-} mM	NO_3^- mM				
	13.7 27.4 41.1 54.8				
	0.62	A1	A2	A3	A4
	1.25	B1	B2	B3	B4
	1.88	C1	C2	C3	C4
	2.5	D1	D2	D3	D4

VII.12 Efecto del MeJa en la acumulación de AU, AO y AR en líneas de raíces transformadas

Para determinar el efecto del MeJa se sembraron 2 g de peso fresco de raíces transformadas en medio MS3 (medio MS con 45 g/l de sacarosa) bajo las condiciones mencionadas anteriormente. La elicitación se realizó a los 15 días de cultivo utilizando concentraciones de 100, 200 y 300 mM de MeJa durante tres tiempos de exposición correspondientes a 24, 48 y 72 h. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento. Una vez transcurrido el proceso de elicitación para cada tratamiento, las raíces fueron cosechadas y procesadas bajo las condiciones mencionadas anteriormente para la elaboración de extractos diclorometánicos y metanólicos en los cuales se identificaron y cuantificaron los compuestos de interés. Los datos fueron analizados con el programa Statistic 7.0 mediante una ANOVA de dos vías, tomando como factores la concentración del elicitor y el tiempo de elicitación sobre la producción de AU, AO y AR.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Germinación de semillas y obtención de plántulas de *L. caulescens*

Para la germinación de semillas de *L. caulescens* se realizó una escarificación, la cual consistió en cortar una porción de la testa, ya que se han obtenido resultados positivos para una germinación rápida mediante esta técnica ([Vergara, et al. 2017](#)). La germinación se observó a partir del tercer día. Las plántulas se dejaron crecer durante 4 semanas para ser empleadas como fuente de explantes de hojas y peciolo en los ensayos de transformación (Fig. 10).



Figura 10. Proceso de germinación y obtención de plántulas de *L. caulescens*. a) Semillas. b) Semilla escarificada mediante un corte en la testa. c) Inicio de la germinación al tercer día de siembra. d) Plántulas de 4 semanas de edad.

VIII.2 Generación de raíces transformadas de *L. caulescens*

La mayor eficiencia de transformación genética de *L. caulescens* se observó al cocultivar por 24 h a los explantes de hoja con una suspensión bacteriana de la cepa ATCC 15834 de *A. rhizogenes* crecida hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5; bajo estas condiciones el 75% de los explantes formaron raíces pilosas, siendo el tratamiento con mayor porcentaje de transformación. Cabe mencionar que no se obtuvo ninguna respuesta de transformación en los tratamientos donde se utilizó peciolo como explante. Por otro lado, en los tratamientos donde se utilizaron las cepas A4 y K599 crecidas a una DO_{600nm} de 0.7 no se observó ninguna respuesta en los explantes inoculados (tabla 10).

Tabla 10. Porcentaje de transformación en explantes de hoja de *L. caulescens* inoculados con las cepas ATCC 15834, A4 y k599 de *A. rhizogenes*.

Densidad óptica DO_{600nm}	Cepa	Inducción de raíces en explantes de hoja					
		24 h (Cocultivo)			72 h (Cocultivo)		
		NER	NRT	PT	NER	NRT	PT
DO_{600nm} 0.5	ATCC 15834	15	56	75	10	40	50
	A4	2	11	10	-	-	-
	K599	-	-	-	1	1	5
DO_{600nm} 0.7	ATCC 15834	13	79	65	10	98	50
	A4	-	-	-	-	-	-
	K599	-	-	-	-	-	-

NER: número de explantes con respuesta, NRT: número de raíces totales, PT: porcentaje de transformación

De los explantes que respondieron a la inducción de raíces putativamente transformadas se lograron individualizar 285 raíces después de 20 días de cultivo. De las raíces individualizadas, 15 de ellas lograron desarrollarse en un medio libre de reguladores de crecimiento (todas provenientes de la cepa ATCC 15834), siendo este el primer criterio para seleccionar a estas raíces como líneas transformadas (Fig. 11e), asignándoles la numeración del 1 al 15. En la figura 11 se muestran el proceso de selección de las diferentes líneas obtenidas.





Figura 11. Proceso de inoculación y selección de líneas transformadas de *L. caulescens*. a) Corte de explante de plántulas *in vitro*. b) Inmersión del explante en solución bacteriana. c) Co-cultivo sin antibiótico. d) Formación de raíces en explantes de hoja después de 7 días de cultivo. e) Individualización de raíces después de 4 semanas de cultivo. f) Líneas de raíces pilosas obtenidas después del proceso de individualización.

Las 15 líneas obtenidas, presentaron características morfológicas diferentes, en algunos casos se observó la presencia de callos en el cultivo, como es el caso de la línea 15, es importante mencionar que las 15 líneas presentaron un crecimiento aglomerado, es decir, en las raíces se entremezclan durante su crecimiento formando una especie de madeja desde donde se extienden múltiples raíces pequeñas hacia el exterior. En la figura 12 se muestran las fotografías de las 15 líneas obtenidas.

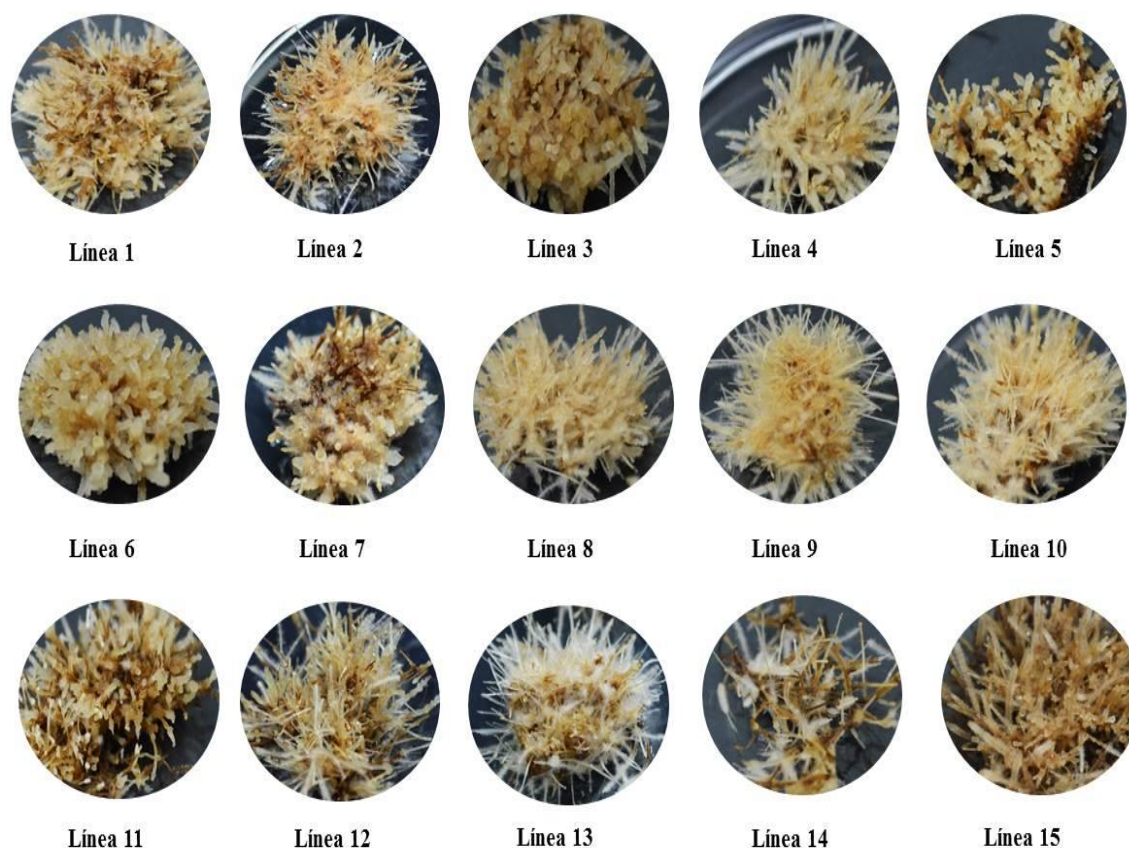


Figura 12. Líneas de raíces transformadas de *L. caulescens*.

La confirmación de transformación se llevó a cabo mediante PCR. En la figura 13 se muestran los productos de PCR para el gen *rol B* (presente en el T-DNA), observándose amplificación de las líneas L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8, L10, L11, L12 y L15; las líneas L1, L9, L13 y L14 no amplificaron para este gen. El control positivo (C+) utilizado, fue el plásmido Ri de la cepa ATCC 15834 de *A. rizhogenes* y en todos los casos se obtuvo amplificación del gen *rolB*. Como control negativo (C- y C²-) se utilizaron DNA genómicos de raíces no inoculadas de plántulas de *L. caulescens* y una reacción de PCR en la que se sustituyó el DNA blanco por agua, en todos los casos no se obtuvo amplificación en estos controles.

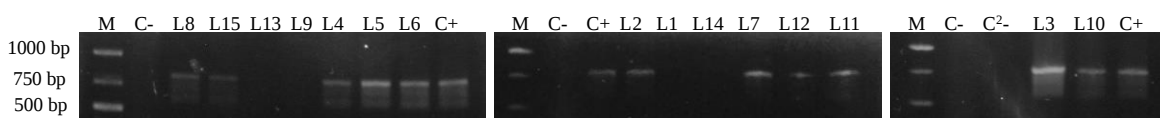


Figura 13. Amplificación del gen *rol B* por PCR. M: marcador de peso molecular de DNA (1 kb); C+: Control positivo, DNA total de la cepa de *A. rhizogenes* ATCC15834. C⁻ y C²⁻: Control negativo, DNA genómico de raíces de plántulas no infectadas; L1-L15: DNA de líneas de raíces transformadas.

Se realizó otro análisis de PCR del gen *vir D2* para corroborar la usencia de bacteria en cultivos *in vitro* de las líneas transformadas, ya que solo está presente en *A. rhizogenes* y no es transferido a la planta, la banda amplificada de 338 pb se observó en los carriles correspondientes al PCR del DNA de la bacteria (fig. 14a) y en el carril 4 correspondiente al DNA genómico de la línea 9 (2b).

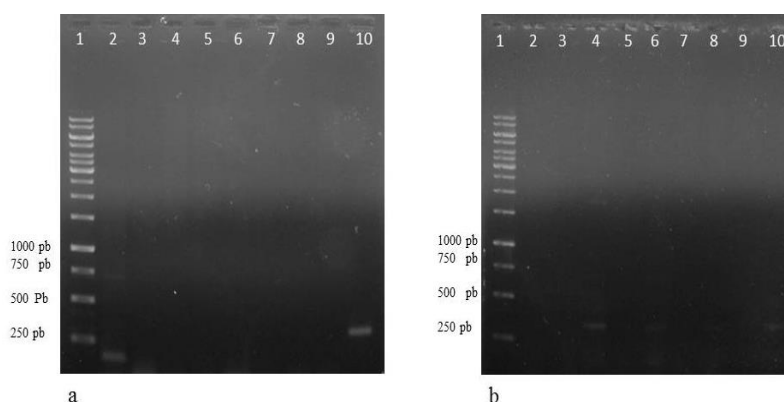


Figura 14. Amplificación del gen *vir D2* por PCR. **a)** 1: marcador molecular 1kb, 2: plántula *in vitro* 3: línea 2, 4: línea 1, 5: línea 15 (+), 6: línea 7, 7: línea 13, 8: línea 12, 9: línea 9 y 10: plásmido ATCC 15834 **b)** 1: marcador molecular 1kb, 2: línea 15, 3: línea 13, 4: línea 9, 5: línea 4, 6: línea 5, 7: línea 6, 8: línea 3, 9: línea 10 y 10: DNA de *A. rhizogenes* ATCC 15834.

VIII.3 Identificación y cuantificación de ácido ursólico y ácido oleanólico por CLAR en cultivo de raíces transformadas de *L. caulescens*

Para la identificación y cuantificación de los metabolitos de interés, se realizaron los extractos diclorometánicos correspondientes con el material seco obtenido de las 15 líneas de raíces transformadas, en la tabla 11 se muestran los rendimientos obtenidos de cada uno de los extractos diclorometánicos.

Tabla 11. Rendimientos de los extractos diclorometánicos de raíces transformadas.

Línea	Peso seco (g)	Rendimiento		Línea	Peso seco (g)	Rendimiento	
		g	%			g	%
1	2.742	0.021	0.78	9	2.727	0.025	0.92
2	3.324	0.022	0.66	10	1.6	0.023	1.41
3	1.029	0.011	1.06	11	0.846	0.014	1.62
4	1.082	0.017	1.58	12	0.501	0.009	1.70
5	1.377	0.031	2.22	13	0.179	0.003	1.45
6	3.3362	0.0335	1.004	14	0.7716	0.0113	1.464
7	3.337	0.04	1.199	15	0.6277	0.0101	1.609
8	0.7611	0.0131	1.706				

Para identificar y cuantificar los triterpenos de interés en los extractos diclorometánicos de raíces transformadas, se determinaron los tiempos de retención (TR) de los estándares puros en los perfiles cromatográficos, así como su espectro de absorción correspondiente. Estos datos se obtuvieron con las condiciones cromatográficas mencionadas en la sección de metodología; el ácido ursólico y oleanólico presentaron un TR de 10.67 ± 0.01 min y de 10.36 ± 0.09 min, respectivamente (Fig. 15). Por la similitud en los TR de estos ácidos se realizó una mezcla con los estándares de ácido ursólico y oleanólico para implementar el método de análisis de

cuantificación del extracto diclorometánico de los diferentes tratamientos a evaluar mediante CLAR.

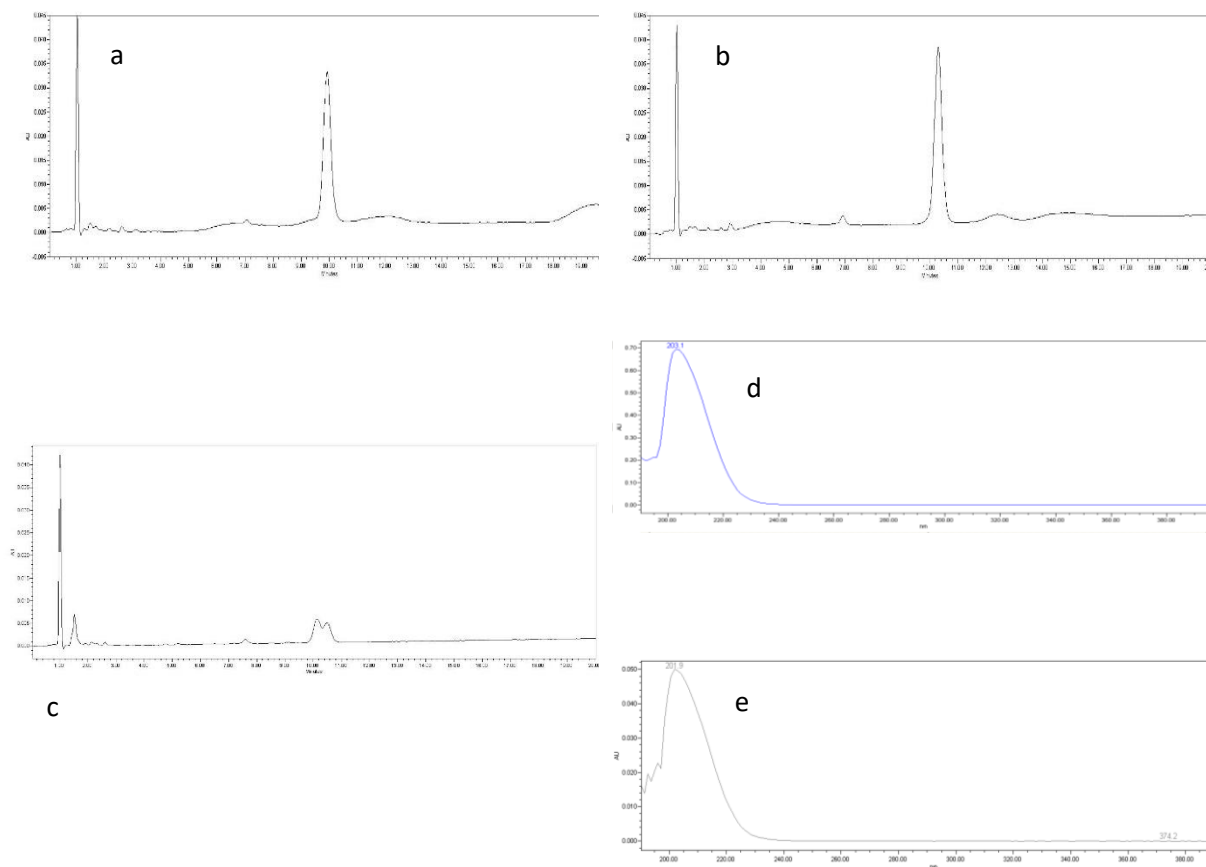
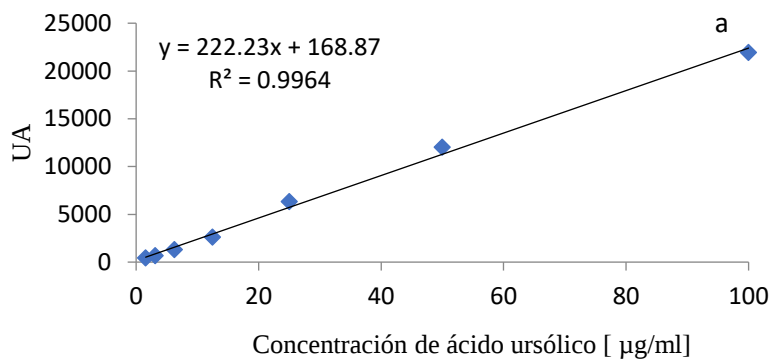


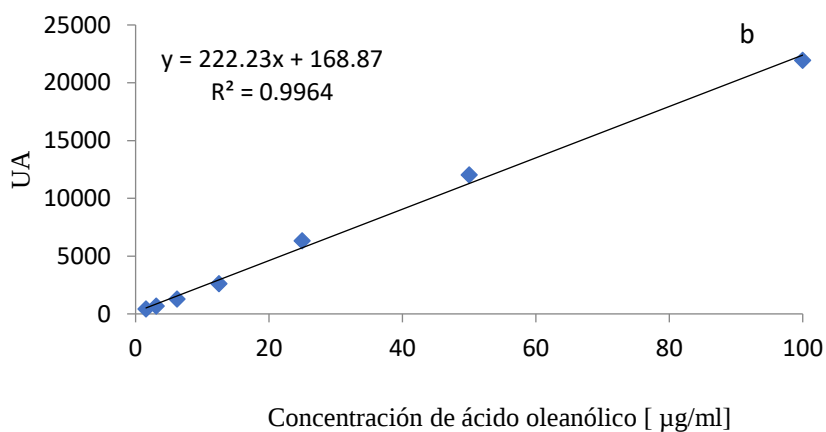
Figura 15. Cromatogramas de los estándares de ácido ursólico y oleanólico. a) Ácido ursólico TRde 10.67 ± 0.01 min. b) Ácido oleanólico 10.36 ± 0.09 min c) Mezcla de ácido ursólico y oleanólico. d) Espectro de absorción de ácido ursólico. e) Espectro de absorción de ácido oleanólico.

Para determinar la cantidad de metabolitos de interés presentes en los extractos de las 15 líneas evaluadas, se realizaron curvas de calibración con los estándares puros de ácido ursólico y oleanólico, graficando la concentración del analito *versus* altura de pico, en las gráficas 1 y 2

podemos observar los resultados obtenidos de este proceso, cabe resaltar que para ambas curvas el valor de coeficiente de correlación para la regresión lineal fue mayor a 0.99 en ambos casos.



Gráfica 1. Curva de calibración del estándar de ácido ursólico.



Gráfica 2. Curva de calibración del estándar de ácido oleanólico.

A continuación, en la figura 16 se muestran los cromatogramas obtenidos de las líneas 1 y 5, los demás cromatogramas se encuentran en el anexo 1. Cabe señalar que en todas las muestras analizadas se observa la presencia de AU y AO, así como una similitud en el perfil cromatográfico.

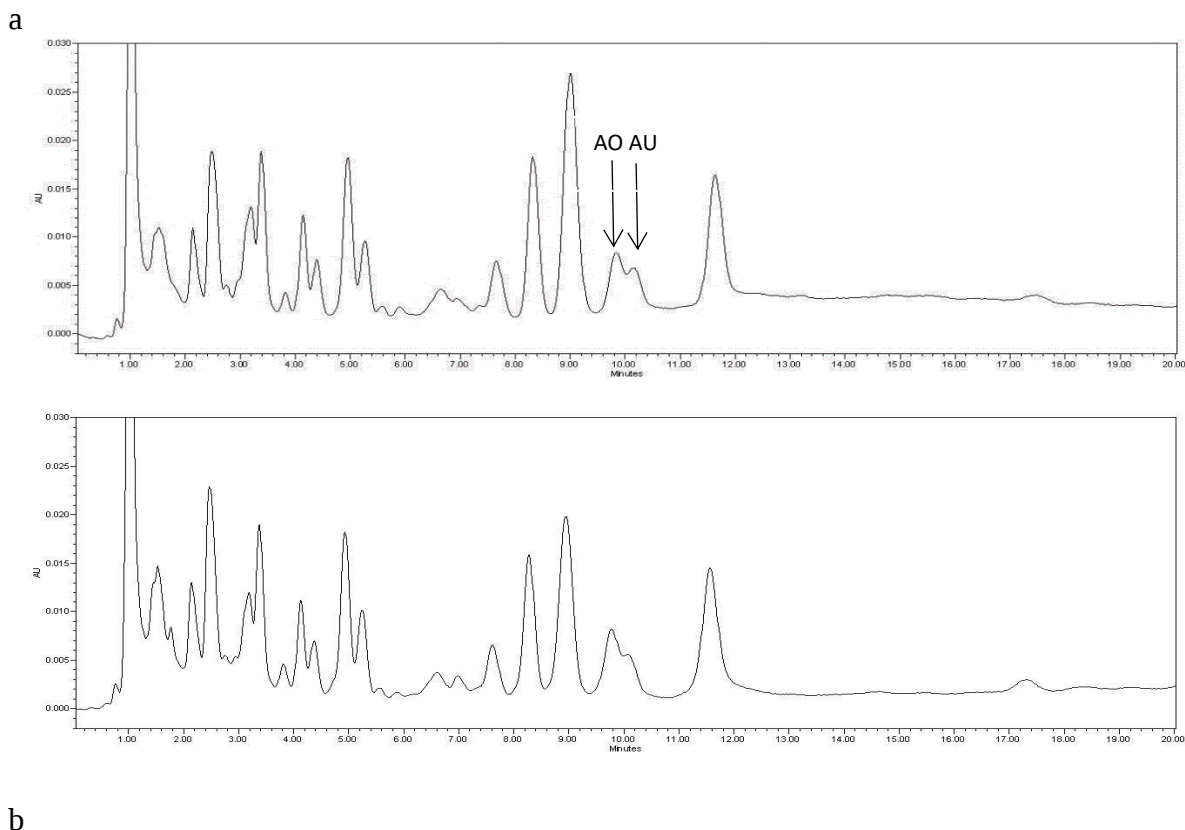


Figura 16. Cromatogramas de los extractos diclorometánicos de raíces transformadas de *L. caulescens*. a) Línea 1 y b) Línea 5.

En todos los cromatogramas se observa la presencia de los compuestos de interés, los picos correspondientes a dichos triterpenos se encuentran señalados con base al TR obtenido en la curva de calibración. Estos resultados nos indican que todas nuestras líneas son productoras de ácido ursólico y oleanólico, sin embargo, los análisis estadísticos (ANOVA y prueba de Tukey) indican una variación significativa en la acumulación de los compuestos entre las líneas. En la

tabla 12 podemos observar el contenido obtenido en la cuantificación de cada uno de los extractos diclorometánicos obtenidos de las diferentes líneas de raíces transformadas.

Tabla 12. Acumulación de ácido ursólico y oleanólico en las 15 líneas de raíces transformadas de *L.*

caulescens.

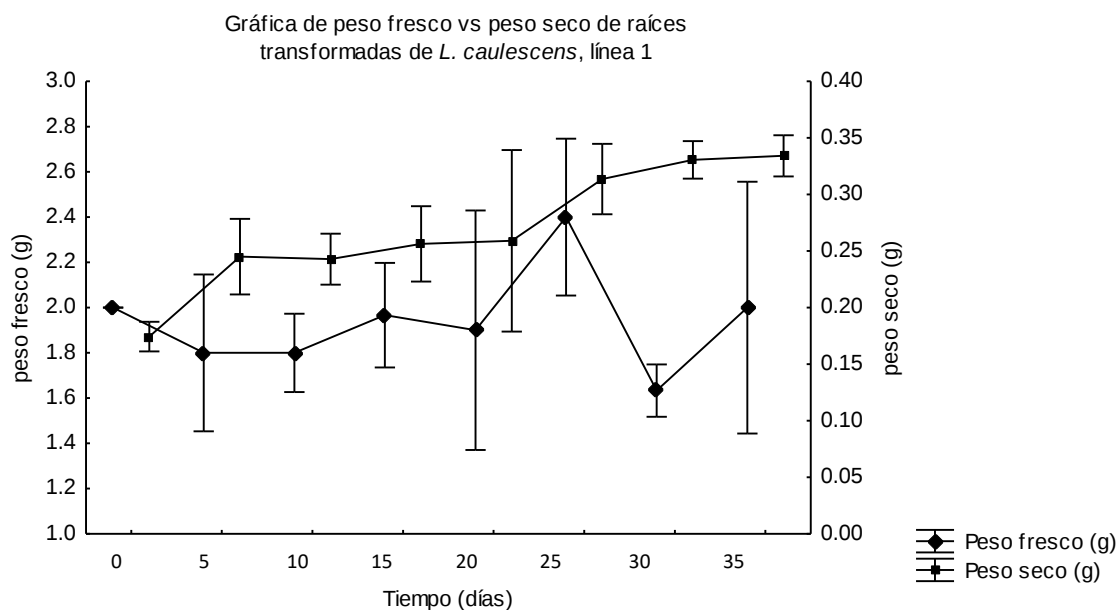
Línea	Concentración de triterpenos (mg/g peso seco)		Línea	Concentración de triterpenos (mg/g peso seco)	
	AU	AO		AU	AO
1	0.104 ± 0.002 ^H	0.165 ± 0.006 ^h	9	0.141 ± 0.019 ^{FG}	0.214 ± 0.034 ^{efgh}
2	0.106 ± 0.02 ^H	0.185 ± 0.022 ^{gh}	10	0.210 ± 0.006 ^B	0.333 ± 0.008 ^b
3	0.150 ± 0.002 ^{EFG}	0.235 ± 0.001 ^{efg}	11	0.165 ± 0.003 ^{DEF}	0.205 ± 0.003 ^{ef}
4	0.141 ± 0.003 ^{FG}	0.213 ± 0.002 ^{efg}	12	0.212 ± 0.005 ^B	0.338 ± 0.007 ^b
5	0.288 ± 0.003 ^A	0.516 ± 0.005 ^a	13	0.170 ± 0.017 ^{DE}	0.201 ± 0.026 ^{de}
6	0.138 ± 0.003 ^G	0.242 ± 0.003 ^{fgh}	14	0.221 ± 0.003 ^B	0.311 ± 0.005 ^b
7	0.174 ± 0.003 ^{DE}	0.329 ± 0.006 ^{cd}	15	0.182 ± 0.003 ^{CD}	0.280 ± 0.004 ^c
8	0.207 ± 0.002 ^{BC}	0.288 ± 0.004 ^{bc}			

Nota: letras diferentes representan diferencias significativas, mayúsculas para AU y minúsculas para AO

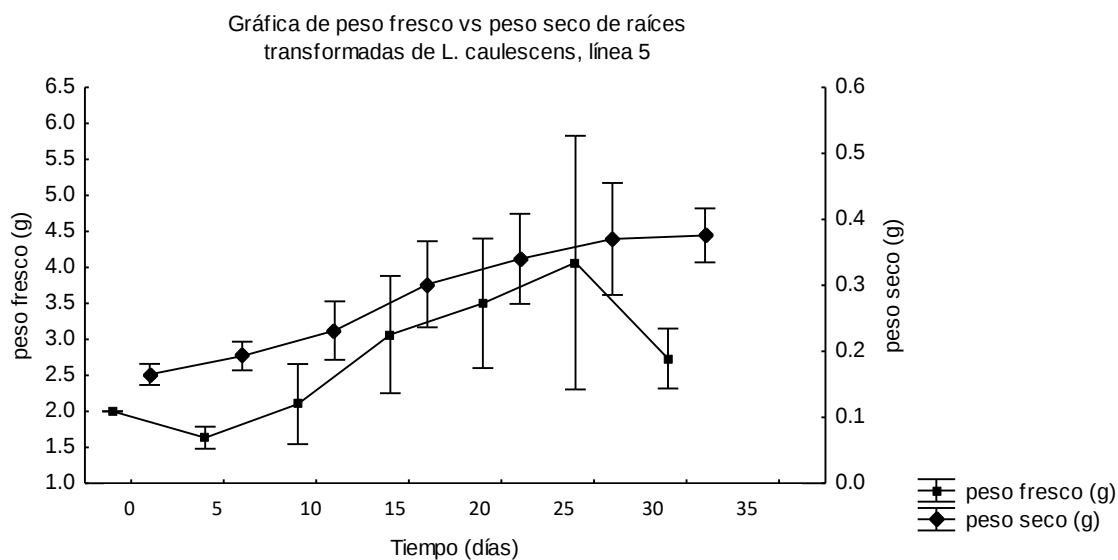
La línea 5 fue la mayor productora de ambos compuestos con rendimientos de 0.288 ± 0.003 mg/g de peso seco de raíz para el de ácido ursólico y 0.516 ± 0.005 mg/g de peso seco de raíz para el ácido oleanólico (tabla 16); en caso contrario, la línea 1 fue la de menor rendimiento, con acumulaciones de 0.104 ± 0.002 mg/g de peso seco de raíz y 0.165 ± 0.006 mg/g de peso seco de raíz para el ácido ursólico y oleanólico respectivamente (tabla 16). Estas dos líneas de raíces transformadas se seleccionaron para posteriores tratamientos, tomándose en consideración las características del crecimiento de las raíces, es decir las que menos se aglomeraban y no formaban estructuras tipo callo, además del comportamiento contrastante en la producción de los compuestos y producción de biomasa.

VIII.4 Cinética de crecimiento de raíces transformadas de *L. caulescens*

Para caracterizar los cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* fueron monitoreados diversos parámetros, como son: peso fresco y seco de la biomasa obtenida, conductividad, pH y consumo de azúcares. El valor máximo de peso seco fue de 0.33 g para la línea 1 al día 35, mientras que para la línea 5 fue de 0.38 g en la muestra del día 30 (gráfica 3).



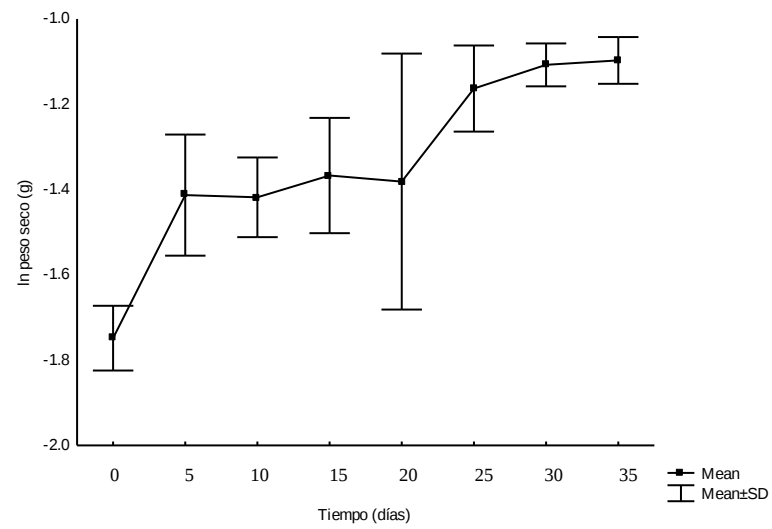
a)



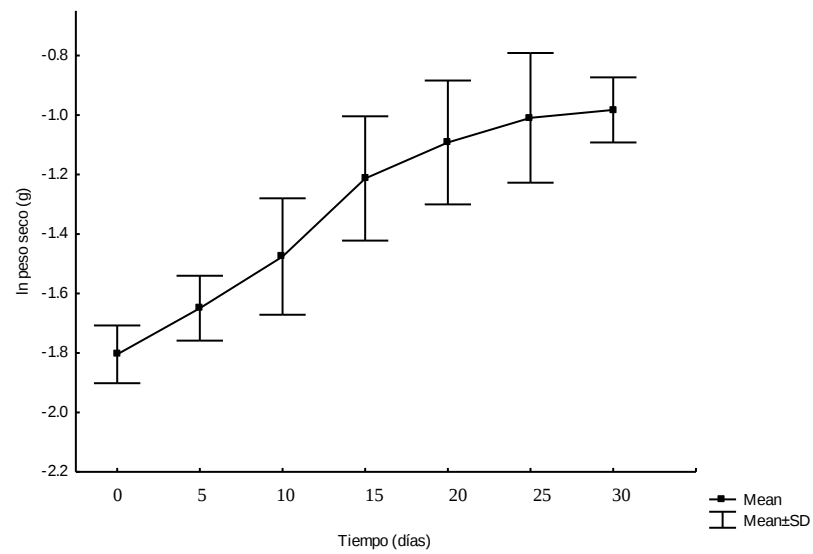
b)

Gráfica 3. Peso fresco y peso seco vs tiempo de las líneas 1 (a) y 5 (b) de raíces transformadas de *L. caulescens*.

Al graficar los logaritmos de los pesos secos de ambas líneas (gráfica 4), se pudo observar que el crecimiento del cultivo presenta un comportamiento atípico al de una cinética de crecimiento de primer orden, por lo que no se pudieron determinar los tiempos de duplicación y la velocidad de crecimiento.



a)

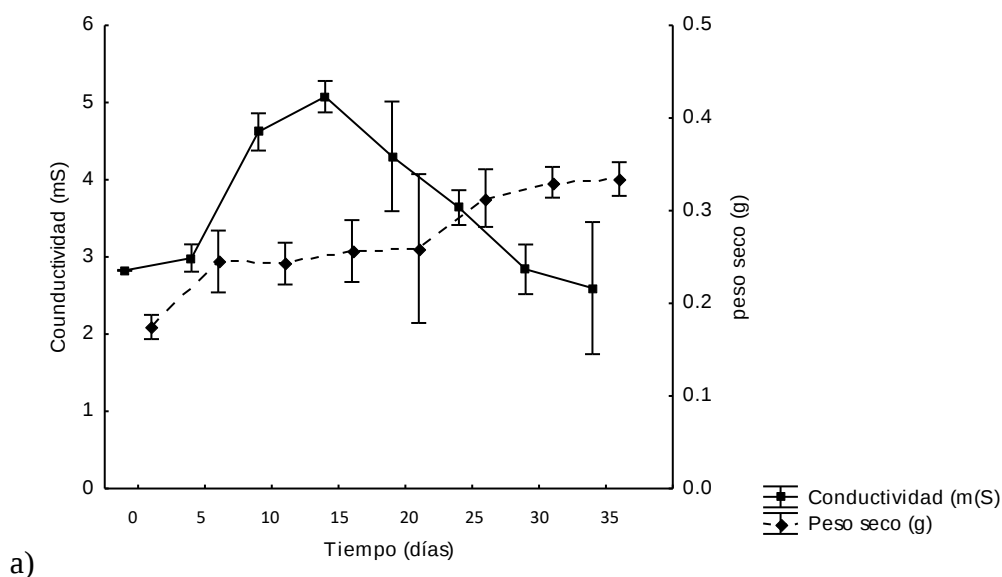


b)

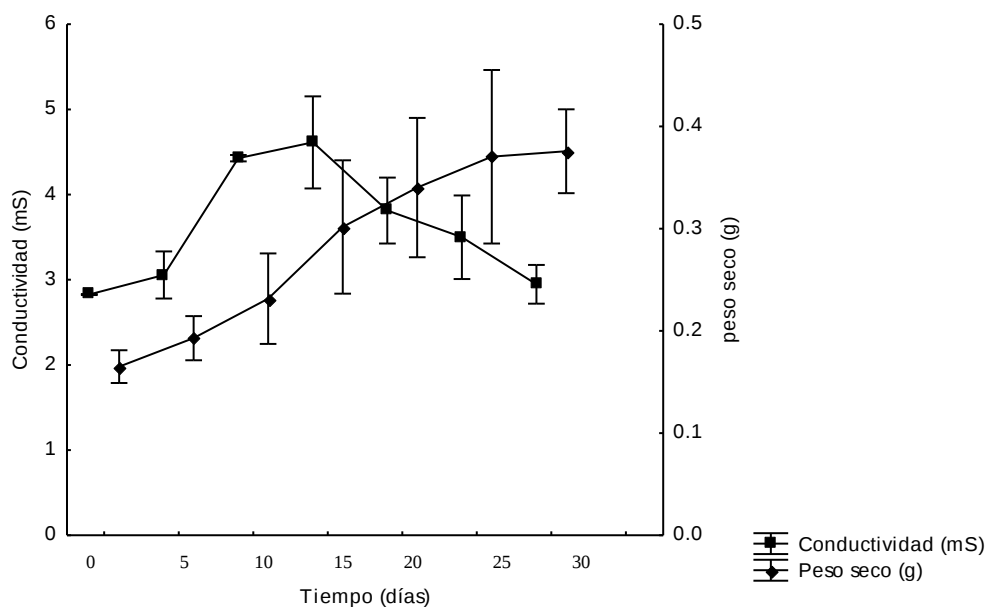
Gráfica 4. Logaritmo natural de peso seco de las líneas 1 (a) y 5 (b) de raíces trasformadas de *L. caulescens*.

VIII.4.1 Determinación de la conductividad del medio de cultivo

Dentro de los parámetros indirectos para observar el incremento de biomasa a lo largo de la cinética tenemos el valor de conductividad (Λ) en el medio de cultivo el cual nos indica la presencia de iones, los valores de la Λ disminuyen a medida que la biomasa aumenta, siendo estas curvas con una tendencia inversa entre ellas a lo largo del tiempo. En la gráfica 5 podemos observar estas tendencias en las líneas 1 y 5.



a)



b)

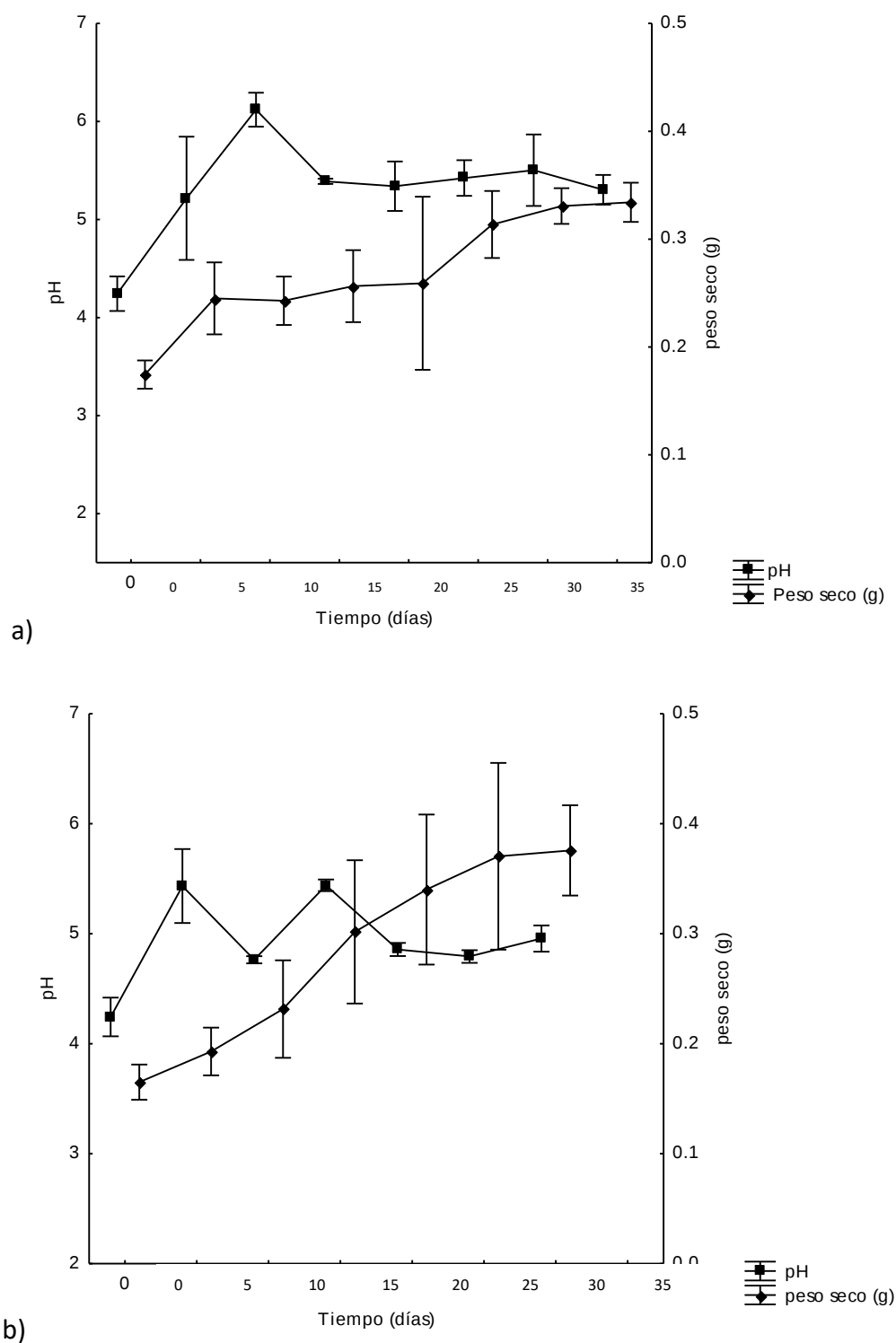
Gráfica 5. Conductividad y peso seco vs tiempo de las líneas 1(a) y 5 (b) de raíces transformadas de *L. caulescens*.

VIII.4.2 Determinación del pH en el medio de cultivo durante la cinética de crecimiento

El comportamiento de pH del medio de cultivo durante los primeros 20 días es muy variable en ambas gráficas (gráfica 6) podemos observar que desde el T0 hay una disminución considerable de pH, con valores por debajo de 5, para el caso de la línea 1 los valores incrementan hasta el día 10, después del día 15 el valor se mantiene estable en un rango de 5.3 a 5.5 hasta el final de la cinética.

En la línea 5 podemos observar que los primeros 20 días los valores de pH son muy inestables, transcurrido este tiempo se observa ya un equilibrio con valores entre 4.7 y 4.9, más ácido que en la línea 1, este periodo de tiempo corresponde con la fase estacionaria del cultivo como se observó en gráficas pasadas.

Los datos registrados muestran un comportamiento típico de un cultivo, ya que los tejidos vegetales tienden a acidificar en la fase de adaptación esto debido a la asimilación del amonio, posteriormente cuando los nitratos son consumidos se ve un incremento de pH cercano a los niveles basales lo cual está relacionado con el incremento de biomasa y lo podemos observar en las gráficas en donde los valores de pH se estabilizan durante la fase estacionaria.



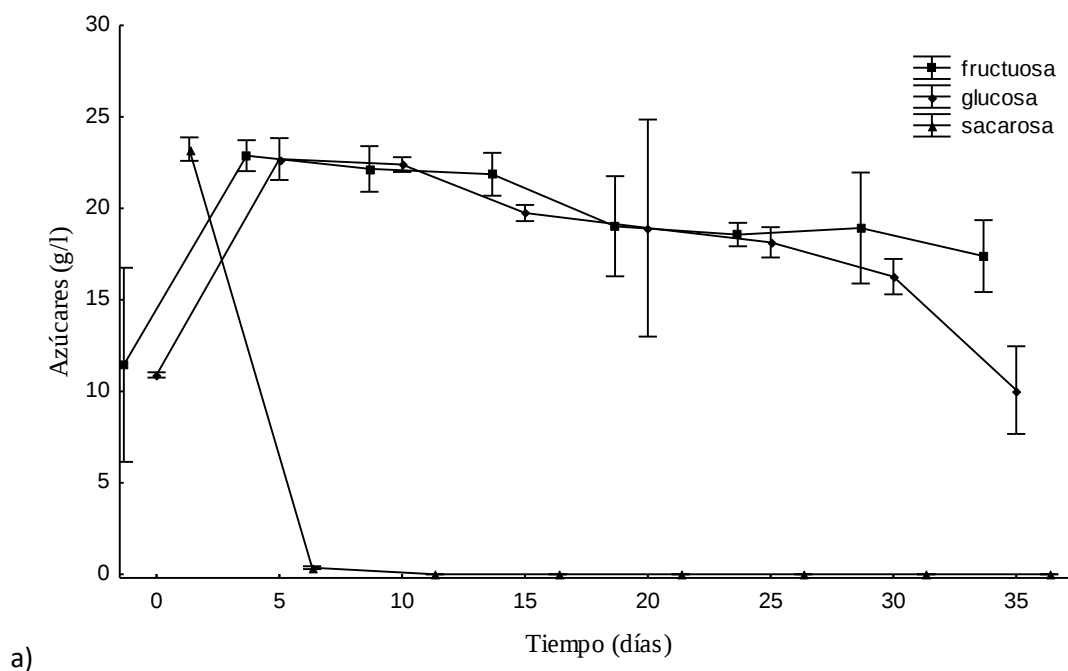
Gráfica 6. pH y peso seco vs tiempo de las líneas 1 (a) y 5 (b) de raíces trasformadas de *L. caulescens*.

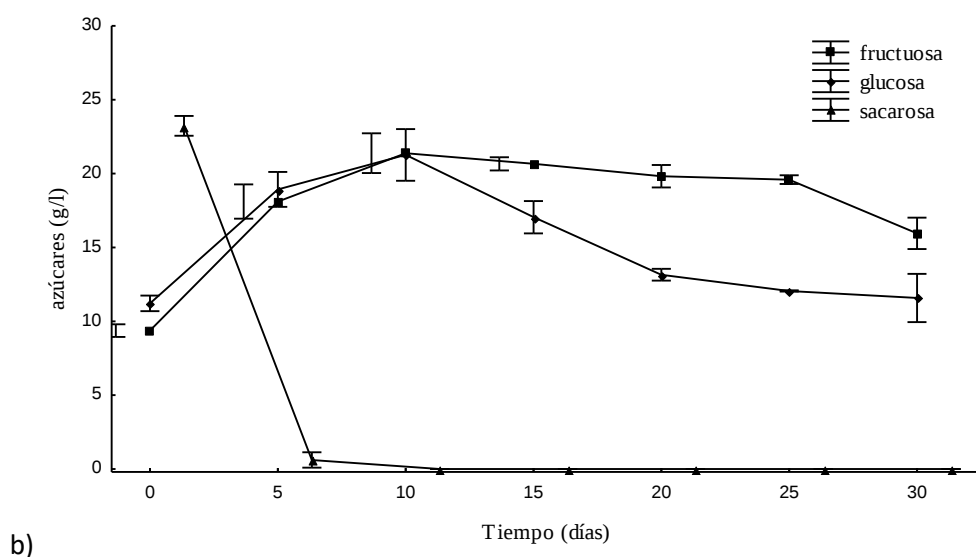
VIII.4.3 Estudio cinético del consumo de azúcares

El consumo de azúcares está directamente relacionado con el incremento de la biomasa, en la gráfica 7 podemos observar dicho comportamiento. Para ambas líneas, después del día 5, los niveles de sacarosa disminuyeron; después del día 10 se incrementan los niveles de glucosa, fructosa, y monosacáridos producto de la hidrólisis de la sacarosa.

En la gráfica de la línea 1, observamos este comportamiento donde los niveles de glucosa son inferiores a los de fructosa y están relacionados con las fases de crecimiento de biomasa, después del día 15 los niveles de glucosa disminuyen lo cual está relacionado con lo que podría ser la fase exponencial de la cinética.

Para el caso de la línea 5 el comportamiento del consumo de azúcares es similar al de la línea 1, después del día 20 los niveles de glucosa y fructosa disminuyen lo cual coincide con los tiempos de la fase exponencial de crecimiento, en esta línea también podemos observar una preferencia de consumo de glucosa en comparación con fructosa.



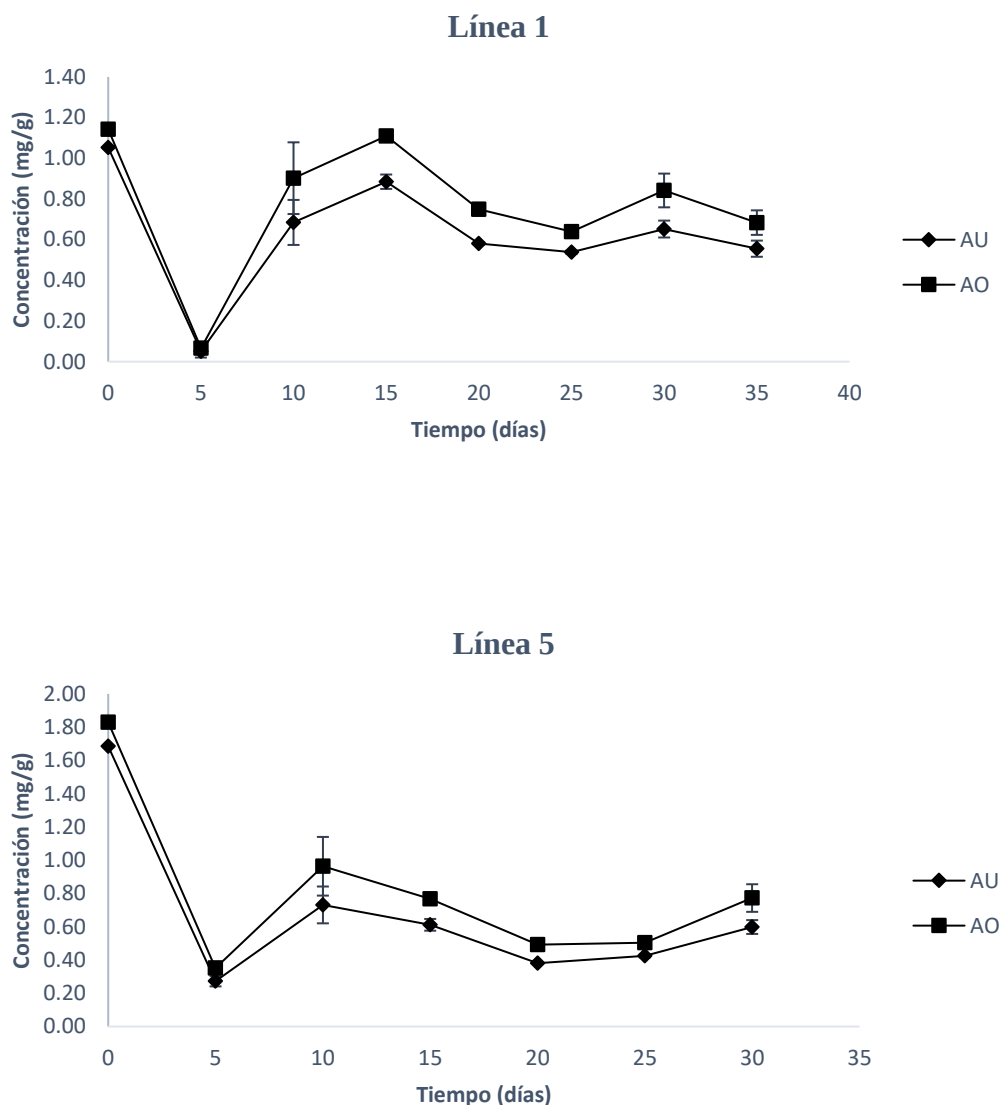


Gráfica 7. Concentración de azúcares vs tiempo de las líneas 1 (a) y 5 (b) de raíces transformadas de *L. caulescens*.

Es importante resaltar que la cinética fue de tipo lote, cuidando de mantener las mismas condiciones para disminuir la variabilidad en los resultados, sin embargo, en algunos parámetros podemos observar que la desviación estándar en algunos es muy grande.

VIII.4.4 Estudio cinético de la producción de AU y AO

Con la biomasa obtenida durante la cinética, se elaboraron los extractos diclorometánicos y se determinó la producción de AU y AO. Los rendimientos obtenidos de AU para la línea 1 y 5 son de 1.05 ± 0.01 mg/g y 1.69 ± 0.02 mg/g respectivamente y de 1.14 ± 0.01 mg/g de AO para la línea 1 y 1.83 ± 0.02 mg/g para la línea 5. En el cultivo se observa una disminución en la producción de triterpenos durante los primeros cinco días postinoculación, posiblemente relacionada con la fase de adaptación de crecimiento de las raíces. Luego, la producción de triterpenos incrementa a valores similares a los determinados en el momento de la inoculación, la cual coincide con la fase exponencial. Durante la fase estacionaria, la producción se ve disminuida y se mantiene constante, estos datos los podemos observar en la gráfica 8.



Gráfica 8. Gráfica de producción de AU y AO en cultivo de raíces transformadas de *L. caulescens* durante la cinética de crecimiento.

VIII.5 Efecto de la concentración de sacarosa en cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens*

Después de las 4 semanas de cultivo, se observaron diferencias fenotípicas en las raíces cultivadas con concentraciones de 60 g/l de sacarosa ya que presentaron signos de oxidación (coloración marrón), mientras que aquellas cultivadas con 30 y 45 g/l de sacarosa (Fig. 17)

visualmente fueron más alargadas, definidas y sin signos de oxidación, esto fue observado tanto en la línea 1 como en la 5.

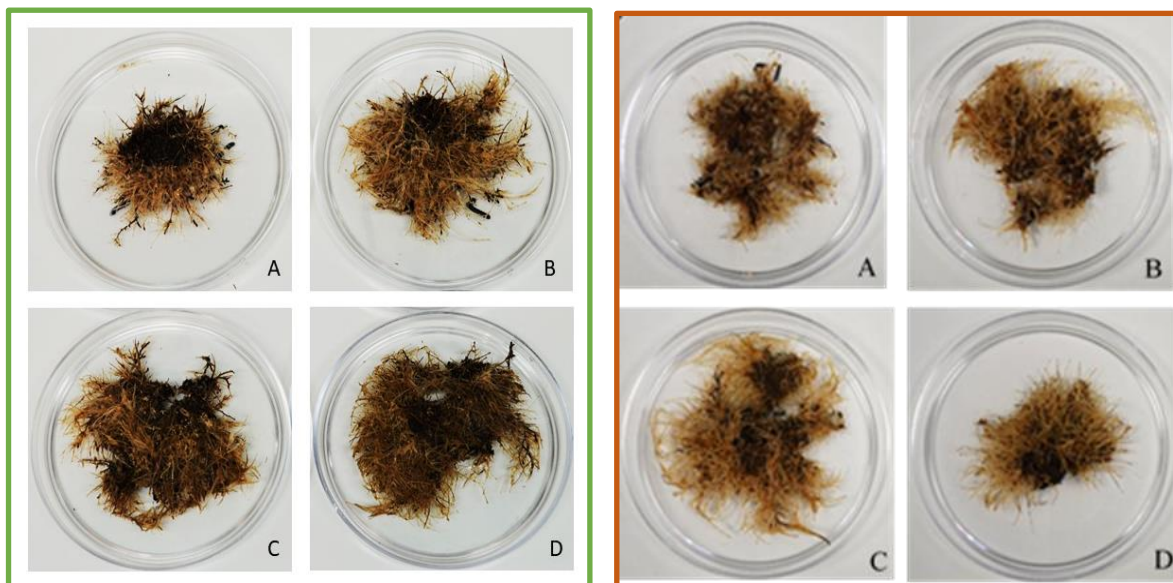


Figura 17. Efecto en la biomasa de raíces transformadas crecidas a diferentes concentraciones de sacarosa. A) 15 g/l, B) 30 g/l, C) 45 g/l y D) 60 g/l. Las imágenes corresponden a la colecta después de cuatro semanas de cultivo. El recuadro verde corresponde a la línea 1, recuadro anaranjado corresponde a la línea 5

Las líneas 1 y 5 crecidas en estos tratamientos mostraron un incremento de peso seco proporcional a la concentración de sacarosa (Fig. 19, $r^2 = 0.96$, $P < 0.001$ para L1 y $r^2 = 0.91$, $P < 0.001$ para L5), siendo los tratamientos de 15 g/l de sacarosa los que presentaron el menor rendimiento en peso seco, mientras que la máxima producción de biomasa se obtuvo al utilizar una concentración de 60 g/l de sacarosa (Fig. 18A y 18B).

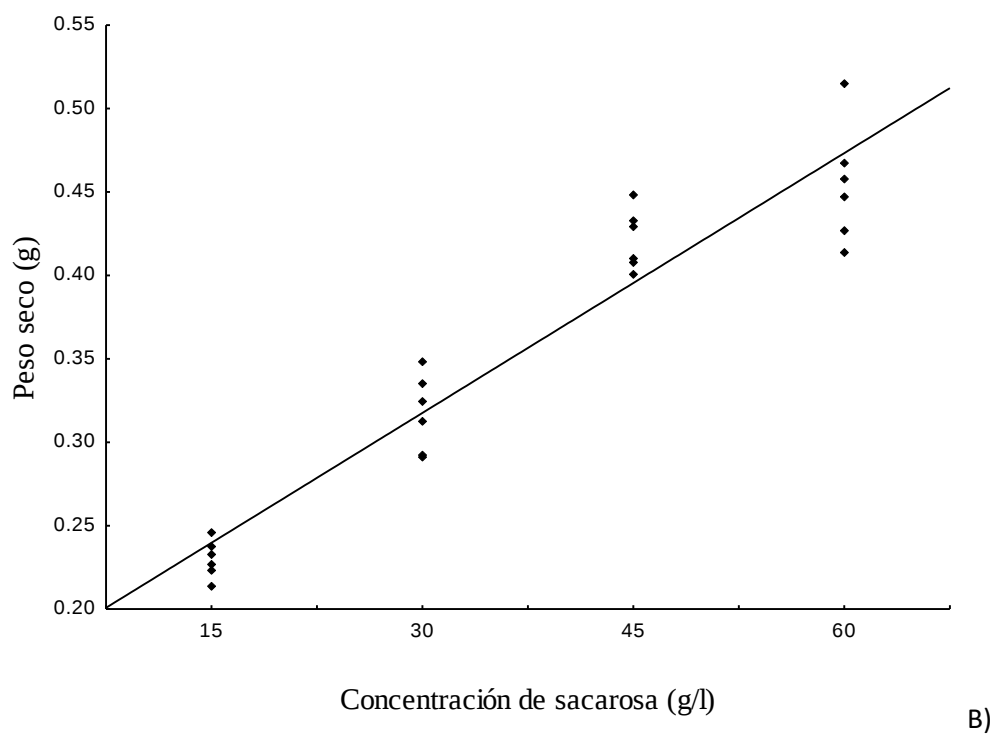
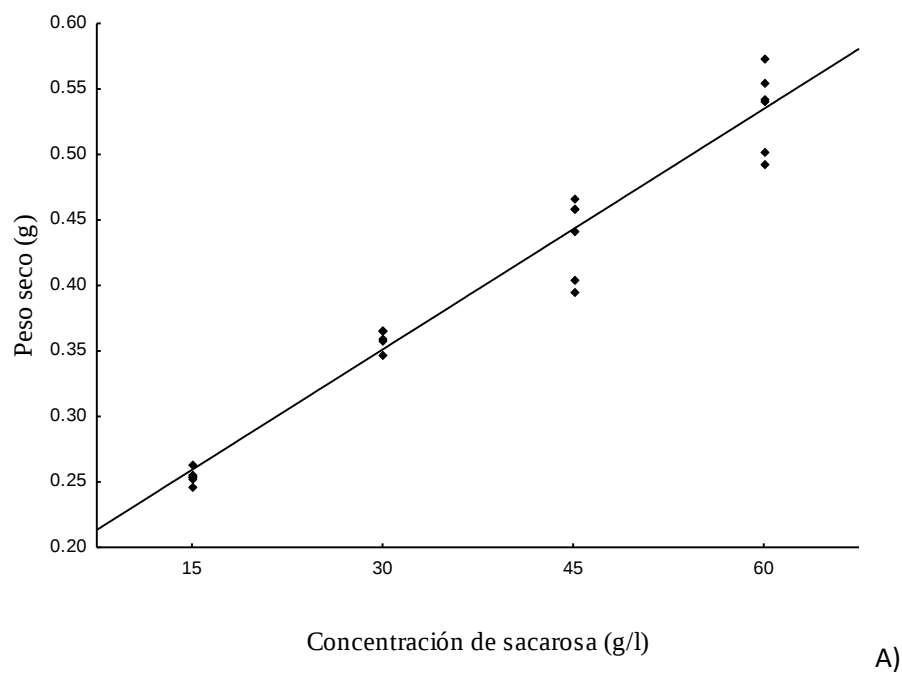


Figure 18. Regresión lineal entre la acumulación de biomasa del cultivo de raíces transformadas contra la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. A) L1 $r^2 = 0.96$, $P < 0.001$ y B) L5 $r^2 = 0.91$, $P < 0.001$.

Con la biomasa obtenida de cada tratamiento, se realizaron los extractos diclorometánicos para cuantificar la producción de ácido ursólico y ácido oleanólico. En la tabla 13 podemos observar los resultados obtenidos. Se observó un efecto lineal entre la concentración de sacarosa en el medio y la producción de triterpenos, lo anterior implica que al incrementar la concentración de sacarosa aumenta la acumulación de AU y AO en ambas líneas. Sin embargo, las raíces crecidas en medio adicionado con 60 g/l de sacarosa presentan mayor oxidación que las crecidas en medios con menor concentración del disacárido. Por lo tanto, se eligió el medio suplementado con 45 g/l de sacarosa para realizar los siguientes experimentos, ya que bajo estas condiciones los cultivos presentaron mejores características fenotípicas; observándose un crecimiento más alargado de las raíces y una disminución en la aglomeración de biomasa comparado con el resto de los tratamientos.

Tabla 13. Efecto de la concentración de sacarosa en la acumulación de AU y AO en las raíces transformadas cultivadas durante 4 semanas en medio MS modificado.

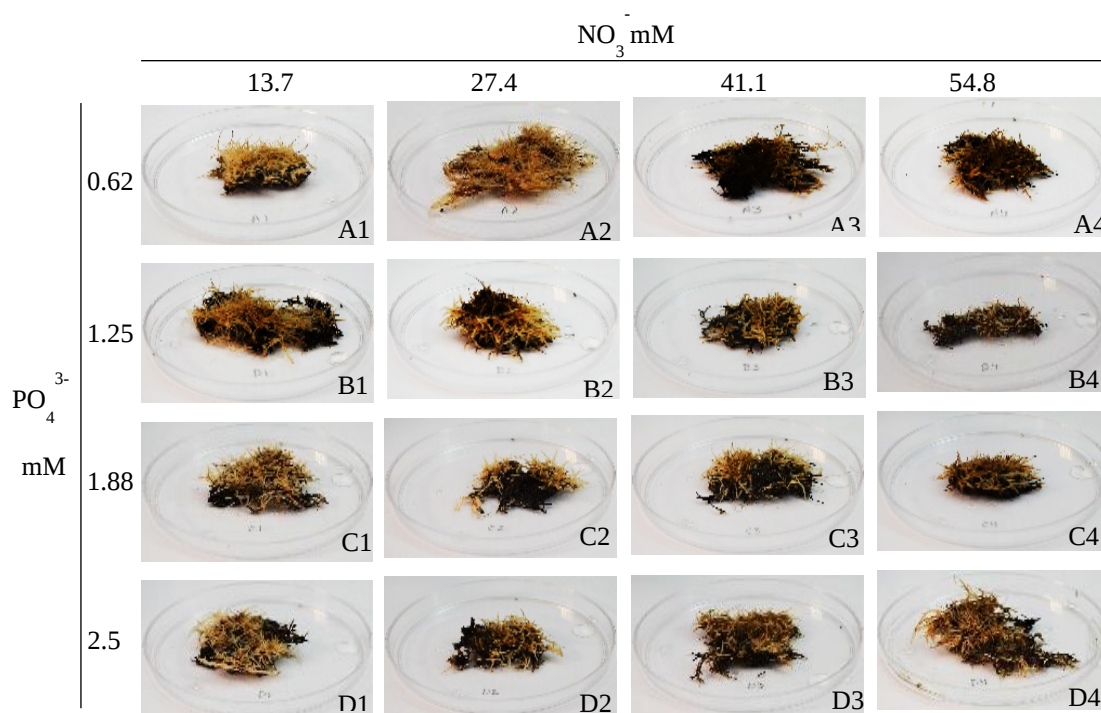
Sacarosa (g/l)	Línea 1		Línea 5	
	AU*	AO*	AU*	AO*
15	0.140 ± 0.003^A	0.176 ± 0.010^C	0.148 ± 0.005^B	0.174 ± 0.006^B
30	0.124 ± 0.0^B	0.189 ± 0.0^{AB}	0.145 ± 0.002^B	0.213 ± 0.008^A
45	0.124 ± 0.003^B	0.177 ± 0.006^B	0.164 ± 0.007^A	0.224 ± 0.007^A
60	0.139 ± 0.002^A	0.198 ± 0.006^A	0.124 ± 0.002^C	0.183 ± 0.002^B

* Los datos de AU y AO corresponden a mg/g peso seco de raíces. Letras diferentes muestran diferencias significativas. Prueba de comparación múltiple de Tukey con $p \leq 0.05$.

VIII.6 Efecto de la concentración de NO_3^- y PO_4^{3-} en la producción de biomasa y terpenos en raíces transformadas de *L. caulescens*

La modificación de nutrientes ($\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$) en el medio MS2 repercutió en el fenotipo de las raíces. En los tratamientos con menor concentración de NO_3^- (13.7 mM) en combinación con las diferentes concentraciones de fosfatos, se logró tener cultivos con raíces alargadas, evitando la aglomeración de biomasa característico de este cultivo en las condiciones típicas de crecimiento (MS2). En los tratamientos con relación 27.4, 41.1 y 54.8 mM l^{-1} de NO_3^- con 0.62 mM l^{-1} de PO_4^{3-} y 27.4:1.88 mM l^{-1} de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ se observó una disminución en el desarrollo de las raíces, formándose un aglomerado de biomasa en el centro del cultivo de color marrón (oscuro) (Fig. 19).

A)



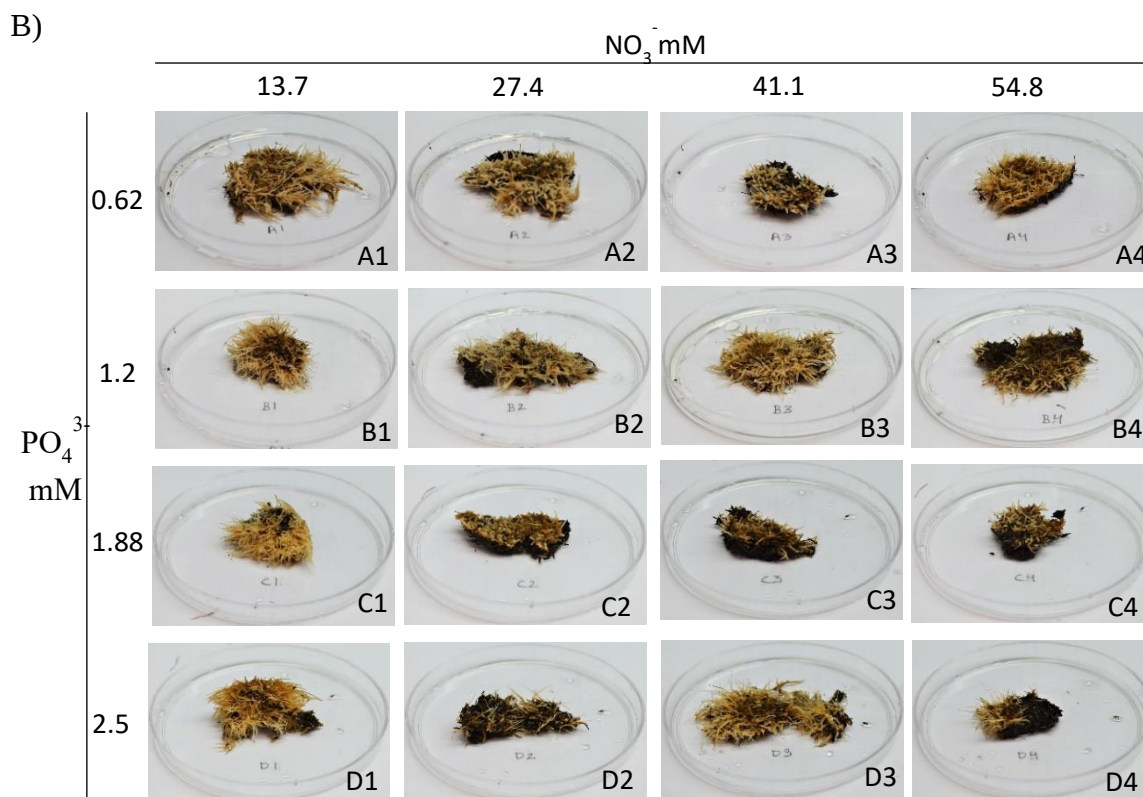
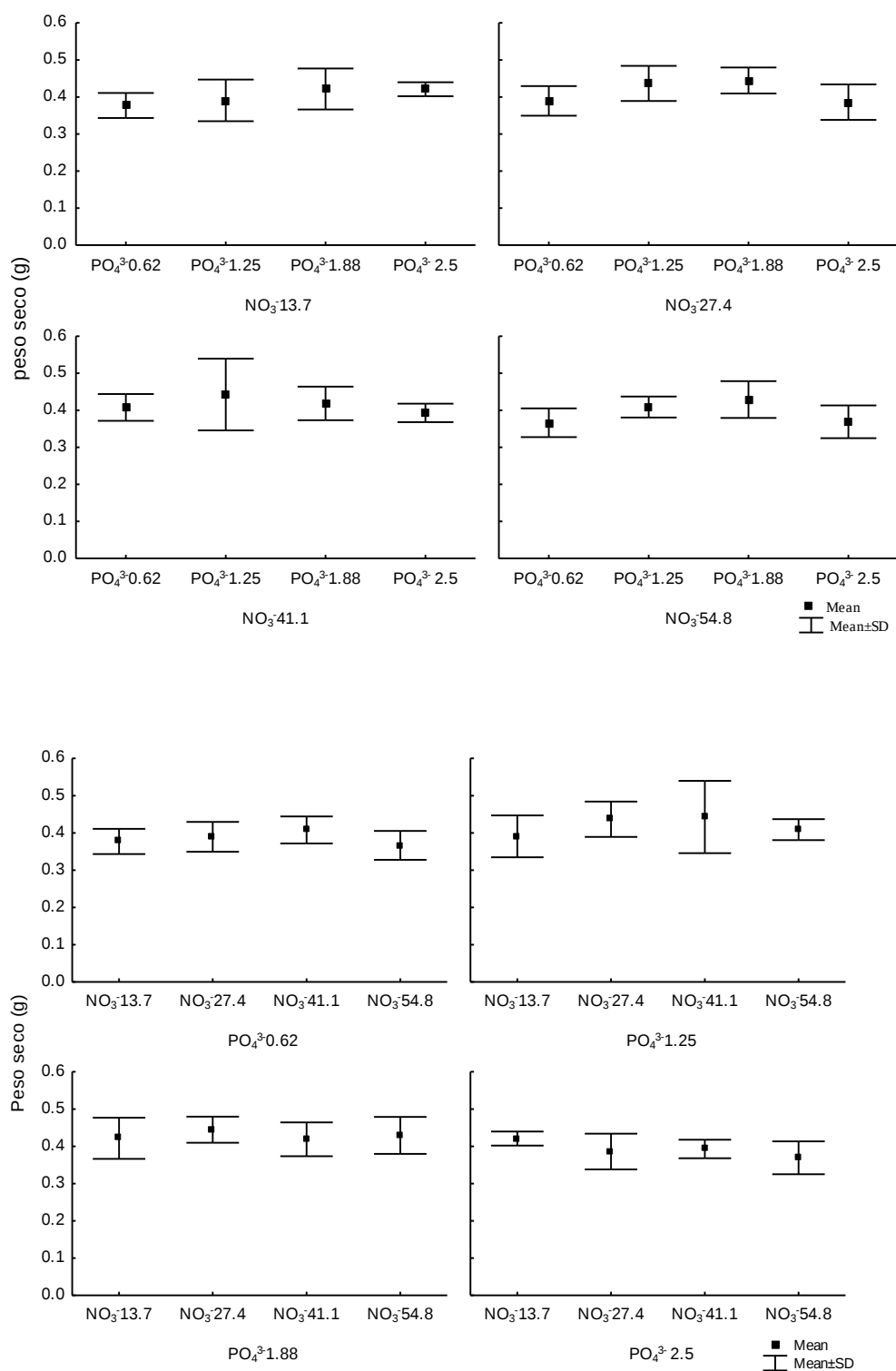


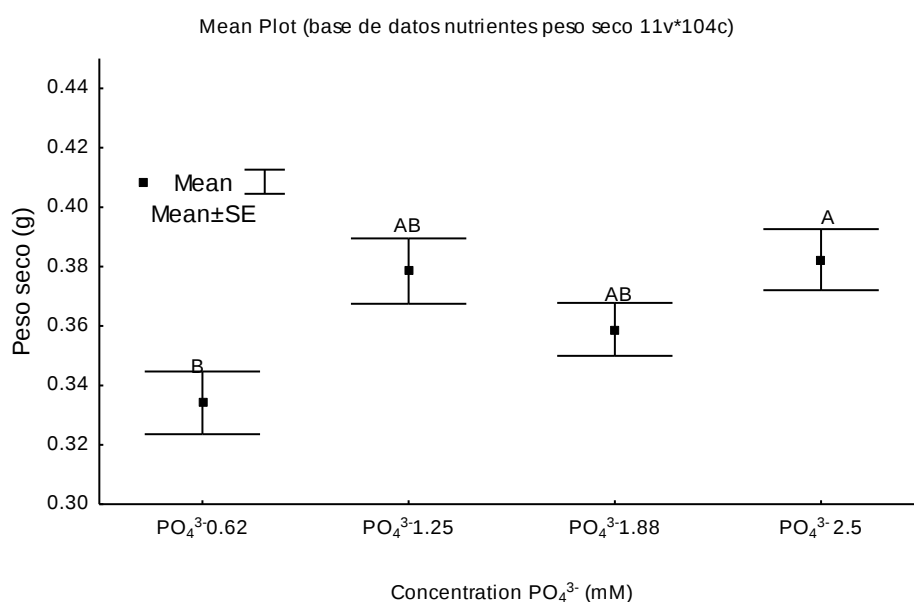
Figura 19. Morfología de las raíces pilosas de *L. caulescens* después de 30 días de cultivo en medio MS2 modificado en las concentraciones de nitratos y fosfatos. 19A corresponde a la línea 1 y 19B línea 5.

En la línea L1, no se evidenció ningún efecto en la producción de biomasa en respuesta a la adición de nitratos y su interacción con los fosfatos ($F_{9;64} = 0.812$ y $P > 0.05$); sin embargo, la modificación de fosfatos en el medio de cultivo si influyó de manera significativa ($F_{3;64} = 3.986$ y $P < 0.05$) en la producción final de biomasa de cultivos de raíces pilosas de *L. caulescens* de esta línea (gráfica 9).



Gráfica 9. Acumulación de biomasa de la línea 1 de raíces pilosas cultivadas en medio MS2 modificado en la concentración de nitratos y fosfatos.

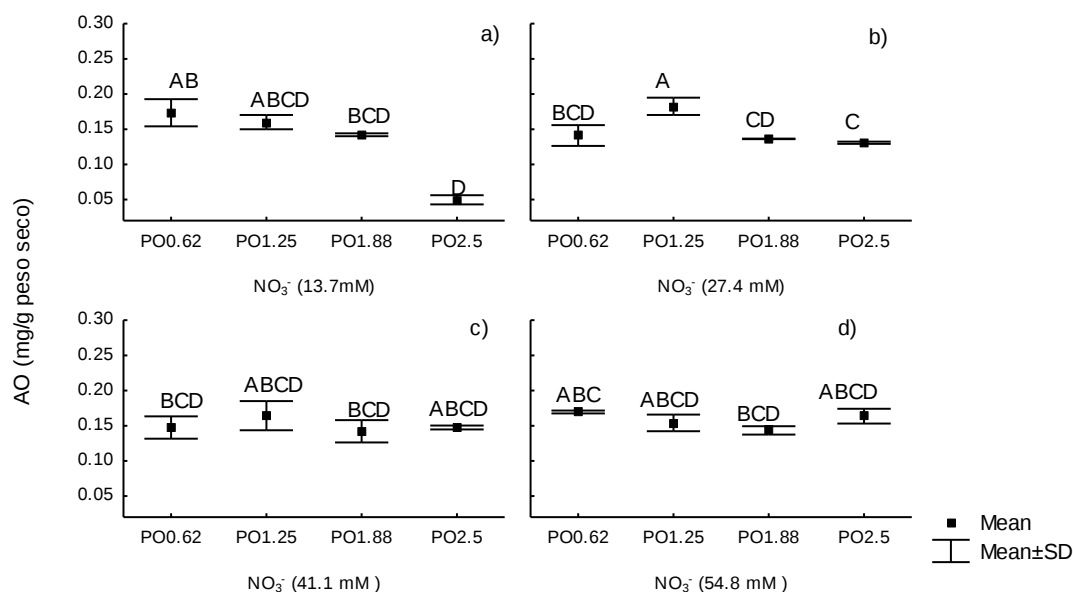
La línea L5 presenta un comportamiento similar a L1, la adición de fosfatos al medio de cultivo tuvo un efecto estadísticamente significativo ($F_{9;64}=4.720$ y $P<0.01$) en la acumulación de biomasa. A concentraciones 1.25, 1.88 y 2.5 mM de PO_4^{3-} se promueve una mayor producción de biomasa en las raíces pilosas (Figure 10). Por otro lado, las modificaciones de nitratos ($F_{3;64} = 2.383$ y $P > 0.05$) y la interacción de estos con los fosfatos ($F_{9;64} = 0.623$ y $P > 0.05$) influyó significativamente en el peso seco de raíces pilosas entre los tratamientos.



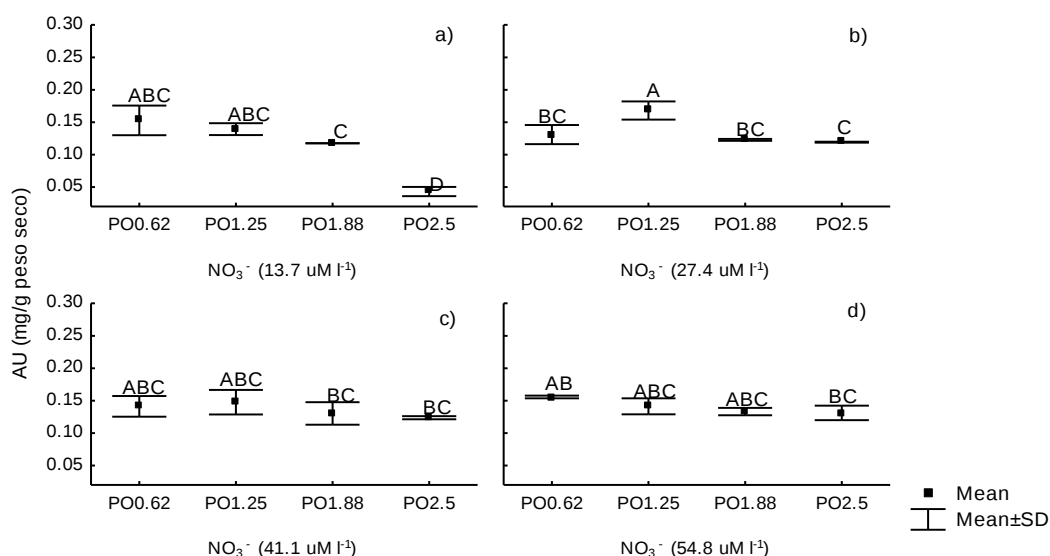
Gráfica 10. Acumulación de biomasa de la línea 5 de raíces pilosas cultivadas en medio MS2 modificado en la concentración de fosfatos Letras diferentes nos representa que existen diferencias significativas.

Por su parte, la modificación de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ influyó en la acumulación de AU y AO de ambas líneas de raíces transformadas. En L1 la producción de AO presentó diferencias significativas ($F_{9;32} = 18.654$ y $P < 0.001$) entre las diferentes concentraciones de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ siendo el tratamiento con relación 27.4:1.25 mM de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ el de mayor acumulación de AO (0.182 mg/g) y 0.04 mg/g fue la menor concentración en el tratamiento con una relación de 13.7:2.5 $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ (gráfica 11A). La concentración de AU también presentó diferencias significativas

entre las interacciones de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ ($F_{9;32}=10.013$ y $P<0.001$). El ácido ursólico se obtuvo en mayor concentración al utilizar una relación de 1.25 mM de PO_4^{3-} con 27.4 mM de NO_3^- , con una concentración de 0.17 mg/g de peso seco. La concentración más baja de AU se obtuvo en una relación de 13.7:2.5 de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$, con un rendimiento de 0.04 mg/g de peso seco (Gráfica 11B).



A)



B)

Gráfica 11. Efecto de la concentración de fosfatos en la acumulación de AU y AO en raíces pilosas cultivadas en medio MS/B5 modificado. A) L1 y B) L5. Letras diferentes nos representa que existen diferencias significativas.

En la línea L5 no se observaron diferencias significativas en la producción de AU y AO. Al evaluar la modificación en la relación de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ en el medio de cultivo para la producción de AO no se observó diferencias significativas ($F_{9,32}=0.001$ y $P>0.05$); sin embargo, los fosfatos sí influyeron en su producción ($F_{3,32}=4.368$ y $p<0.05$) al igual que los nitratos ($F_{3,32}=9.318$ y $p<0.001$), siendo el tratamiento de 13.7:1.25 mM de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ el de mayor acumulación de AO con un rendimiento de 0.18 ± 0.01 mg/g de peso seco.

No hubo producción de AU en L5, excepto en el tratamiento 13.7:0.62 mM de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^{3-}$ con un rendimiento de 0.154 ± 0.001 mg/g de peso seco. En la tabla 14, se muestra la acumulación de AU y AO en todos los tratamientos evaluados en las líneas L1 y L5.

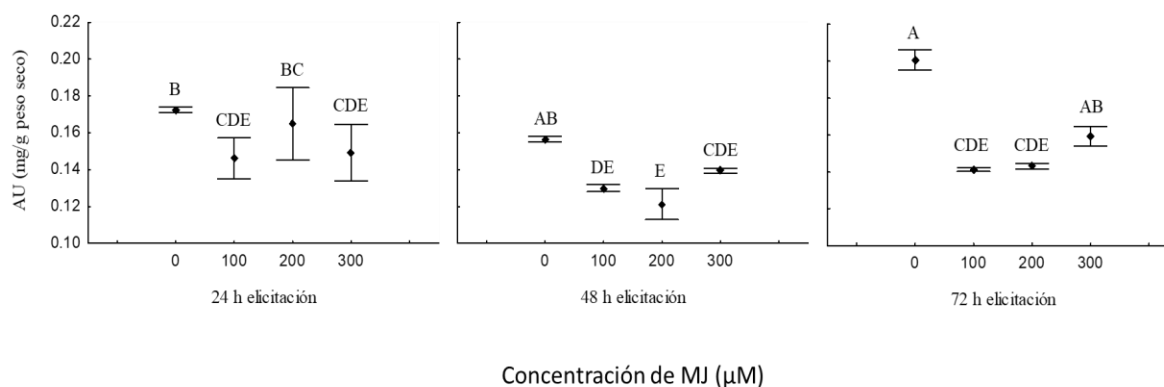
Tabla 14. Producción de AU y AO en líneas de raíces transformadas de *L. caulescens* crecidas bajo diferentes concentraciones de $\text{NO}_3^-:\text{PO}_4^3$

Trat.	Línea L1			Línea L5		
	Peso	UA	OA	Peso	UA	OA
	seco**	mg/g*	mg/g*	seco**	mg/g*	mg/g*
A1	1.89 ±0.03	0.153 ± 0.02 ^{ABC}	0.173 ± 0.02 ^{AB}	1.71±0.03	-	0.133 ± 0.02 ^{AB}
A2	1.95 ±0.04	0.131 ± 0.01 ^{BC}	0.141 ± .02 ^{BCD}	1.71±0.07	-	0.084 ± .02 ^B
A3	2.04 ±0.04	0.141 ± 0.02 ^{ABC}	0.147 ± 0.02 ^{AB}	1.75±0.02	-	0.091 ± 0.01 ^B
A4	1.83 ±0.04	0.156 ± 0.002 ^{AB}	0.170 ±0.002 ^{ABC}	1.49±0.05	-	0.106 ±0.001 ^{ABCD}
B1	1.95 ±0.06	0.139 ± 0.01 ^{ABC}	0.160 ± 0.01 ^{ABCD}	1.93±0.06	0.154 ± 0.001 ^A	0.182 ± 0.09 ^A
B2	1.71 ±0.05	0.168 ± 0.01 ^A	0.183 ± 0.01 ^A	2.01±0.04	-	0.101 ± 0.001 ^B
B3	2.21 ±0.10	0.148 ± 0.02 ^{ABC}	0.164 ± 0.02 ^{ABCD}	1.82±0.06	-	0.082 ± 0.001 ^B
B4	2.04 ±0.03	0.141 ± 0.01 ^{ABC}	0.154 ± 0.01 ^{ABCD}	1.80±0.04	-	0.113 ± 0.002 ^{AB}
C1	1.64 ±0.06	0.118 ± 0.001 ^C	0.142 ± 0.002 ^{BCD}	1.78±0.05	-	0.092 ± 0.001 ^B
C2	2.22 ±0.03	0.123 ± 0.001 ^{BC}	0.136 ± 0.001 ^{CD}	1.77±0.02	-	0.094 ± 0.001 ^B
C3	1.67 ±0.05	0.130 ± 0.02 ^{BC}	0.142 ± 0.02 ^{BCD}	1.85±0.06	-	0.077 ± 0.001 ^B
C4	1.72 ±0.05	0.133 ± 0.01 ^{ABC}	0.143 ± 0.05 ^{BCD}	1.78±0.04	-	0.089 ± 0.003 ^B
D1	2.11 ±0.02	0.043 ± 0.007 ^D	0.050 ± 0.006 ^E	2.07±0.05	-	0.114 ± 0.002 ^{AB}
D2	1.93 ±0.05	0.119 ± 0.0007 ^C	0.131 ± 0.001 ^D	1.94±0.06	-	0.1 ± 0.002 ^B
D3	1.97 ±0.02	0.124 ± 0.002 ^{BC}	0.148 ± 0.002 ^{ABCD}	1.89±0.03	-	0.078 ± 0.002 ^B
D4	1.85 ±0.04	0.131 ± 0.01 ^{BC}	0.164 ± 0.01 ^{ABCD}	1.74±0.03	-	0.080 ± 0.001 ^B

Los valores son las medias de 3* y 5** repeticiones ±desviación estándar

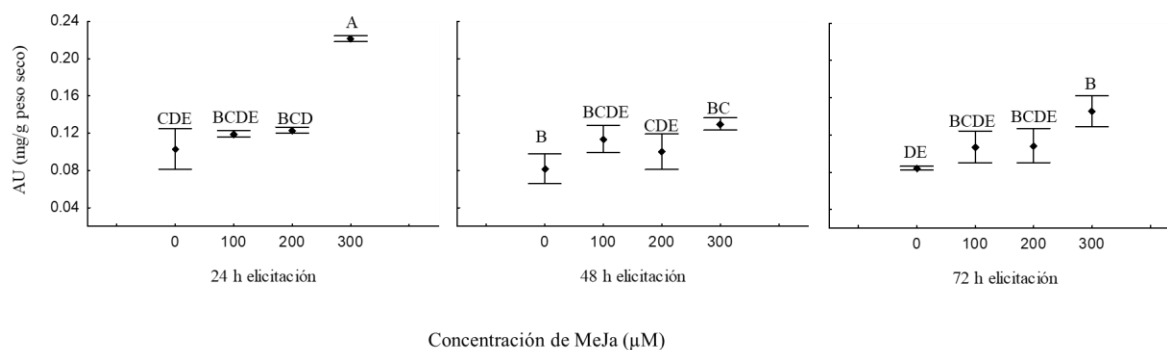
VIII.7 Efecto del metil jasmonato en la acumulación de AU y AO en raíces transformadas de *L. caulescens*

La producción de AU mostró diferencias significativas tanto para la línea 1 ($F_{6;24} = 5.90$ y $P < 0.001$) como para la línea 5 ($F_{6;24} = 6.581$ y $P < 0.001$) entre la interacción de las concentraciones de MeJa y tiempo de elicitación. La mayor acumulación de AU en la línea 1 se obtuvo con el tratamiento con una concentración de 300 μM de MeJa y un tiempo de exposición de 24 h, obteniendo una producción de 0.201 ± 0.00 mg/g de peso seco. Por el contrario, el tratamiento con menor rendimiento de AU (0.121 ± 0.01 mg/g de peso seco) fue obtenido con el tratamiento con 200 μM de MeJa elicitado por 48 h (gráfica 12). De acuerdo con los análisis estadísticos tanto las concentraciones de MeJa ($F_{3;24} = 34.58$) como el tiempo de elicitación ($F_{2;24} = 28.14$) influyeron en la producción de este compuesto.



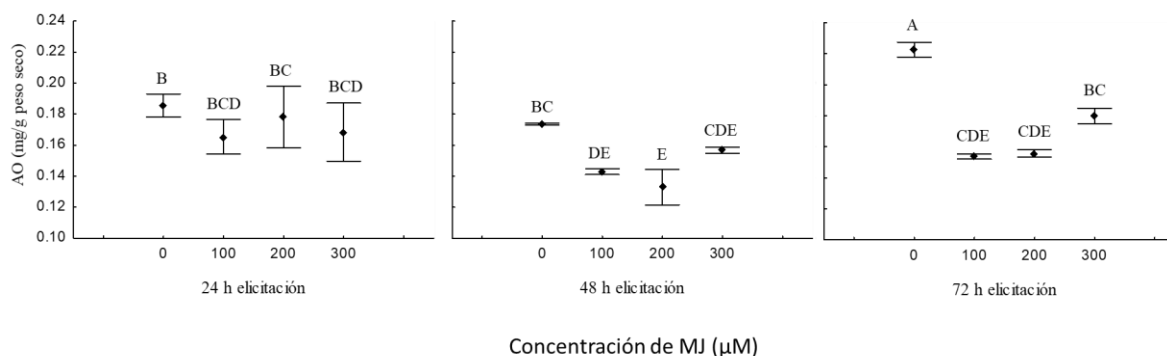
Gráfica 12. Acumulación de AU en cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* (L1) elicidadas con MeJa (0, 100, 200 y 300 μM) durante 24, 48 y 72 horas. Cada tratamiento corresponde a las medias de cinco repeticiones $\pm$ la desviación estándar, letras diferentes nos representan diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey.

Para la línea 5, el mejor rendimiento de AU se obtuvo al elicitar los cultivos con una concentración de 300 μM de MeJa ($F_{3;24} = 49.21$) por un tiempo de exposición de 24 h ($F_{2;24} = 23.12$), obteniendo una producción de 0.22 ± 0.00 mg/g de peso seco. Por el contrario, el tratamiento con menor rendimiento de AU (0.08 ± 0.01 mg/g de peso seco) fue obtenido con el tratamiento control de 72 h de elicitación (gráfica 13).



Gráfica 13. Acumulación de AU en cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* (L5) elicidadas con MeJa (0, 100, 200 y 300 µM) por 24, 48 y 72 horas. Cada tratamiento corresponde a las medias de cinco repeticiones $\pm$ la desviación estándar, letras diferentes nos representan diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey.

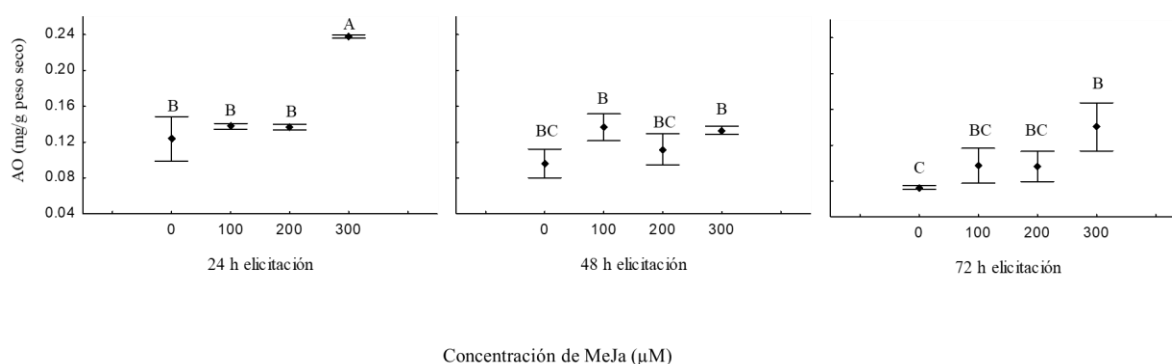
La producción de AO mostró diferencias significativas tanto para la línea 1 ($F_{6;24} = 6.43$ y $P < 0.001$) como para la línea 5 ($F_{6;24} = 6.63$ y $P < 0.001$) entre la interacción de las concentraciones de MeJa y tiempo de elicitación. En la Línea 1, la mayor acumulación de AO se obtuvo con el tratamiento control elicitado por 72 h con una producción de 0.22 ± 0.00 mg/g de peso seco (gráfica 14). Por el contrario, el tratamiento con menor rendimiento de AO (0.13 ± 0.01 mg/g de peso seco) se obtuvo con una concentración de 200 µM de MeJa y con un tiempo de elicitación de 48 h. De acuerdo con los análisis estadísticos tanto las concentraciones de MeJa ($F_{3;24} = 33.03$) como el tiempo de elicitación ($F_{2;24} = 26.37$) influyeron en la producción de este compuesto.



Gráfica 14. Acumulación de AO en cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* (L1) elicidadas con 0, 100, 200 y 300 µM de MeJa durante 24, 48 y 72 horas. Cada tratamiento

corresponde a las medias de cinco repeticiones $\pm$ la desviación estándar, letras diferentes nos representan diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey.

Los tratamientos correspondientes a los cultivos de la línea 5 mostraron diferencias significativas ($F_{6;24} = 6.631$ y $P < 0.001$), el mejor rendimiento de AO (0.24 ± 0.00 mg/g de peso seco) se obtuvo elicitando los cultivos por 24 h con una concentración de 300 μ M de MeJa. El tratamiento con el menor rendimiento de AO (0.07 ± 0.00 mg/g de peso seco) fue obtenido con el tratamiento control con un tiempo de elicitación de 72 h (gráfica 15); el análisis de Tukey nos muestra que la mejor concentración para la producción de AO en la Línea 5 es de 300 μ M ($F_{3;24} = 36.88$ y $P < 0.001$), y 24 h es el mejor tiempo de elicitación ($F_{2;24} = 43.37$ and $P < 0.001$),



Gráfica 15. Acumulación de AO en cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* (L5) después de la elicitación con 0, 100, 200 y 300 μ M de MeJa durante 24, 48 y 72 horas. Cada tratamiento corresponde a las medias de cinco repeticiones $\pm$ la desviación estándar, letras diferentes nos representan diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey.

VIII.8 Efecto de MeJa en la acumulación de AR en raíces transformadas de *L. caulescens*

Para determinar la presencia de ácido rosmarínico en los extractos metanólicos de las líneas 1 y 5 de raíces transformadas, así, como en planta silvestre de *L. caulescens*, se realizó previamente una cromatografía en capa fina con los diferentes extractos a evaluar (Fig. 20),

La cromatografía en capa fina realizada para los extractos de las líneas de raíces transformadas y planta silvestre revela la presencia de AR en los extractos metanólicos, presentando un RF de 0.71 (Fig. 20).

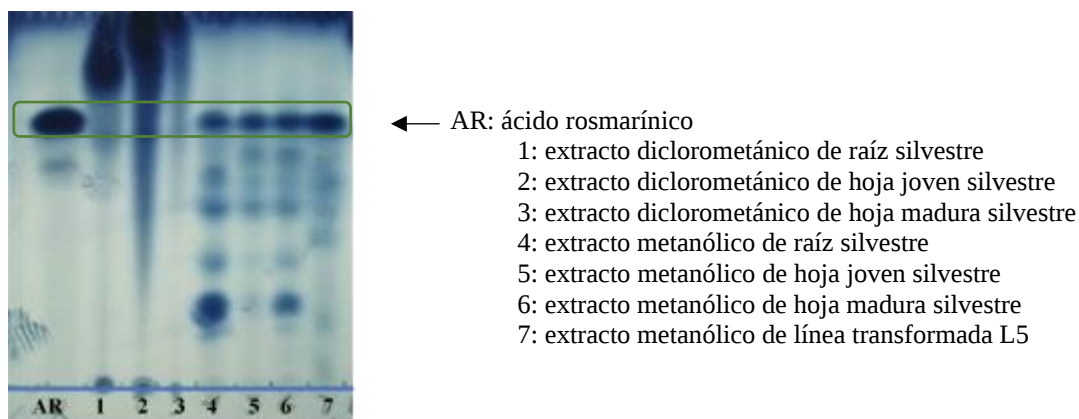
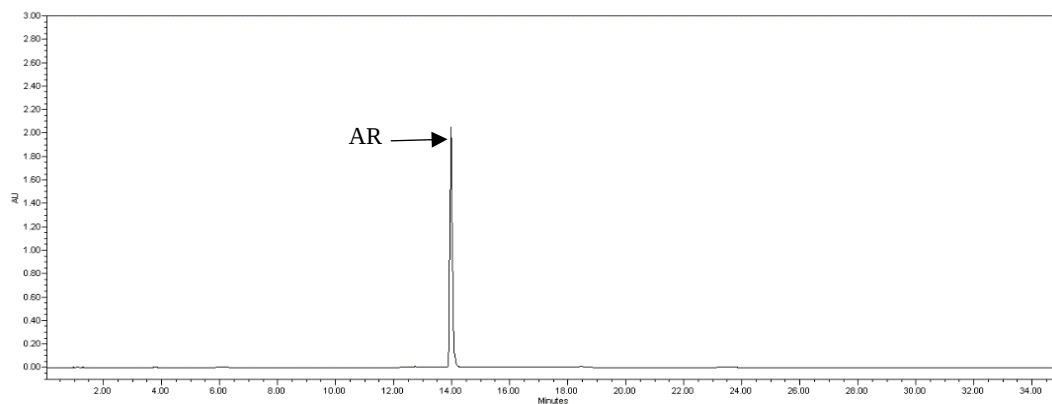
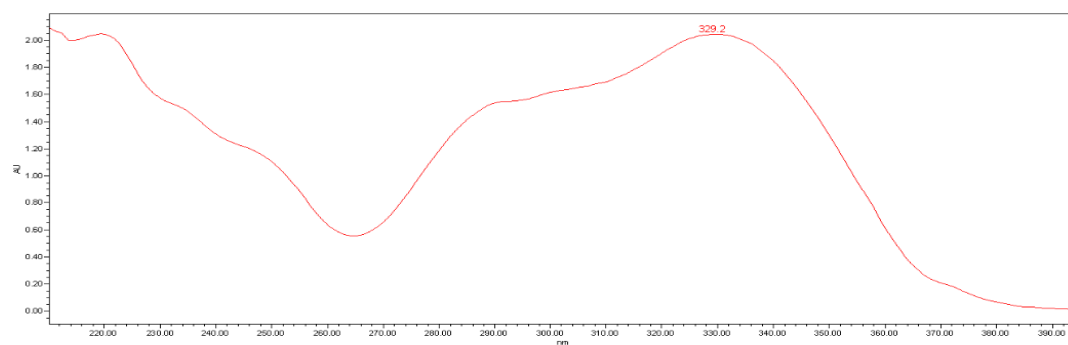


Figura 20. Identificación de AR en cromatografía en capa fina de extractos diclorometánicos y metanólicos de planta silvestre y raíces transformadas de *L. caulescens*.

Los resultados de la CLAR confirmaron la presencia del AR en las raíces pilosas y la planta silvestre. El tiempo de retención observado para el AR fue de 14 min y su absorción fue de 329.2 unidades (Fig.21)



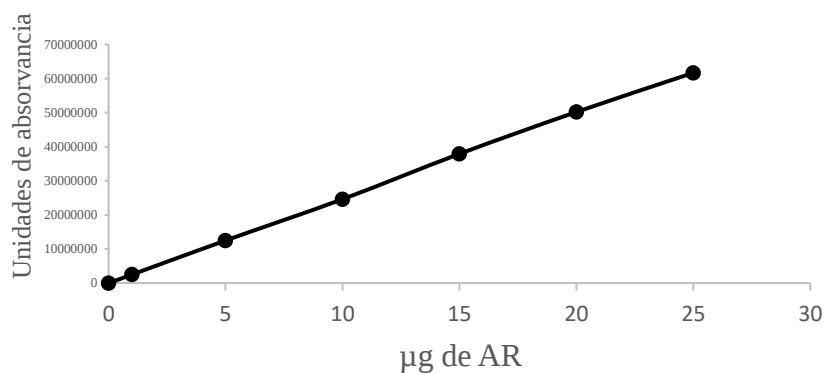
A



B

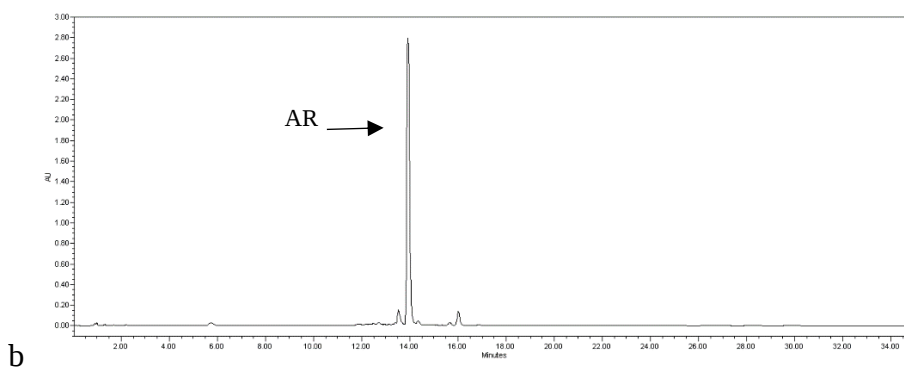
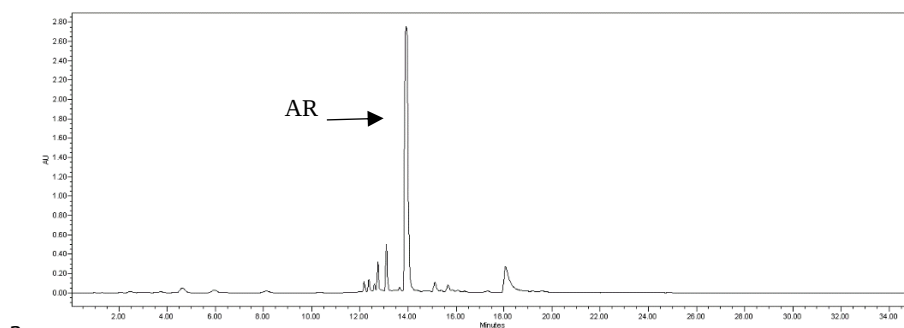
Figura 21. Determinación de AR por CLAR. A) Perfil cromatográfico del estándar de ácido rosmarínico. B) espectro de absorción de AR.

Una vez determinada la presencia de AR por cromatografía en capa fina en los distintos extractos y a su vez establecidas las condiciones de detección de AR por medio de HPLC, se realizó una curva de calibración para cuantificar el contenido de AR a través de las áreas obtenidas bajo la curva. La gráfica 16 nos muestra los resultados de la curva de calibración, mostrando una r^2 con valor de 0.9899.



Gráfica 16. Curva de calibración de AR. $r^2 = 0.9899$

En cada uno de los cromatogramas obtenidos de los extractos evaluados de planta silvestre y raíces transformadas de las líneas 1 y 5, se observó la presencia de AR, en la Fig. 22, podemos observar los cromatogramas correspondientes a los extractos de hoja joven de planta silvestre, control de L1 y control de L5. El resto de los cromatogramas obtenidos, los podemos ver en el anexo 1.



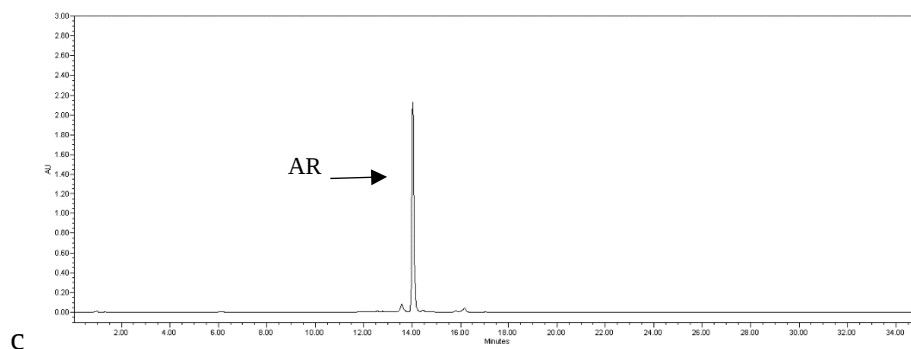
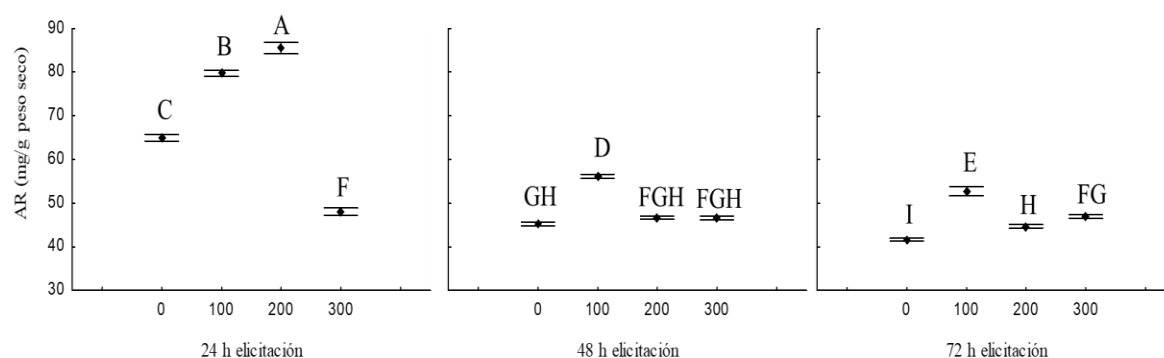


Figura 22. Cromatogramas de ácido rosmarínico de raíces transformadas y planta silvestre de *L. caulescens*. a) hoja joven de planta silvestre b) línea 1 de raíces transformadas c) línea 5 de raíces transformadas

Los resultados estadísticos realizados a los cultivos elicitados de la línea 1 de raíces transformadas de *L. caulescens* mostraron diferencias significativas entre los tratamientos al evaluar la interacción de las concentraciones de MeJa versus tiempo de elicitación ($F_{6;24} = 525.0$ y $p < 0.001$). La prueba de Tukey mostró que una concentración de 100 μM de MeJa ($P_{3;24} = 976.5$) y un tiempo de elicitación de 24 h ($P_{2;24} = 4013.3$) fueron las condiciones favorables para la acumulación de compuestos.

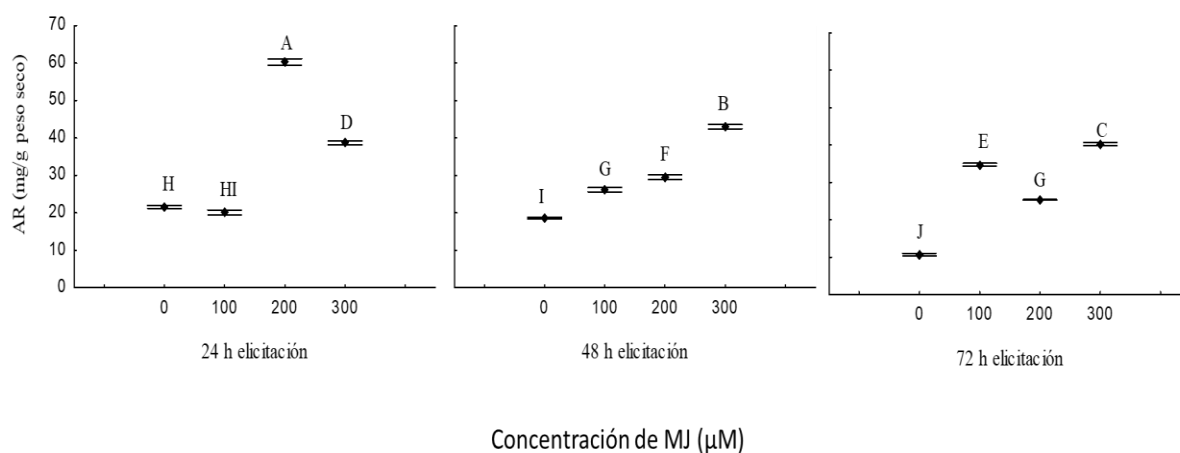
De acuerdo con los resultados estadísticos, la mayor acumulación de AR (85.48 ± 1.32 mg/g de peso seco) en la línea 1 se obtuvo al tratar las raíces por 24 h con 100 μM de MeJa (gráfica 17).



Gráfica 17. Acumulación de AR en cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* (L1) elicidadas con diferentes concentraciones de MeJa (0, 100, 200 y 300 μ M) y tiempos de elicitación. Cada tratamiento corresponde a las medias de cinco repeticiones $\pm$ la desviación estándar, letras diferentes nos representan diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey.

Los cultivos de raíces transformadas de la L5 también mostraron un incremento significativo de AR en todos los tratamientos elicitados respecto a los controles ($F_{6;24}= 1491.0$ y $p < 0.001$) (gráfica 18). El mayor rendimiento de AR fue de 60.27 ± 0.88 mg/g de peso seco en el tratamiento elicitado por 24 h con una concentración de 200 μ M de MeJa.

La prueba de Tukey realizada entre las concentraciones de MeJa ($F_{3;24}= 4114.9$ y $p < 0.001$) y tiempo de elicitación ($F_{2;24}= 695.8$ y $p < 0.001$), nos muestran que 300 μ M de MeJa y 24 h de exposición son las condiciones mejores para la acumulación de AR en esta línea.



Gráfica 18. Acumulación de AR en cultivos de raíces transformadas de *L. caulescens* (L5) elicidadas con diferentes concentraciones de MeJa (0, 100, 200 y 300 μ M) y tiempos de elicitación. Cada tratamiento corresponde a las medias de cinco repeticiones $\pm$ la desviación estándar, letras diferentes nos representan diferencias significativas de acuerdo con el análisis de Tukey.

La siguiente tabla nos muestra el rendimiento obtenido en cada uno de los diferentes tratamientos elicitados tanto para la L1 y L5 de raíces transformadas.

Tabla 15. Producción de ácido rosmarínico en líneas de raíces transformadas elicidadas con metil jasmonato.

Línea	TE (h)	Concentración de metil jasmonato (µM)			
		Control	100	200	300
Producción de AR (mg/g peso seco)					
L1	24	65.00 ± 0.78 ^C	79.74 ± 0.69 ^B	85.48 ± 1.32 ^A	48.05 ± 0.80 ^F
	48	45.17 ± 0.45 ^{GH}	56.10 ± 0.50 ^D	46.66 ± 0.37 ^{FGH}	46.59 ± 0.38 ^{FGH}
	72	41.66 ± 0.31 ^I	52.81 ± 1.06 ^E	44.70 ± 0.37 ^H	46.95 ± 0.49 ^{FG}
L5	24	21.60 ± 0.38 ^H	20.11 ± 0.68 ^{HI}	60.27 ± 0.88 ^A	38.71 ± 0.46 ^D
	48	18.64 ± 0.25 ^I	26.19 ± 0.57 ^G	29.62 ± 0.65 ^F	43.01 ± 0.56 ^B
	72	10.71 ± 0.34 ^J	34.69 ± 0.40 ^E	25.37 ± 0.11 ^G	40.24 ± 0.39 ^C

* TE: tiempo de elicitación, los valores son las medias de 5 repeticiones $\pm$ desviación estándar.

Los extractos metanólicos de planta silvestre fueron evaluados por CLAR, observándose una producción de AR menor comparada con la obtenida en los cultivos de las líneas 1 y 5 de raíces transformadas de *L. caulescens*. En la tabla 16 se muestran los rendimientos que presentaron los deferentes tejidos evaluados.

Tabla 16. Producción de ácido rosmarínico en planta silvestre de *L. caulescens*.

Tipo de explante	Material vegetal (g)	Rendimiento extracto (g)	Producción de AR (mg/g de peso seco)
Raíz	84.28	8.90	14.15 $\pm$ 0.09
Hojas jóvenes	47.37	6.38	27.70 $\pm$ 0.27
Hojas maduras	175.13	25.30	28.08 $\pm$ 0.53

IX. DISCUSIÓN

Las investigaciones para la búsqueda, producción e incremento de metabolitos secundarios en sistemas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales cada vez son mayores. El cultivo de raíces transformadas sigue siendo una de las estrategias más usadas para la producción de biomoléculas bioactivas, debido a las características que este tipo de cultivo presenta, como el rápido crecimiento de biomasa, la estabilidad genética, y en muchos de los casos una producción mayor de metabolitos secundarios a los de la planta silvestre.

En el presente trabajo logramos establecer un cultivo de raíces pilosas de *L. caulescens*, productoras de AU, AO y AR. La eficiencia de transformación del 75% observada en este estudio al utilizar la cepa ATCC 15834 es alta al observar otros reportes en especies de la misma familia además de un estudio previo en nuestro grupo de trabajo utilizando la misma cepa a una DO_{600nm} de 0.5 empleando explantes de hoja utilizando el método de corte (realizar un corte al explante con el bisturí infectado de la solución bacteriana), para el método de sumergido, como es el caso de nuestra metodología, se obtuvo un 57.14% ([Moreno, 2015](#)). Al utilizar las cepas A4 y K599 no se generaron raíces transformadas, lo que nos sugiere que puede existir una especificidad de la cepa de *A. rhizogenes* para lograr la transformación de *L. caulescens*. En estudios realizados en especies de la familia Lamiaceae como *Salvia castanea* al emplear la cepa ATCC 15834 se observó hasta un 8 % de inducción de raíces pilosas en los explantes inoculados después de 5 semanas de cultivo ([Li, et al. 2016](#)) en *Agastache foeniculum* obtuvieron un 51.1% y 6.66% de inducción de raíces pilosas con las cepas A4 y 9435 respectivamente, en explantes de hoja de un mes de edad ([Nourozi, et al. 2014](#)); en *Origanum vulgare* reportan una respuesta de inducción de raíces en explantes de hoja del 91.3 % al utilizar las cepas ATCC 15834 y K 599 a una DO_{600nm} de 0.8; en *Ocimum tenuiflorum*. no se obtuvo raíces pilosas al utilizar la cepa A4, mientras que la cepa LBA 9402 genera un 76.66 % de respuesta ([Sharan, et al. 2019](#)); en especies de otras familias como *Bacopa monnieri* la frecuencia de inducción de raíces pilosas con las cepas A4 y LBA 9402 de *A. rhizogenes* fue de $31.31 \pm 1.24\%$ y $26.03 \pm 3.14\%$, respectivamente ([Majumdar, et al. 2011](#)), en especies de *Capsicum*, la frecuencia de inducción fue en un rango de 54-70% con la cepa ATCC 15834 después de un mes de cultivo ([Setamam, et al. 2014](#))

La selección de una cepa efectiva de *A. rhizogenes* para la generación de cultivos de raíces transformadas depende muchas veces de la especie de la planta y esto solo se determina empíricamente. En este trabajo no se obtuvo respuesta con las cepas A4 y K599, solo la cepa ATCC 15834 originó las 15 líneas de raíces transformadas reportadas en esta tesis. El fenotipo y la acumulación de metabolitos fue diferente entre ellas, esto se observa con frecuencia en cultivos de raíces pilosas debido a la inserción de los genes *rol*, existen diversos estudios en los que se ha demostrado la función individual o en combinación unos con otros de estos genes en diferentes especies de plantas. Nosotros sólo pudimos confirmar la inserción del gen *rol B* en 11 de las 15 líneas evaluadas. En la línea 5 se obtuvo la mayor acumulación de AU y AO y en esta línea se logró confirmar la inserción del gen *rol B*, por otro lado, la línea 1 no amplificó para el *rol B*, lo que sugiere que probablemente pueda tener la inserción del gen *rol C*, cabe señalar que se trató de amplificar el gen *rol B* en varias ocasiones en esta línea y no amplificó en los demás ensayos y la producción de AU y AO fue menor que todas, [Bulgakow](#) (2008) menciona que este gen es un inductor del metabolismo secundario y al mismo tiempo un inhibidor del crecimiento celular.

La inserción de uno o varios genes *rol* hace que el cultivo de raíces genéticamente transformadas sea una alternativa para la producción de moléculas bioactivas y producción de biomasa, debido a la estabilidad genética y bioquímica que presentan por largos periodos de cultivo. Además de ello, la producción de metabolitos secundarios, el crecimiento y el rendimiento total de biomasa pueden mejorar, modificando algunos parámetros de las condiciones de cultivo como lo son el nivel de sacarosa, el uso de reguladores exógenos de crecimiento, modificaciones en la fuente y cantidades de nitrógeno, luz, temperatura, entre otros ([Rawat, 2019](#)).

Una de las fuentes más empleada en los medios de cultivo de células y tejidos es la sacarosa, ya que es uno de los carbohidratos presentes en la savia del floema de muchas plantas. La sacarosa además de ser una fuente de energía actúa como una molécula señal que afecta el crecimiento desarrollo y metabolismo celular en todos los estadios del ciclo de vida de las plantas, sin embargo, a concentraciones altas puede ocasionar la producción de especies reactivas de oxígeno y polifenoles ([Tabar, et al. 2019](#); [Reis, et al. 2019](#)).

Al evaluar el efecto de la modificación de concentración de sacarosa en el medio de cultivo, los análisis estadísticos mostraron un crecimiento de la biomasa proporcional a la concentración de sacarosa utilizada en el medio de cultivo. A concentraciones de 15 g/l el crecimiento fue menor, obteniéndose la mayor producción de biomasa en los niveles más altos al utilizar 60 g/l, esto se observó en las dos líneas evaluadas L1 y L5. Se sabe que las invertasas presentes en las células vegetales hidrolizan la sacarosa en fructosa y glucosa presente en el medio de cultivo para su consumo teniendo una preferencia primeramente por la glucosa que fructosa. Por otro lado, la producción de AU y AO no fue proporcional al incremento de sacarosa, para la línea 1 los tratamientos con 15 y 60 g/l de sacarosa fueron los mayores productores para AU y para AO el tratamiento de 60 g/l fue el mejor. Para L5 al utilizar concentraciones de 60 g/l de sacarosa la producción de AU fue menor en comparación con los demás tratamientos, siendo el tratamiento de 45 g/l el de mayor producción de AU; para el caso de AO los tratamientos con 30 y 45 g/l de sacarosa fueron los tratamientos estadísticamente más altos para la producción de este compuesto.

En general se ha observado que el uso de sacarosa en el cultivo *in vitro* en concentraciones altas genera cambios en el crecimiento y el metabolismo secundario. En raíces transformadas de *Echinacea purpurea* el incremento de biomasa se observó al utilizar 60 g/l de sacarosa, mientras que a concentraciones de 90 y 100 g/l el crecimiento fue inhibido ([Tabar, et al. 2019](#)). Resultados similares se observaron en la especie *Trifolium pratense* al utilizar altas concentraciones de sacarosa (90 y 120 g/l) combinada con ácido salicílico (140 g/l) el crecimiento de raíces transformadas fue inhibido, sin embargo, la producción de flavonoides se vio favorecida en altas concentraciones comparadas con las producidas en el control (10 g/l) ([Reis, et al. 2019](#)). En *Salvia leriifolia*, el incremento de sacarosa en cultivo de células en suspensión promovió el incremento tanto de biomasa como de ácido cafeico y ácido salvianólico B al utilizar una concentración de 40 g/l, así mismo, la producción de ácido rosmarínico (6.409 mg /g) incremento al utilizar una concentración de 50 g/l de sacarosa en el cultivo ([Modarres, et al 2018](#)). En *Pelargonium sidoides* bajas concentraciones de sacarosa (15 g/l) disminuyeron la producción de ácidos fenólicos, mientras que altas concentraciones (30 g/l) ocupadas en este estudio mostraron resultados positivos ([Yousefian, et al. 2020](#)). Altas concentraciones de azadiractina (5.2 mg/g) fueron reportadas por [Srivastava y Srivastava](#) (2012) en cultivos de

raíces pilosas de *Azadirachta indica* al utilizar una concentración de 40 g/l en el cultivo. En este estudio, se logró observar que concentraciones elevadas de sacarosa promueven una mayor producción de biomasa, así como una acumulación de AU y AO en las líneas estudiadas.

Otros de los factores que pueden afectar el crecimiento y la producción de metabolitos son los niveles de nitratos y fosfatos. Se conoce que tanto el nitrógeno como el fósforo, son elementos indispensables para un crecimiento óptimo de las plantas, y que la concentración de alguno de ellos repercute en la producción de metabolitos secundarios, ya que dichos compuestos son los elementos necesarios que contribuyen a la síntesis de diferentes compuestos orgánicos como aminoácidos, proteínas, enzimas y ácidos nucleicos ([Chrysargyris, et al. 2016](#)). En algunos estudios se ha observado que la deficiencia de fosfato induce la formación y elongación de raíces transformadas ([López-Bucio, et al. 2003](#)). Los resultados obtenidos sobre la modificación de nutrientes mostraron un mejor crecimiento y alargamiento de las raíces al utilizar una concentración baja de NO_3^- (13.7 mM l^{-1}); al utilizar concentraciones altas de nitrato combinadas con una concentración baja de fosfato, el desarrollo se ve desfavorecido, generando un cultivo de raíces compactas y de color marrón oscuro. Por el contrario, altas concentraciones de nitratos con altas de fosfatos, los cultivos se ven favorecidos fenotípicamente. Sin embargo, el análisis estadístico nos muestra que las modificaciones de fosfatos son las que nos presenta diferencias significativas con respecto a la acumulación de biomasa, los mejores tratamientos incluyen las concentraciones de 1.25, 1.88 y 2.5 mM de PO_4^{3-} . En un estudio realizado en *Lavandula angustifolia* Mill, no se observó diferencias en el crecimiento de la planta al modificar las concentraciones nitrógeno, por el contrario, al incrementar la de fosfatos, observaron un rendimiento mayor de biomasa ([Chrysargyris, et al. 2019](#)), en cultivos celulares de *Catharanthus roseus*, al utilizar un nivel elevado de fosfatos con un pH de 5.82 en el medio de cultivo, el incremento de peso seco se vio favorecido, mientras que al utilizar concentraciones elevadas de nitrógeno y fosfato, el rendimiento de peso seco se vio afectado, mostrando una disminución comparadas con el control ([Mishra, et al. 2019](#)). Con esto podemos concluir que el nitrógeno y fósforo juegan un papel importante en la homeostasis de las plantas para lograr un buen crecimiento y rendimiento de biomasa ([Dlugosz, et al. 2018](#)).

Como podemos observar, las modificaciones de las concentraciones de nitratos y fosfatos en el medio de cultivo no solo tienen efecto sobre la biomasa, también en el rendimiento de algunos

MSec, en el caso particular de nuestra planta de estudio, pudimos observar que esta modificación tuvo efecto en la acumulación de AU y AO, siendo tal el caso que en tratamientos de la línea 5, no se produjo AU, algunos estudios han observado comportamientos similares en relación a la producción de compuestos, para el caso de *Ocimum sp.*, al incrementar la cantidad de nitratos obtuvieron un incremento en la concentración de ácido cafeico y ácido rosmarínico (1.45 mg/g y 61.2 mg/g, respectivamente) ([Jakovljević, et al. 2019](#)), en *Calendula officinalis* altos niveles de OA glicosilado se obtuvieron (171.97 µg/g de peso seco) al cambiar las concentraciones de nitrato en el medio de cultivo ([Dlugosz, et al. 2018](#)).

En este trabajo pudimos observar diferencias al modificar las concentraciones de sacarosa, nitratos y fosfatos en el medio de cultivo. Algunos autores sugieren que la alteración interna de C:N podría afectar en: los genes involucrados en la asimilación de N, fotosíntesis y metabolismo secundario, la concentración y composición de metabolitos, los cuales tienen importantes roles que determinan la calidad de los cultivos y plantas medicinales y, por último, la distribución de biomasa de la raíz al brote y la morfología de las plantas ([Deng, et al. 2019](#)).

Además de las modificaciones de nutrientes y concentraciones de sacarosa en el medio, existen otras estrategias que nos permiten incrementar tanto biomasa como la producción de metabolitos secundarios, una de ellas es el uso de sustancias llamadas elicitores, capaces de inducir o desencadenar una respuesta de defensa en las plantas, incluyendo la producción y acumulación de metabolitos secundarios los cuales desempeñan un papel importante en la adaptación a las condiciones de estrés sometidas ([Naik y Al-Khayri 2016](#)).

La utilización del MeJa en este trabajo, resultó de gran ayuda para la acumulación de AR en las líneas 1 y 5 de raíces transformadas de *L. caulescens*. El MeJa se conoce que actúa como segundo mensajero en varios procesos fisiológicos y también desencadena la respuesta de defensa (incluida la biosíntesis de metabolitos secundarios) contra el ataque de varios patógenos y herbívoros, lo que facilita la adaptación de las plantas a condiciones de estrés ([Kaur y Pati 2018](#)). En algunas especies como *Salvia miltiorriza* se ha observado que las proteínas JAZ y MYC2 son factores de transcripción claves en los procesos de señalización de la vía de los jasmonatos regulando positivamente la síntesis de AR y otros compuestos fenólicos ([Zhou, et al. 2018](#)).

El empleo de MeJa en los cultivos de la línea 1 de raíces transformadas de *L. caulescens* mostró diferencias significativas en la producción de AU y AO, sin embargo, los tratamientos control fueron los que produjeron más de estos compuestos en los distintos tratamientos de concentración y tiempo de exposición del elicitor de acuerdo con los análisis estadísticos. [Pandey y colaboradores \(2019\)](#), muestran resultados similares al utilizar MeJa como elicitor en cultivos celulares de *Ocimum basilicum* en los cuales la acumulación de AO se ve disminuida con respecto a los tratamientos control. Algunos autores afirman que para tener éxito y eficacia en la elicitación para obtener un incremento de metabolitos secundarios intervienen varios factores, como la línea celular, concentración del elicitor, metabolito secundario a evaluar, especificidad y tipo de elicitor, y algunas condiciones más como la composición del medio y el tiempo de elicitación ya que puede estar implícito en particular con el crecimiento celular ([Vasconsuelo y Boland, 2007](#); [Narayani y Srivastava, 2017](#)). En las líneas elicidadas, sólo en la línea 5 se logró confirmar la amplificación del gen *rol b*, lo que hace diferente de la otra línea, es por ellos que las concentraciones utilizadas para incrementar la producción de metabolitos no necesariamente tienen que ser las mismas.

Esto se ha observado en algunos trabajos en donde una concentración menor de elicitor resultó eficiente para el incremento de algunos metabolitos, en el caso de *Morinda elliptica*, los cultivos celulares fueron elicitados con 50 mM de ácido jasmónico y la producción de antraquinonas incrementó 1.6 veces más comparada con el control, y cuando se incrementó la concentración del elicitor a 100 y 200 mM, la producción de antraquinonas disminuyó, dando 1.4 y 1.2 veces más, respectivamente comparada con el control ([Chong, et al. 2005](#)). La producción de witanolido A, witanona y witaferina A incrementaron 50, 48 y 34 veces, respectivamente al elicitar raíces transformadas de *Withania somnifera* con 15 μ M de MeJa; cualquier variación que se realizó en la concentración del elicitor, resultó en una disminución de los metabolitos evaluados ([Sivanandhan, et al. 2013](#)).

Para el caso de la L5 se observó que la elicitación fue favorable al utilizar una concentración elevada de MeJa (300 μ M) con tiempos de elicitación de 24 y 72 h, siendo estos tratamientos los de mayor acumulación de AU.

La inducción y acumulación de metabolitos secundarios en plantas por la señalización de MeJa, no está restringida a cierto tipo de metabolitos, pero incluye una variedad de productos de metabolitos incluyendo terpenoides, flavonoides, alcaloides y fenilpropanoides además de muchos más metabolitos.

Es por ello por lo que el MeJa se ha propuesto como una molécula clave en el diseño de estrategias de elicitación para la acumulación de metabolitos secundarios. En varios estudios se ha observado que regula enzimas claves que interfieren con la biosíntesis a través de la vía isoprenoide de varios compuestos bioactivos ([Lambert, et al. 2011](#)). Podofilotoxina (*Podophyllum*), 6-metoxypodofilotoxina (*Linum*), ginsenoides (*Panax ginseng*), paclitaxel y taxanos (*Taxus* spp), alcaloides tropano (scopolamina y hyoscamina [*Hyoscyamus niger*]), estilbenos y t-resveratrol (*Vitis vinifera*), ácido rosmarínico (*Mentha piperita*, *Lavandula vera*), peruvosido (*Thevetia peruviana*), catarantina (un precursor de vinblastina [*Catharanthus roseus*]), y artemisinina (*Artemisia annua*) son algunos ejemplos de metabolitos secundarios de interés farmacéutico producidos e incrementado su acumulación con MeJa en diferentes cultivos in vitro ([Ramirez-Estrada, et al. 2016](#)).

Al igual que en la producción de AU y AO para la línea 5, la elicitación con MeJa tuvo efectos positivos en la acumulación de AR en las líneas 1 y 5 de raíces transformadas de *L. caulescens*, la concentración de 200 μ M de MeJa durante 24 h fue el mejor tratamiento para la acumulación de este compuesto en ambas líneas, al elicitar los cultivos por tiempos más prolongados (48 y 72 h) se observó una disminución en la acumulación de AR. Diferentes reportes señalan que MeJa es una molécula útil para incrementar o inducir la producción de metabolitos secundarios. En cultivos de raíces transformadas de *Salvia przewalskii* al utilizar una concentración de 400 μ M de MeJa se obtuvieron valores altos del contenido de ácido cafeico y criptotanshinona al exponer los cultivos durante 6 días, mientras que una alta producción de tanshinona IIA, ácido rosmarínico y ácido salvianólico B se obtuvieron durante 3 días de elicitación ([Li, et al. 2020](#)), en *Salvia miltiorrhiza* el MeJa además de incrementar la producción de AR, también lo hizo en la acumulación de ácido litospermico B con un alto rendimiento de aproximadamente 20% del peso seco de raíces transformadas ([Xiao, 2009](#)); en cultivos de raíces transformadas de *Mentha spicata* concentraciones de 100 μ M el MeJa favoreció la acumulación de cinco ácidos fenólicos incluidos AR, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido litospermico B y ácido t-cinámico.

Específicamente para el AR al utilizar la concentración antes mencionada obtuvieron un rendimiento de 11.84 más veces que la muestra control ([Yousefian, et al. 2020](#)).

En especies como *Ocimum basilicum* ([Kintzios, et al. 2003](#)), *Perilla frutescens* ([Lu, et al. 2013](#)), *Orthosiphon aristatus*, *Coleus blumei*, *Lithospermum erythrorhizon* ([Mizukami, et al. 1993](#); [Sumaryono, et al. 1991](#)) y *Agastache rugosa* ([Park, et al. 2016](#)) también se ha observado un incremento en la acumulación de AR al elicitar los diferentes cultivos con MeJa.

Por lo que se ha observado en diferentes estudios, el MeJa considerado como una fitohormona ha resultado favorable como elicitor en diferentes cultivos para incrementar la acumulación producción de AR en especies de la familia Lamiaceae.

Los niveles de expresión de genes claves en la biosíntesis del AR han sido estudiado en varias especies, muchos de ellos correlacionados con algún tipo de estrés en diferentes tipos de cultivo incrementando la producción de metabolitos de interés. Fenilalanina amonio liasa y tirosina aminotransferasa son genes encargados en las primeras etapas de dos vías biosintéticas paralelas de ácidos fenólicos, siendo la primera la relacionada con la biosíntesis de ácido cafeico, lignina, antocianidina y otros compuestos fenólicos ([Yu, et al. 2014](#)). RAS y CYP98A14 son enzimas encargadas de la etapa final en la ruta de biosíntesis de AR ([Zhang, et al. 2014](#)). En cultivo de raíces transformadas de *Salvia przewalskii* se observó una sobreexpresión en los genes de la enzima CYP98A14 incrementándose al tercer día al ser elicitados con 50 μ M ácido salicílico y 400 μ M MeJa, dando como resultado un incremento el contenido de AR ([Li, et al. 2020](#)). En *Salvia miltiorrhiza* la sobreexpresión del gen *SmTAT* no incremento el contenido de AR, sin embargo, la co-expresión de *SmTAT* y *SmHPPR* tuvo un efecto positivo en el incremento de producción de AR ([Xio, et al. 2011](#)). En cultivos celulares de *Agastache rugosa*, elicitados con 50 y 100 μ M de MeJa se observó la producción de AR, así como el análisis de expresión de los genes *PAL*, *C4H* and *4CL* implicados en la ruta biosintética. Los resultados mostraron que en concentraciones bajas de MeJa la producción de AR fue mayor que al utilizar una concentración más elevada de MeJa, relacionando esto con la reducción en la expresión de los genes antes mencionados ([Kim, et al. 2013](#)). Datos similares se observaron en cultivos de segmentos nodales de *Salvia Khuzistanica*, al utilizar 250 mg/l de MeJa como elicitor; estas condiciones mostraron altos niveles de mRNA de los genes *PAL*, *HPPR* y *TAT*, los cuales están relacionados con la biosíntesis de AR ([Fatemi, et al. 2019](#)).

En este trabajo se pudo observar que la aplicación de diferentes concentraciones de MeJa así como tiempo de elicitación, influyó en la acumulación de AU, AO y AR en las líneas de raíces transformadas de *L. caulescens*.

X. CONCLUSIONES

Se logró establecer un sistema de raíces transformadas de *L. caulescens* utilizando explantes de hoja mediante la cepa ATCC 15834 de *A. rhizogenes*. Las líneas de raíces transformadas son productoras de los compuestos AU, AO y AR.

Se determinó que la concentración de 45 g/l de sacarosa mostró mejores resultados para la producción de biomasa, así como de los compuestos AU y AO en el cultivo de raíces transformadas de *L. caulescens*. Por el contrario, la modificación de NO_3^- , PO_4^{3-} no influye en un incremento en la producción tanto de biomasa como de los Msec evaluados.

El empleo de MeJa como elicitador incrementó la producción de AU, AO y AR, en líneas transformadas de *L. caulescens*.

XI. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en la presente investigación pueden servir de base para futuros estudios en los cuales podría estudiarse la respuesta de enzimas claves que participan en las rutas metabólicas de terpenos y compuestos fenólicos para determinar las condiciones óptimas de cultivo para la producción de metabolitos secundarios de interés. Por otro lado, se podrían probar nuevas condiciones de transformación con algunas otras cepas de *A. rhizogenes* para obtener un fenotipo de cultivos diferentes para cultivarlos en medio líquido y poder escalarlos posiblemente a biorreactores para la producción de compuestos con interés farmacológico como lo son AU, AO y AR.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Crespo F., Vergara-Galicia J., Villalobos-Molina R., López-Guerrero J.J., Navarrete-Vázquez G., Estrada-Soto S. (2006). Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sciences*. Vol. 79. pp. 1062-1068
- Ahmad, N., Rab, A., Sajid, M., Ahmad, N., Fazal, H., Ali, M., y Egertsdotter, U. (2021). Sucrose-dependent production of biomass and low-caloric steviol glycosides in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Industrial Crops and Products*, 164, 113382.
- Akula, R., y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling and behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Alarcon-Aguilara F.J., Roman-Ramos R., Pérez-Gutierrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber C.C., Flores-Saenz J.L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 61. pp. 101-110
- Ali M, Abbasi BH, Ali GS (2015) Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium*. *The Plant Cell* **120**, 1099–1106.
- Andrade-Cetto A., Heinrich Michael. (2005). Mexican plants whit hypoglycaemic effect used in the treatament of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 99, pp. 325-348
- Ashour, M., Wink, M., y Gershenzon, J. (2018). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Annual Plant Reviews online*, 258-303.
- Avila Acevedo, J.G., muñoz López J.L., Martínez Cortés A., García Bores A. M., Martínez Cortés G., Peñalosa Castro I. (2005). *In vitro* anti-*Vibrio cholerae* activity of essential oil from *Lepechinia caulescens*. *Fitoterapia*, vol. 76. pp. 104-107
- Bayan, Y., y Küsek, M. (2018). Chemical composition and antifungal and antibacterial activity of *Mentha spicata* L. volatile oil. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 45(1), 64-69.
- Bacanlı, M., Başaran, A. A., y Başaran, N. (2017). The antioxidant, cytotoxic, and antigenotoxic effects of galangin, puerarin, and ursolic acid in mammalian cells. *Drug and chemical toxicology*, 40(3), 256-262.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K., Arora, S., (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *J. Plant Growth Regul.* 32 (1), 216-232.

- Bauer, N., Kiseljak, D., y Jelaska, S. (2009). The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. *Biologia plantarum*, 53(4), 650-656.
- Beigmohamadi, M., Movafeghi, A., Jafari, S., y Sharafi, A. (2020). Potential of the genetically transformed root cultures of *Plumbago europaea* for biomass and plumbagin production. *Biotechnology progress*, 36(2), e2905.
- Bensaddek L, Gillet F, Saucedo JEN, Fliniaux MA (2001) The effect of nitrate and ammonium concentrations of growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J Biotechnol* 85:35–40
- Bimakr, M., Rahman, R. A., Taip, F. S., Ganjloo, A., Salleh, L. M., Selamat, J., ... y Zaidul, I. S. M. (2011). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and bioproducts processing*, 89(1), 67-72.
- Biswas, T. (2020). Elicitor induced increased rosmarinic acid content of in vitro root cultures of *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). *Plant Science Today*, 7(2), 157-163.
- Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Fliniaux MA (2000) Effects of the rolC gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna*. *J Nat Prod* 63:1249–1252.
- Broun, P., Liu, Y., Queen, E., Schwarz, Y., Abenes, M.L., Leibman, M., (2006). Importance of transcription factors in the regulation of plant secondary metabolism and their relevance to the control of terpenoid accumulation. *Phytochem. Rev.* 5 (1), 27–38.
- Bulgakov V. P. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. – Adv.* 26, 318–324. 10.1016/j.biotechadv.2008.03.001
- Castillo Romero, Patricia C. (2004). Estudio químico y de actividad antioxidante en *Lepechinia meyenii* (Walp.). Tesis de maestría. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima Perú.
- Caretto S, Quarta A, Durante M, Nisi R, De Paolis A, Blando F, Mita G (2011) Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures. *Plant Biol* 13:51–58
- Chandra S. (2012). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: Role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Lett.* 34, 407–415. 10.1007/s10529-011-0785-3
- Chashmi NA, Sharifi M, Karimi F, Rahnema H (2008) Enhanced production of tropane alkaloids by nitrate treatment in hairy root cultures of *Atropa belladonna*. *J Biotechnol* 136:55
- Cheong, J. J., y Do Choi, Y. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *TRENDS in Genetics*, 19(7), 409-413.

Cheynier V, Comte G, Davies KM et al (2013) Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem* 72:1–20. doi:10.1016/

Chrysargyris, A., Panayiotou, C., y Tzortzakis, N. (2016). Nitrogen and phosphorus levels affected plant growth, essential oil composition and antioxidant status of lavender plant (*Lavandula angustifolia* Mill.). *Industrial Crops and Products*, 83, 577-586.

Choi DW, Jung J, Ha YI, Park HW, Chung HJ (2005) Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. *Plant Cell Reports* 23, 557–566. doi:10.1007/s00299-004-0845-4

Chong TM, Abdullah MA, Lai OM et al (2005) Effective elicitation factors in *Morinda elliptica* cell suspension culture. *Process Biochem* 40:3397–3405. doi:10.1016/j.procbio.2004.12.028

Coral Martínez, T. I. (2013). Aplicación de métodos quimiométricos para establecer la huella dactilar cromatográfica de *Morinda panamensis* y determinar su correlación con la actividad antidiabética (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Dar, R. A., Shahnawaz, M., y Qazi, P. H. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349-351.

Delgado G., Hernandez J., Chavez M. I., Alvarez L., Gonzaga V. y Martínez E. (1994). Di- and triterpenoid acids from *Lepechinia Caulescens*. *Phytochemistry*, Vol. 37, No. 4 pp 119-1121.

Deng, B., Li, Y., Xu, D., Ye, Q., y Liu, G. (2019). Nitrogen availability alters flavonoid accumulation in *Cyclocarya paliurus* via the effects on the internal carbon/nitrogen balance. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.

Ding, Y. J., Sun, C. Y., Wen, C. C., y Chen, Y. H. (2015). Nephroprotective role of resveratrol and ursolic acid in aristolochic acid intoxicated zebrafish. *Toxins*, 7(1), 97-109.

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley y Sons.

Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. (3^o ed.). New York: John Wiley y Sons Ltda, London. 539p.

Dietz KJ, Foyer C (1986) The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. *Planta* 167:376–381

Długosz, M., Markowski, M., y Pączkowski, C. (2018). Source of nitrogen as a factor limiting saponin production by hairy root and suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(2), 1-14.

Doñnenburg H, Knorr D (1995) Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb Technol* 17:674–684

Eloy, J. O., Saraiva, J., Albuquerque, S. D., y Marchetti, J. M. (2015). Preparation, characterization and evaluation of the in vivo trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(1), 101-109.

Elufioye, T. O., y Habtemariam, S. (2019). Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 112, 108600.

Estrada-Soto S., Navarrete-Vázquez G., León-Rivera I., Ríos M. Y., Aguilar-Guadarrama B., Castillo-España P., Ortiz-Andrade R., Aguirre-Crespo F. (2012). Antihypertensive effect of *Lepechinia caulescens* extract on spontaneously hypertensive rats. *Phytopharmacology* 2(1) 170-178.

Estrada-Soto, S., Rodríguez-Avilez, A., Castaneda-Avila, C., Castillo-España, P., Navarrete-Vázquez, G., Hernández, L., y Aguirre-Crespo, F. (2007). Spasmolytic action of *Lepechinia caulescens* is through calcium channel blockade and NO release. *Journal of ethnopharmacology*, 114(3), 364-370.

Fang, X., Yang, C.M.A.Q., Yang, L., Chen, X., (2011). Genomics grand for diversified plant secondary metabolites. *Plant Divers. Resour.* 33, 53-64

Fatemi, F., Abdollahi, M. R., Mirzaie-asl, A., Dastan, D., Garagounis, C., y Papadopoulou, K. (2019). Identification and expression profiling of rosmarinic acid biosynthetic genes from *Satureja khuzistanica* under carbon nanotubes and methyl jasmonate elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136(3), 561-573.

Feria-Romero, I., Lazo, E., Ponce-Noyola, T., Cerda-García-Rojas, C. M., y Ramos-Valdivia, A. C. (2005). Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Biotechnology letters*, 27(12), 839-843.

Fernández-León, I. M. (2014). Bioquímica del olivo: triterpenos pentacíclicos.

Ferreira, L. G., Celotto, A. C., Capellini, V. K., Albuquerque, A. A., Nadai, T. R., Carvalho, M. T. (2013). Is rosmarinic acid underestimated as an experimental cardiovascular drug? *Acta Cir. Bras.* 28 Suppl 1, 83–87. doi: 10.1590/s0102-86502013001300016

Gamborg, O., Millar, R. y Ojiva, K. (1968). Nutrient requeriments of suspensión cultures of soybean root cell. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158.

Geller, F., Schmidt, C., Göttert, M.; Fronzab, M., Schattel, V., Heinzmann, B., Werz, O., Flores, E., Merfort, I., Laufer, S. (2010). Identification of rosmarinic acid as the major active constituent in *Cordia Americana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 561-566.

Georgiev, M. I., Pavlov, A. I., y Bley, T. (2007). Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6), 1175-1185.

Grzegorzcyk-Karolak, I. (2020). Optimization of culture conditions and cultivation pasc for the growth of *Salvia viridis* transformed roots and polyphenolic compound production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(3), 571-581.

Grzegorzcyk-Karolak, I., Kuźma, Ł., Lisiecki, P., y Kiss, A. (2019). Accumulation of phenolic compounds in different in vitro cultures of *Salvia viridis* L. and their antioxidant and antimicrobial potential. *Phytochemistry Letters*, 30, 324-332.

Grzegorzcyk-Karolak, I., Kuźma, Ł., Skała, E., y Kiss, A. K. (2018). Hairy root cultures of *Salvia viridis* L. for production of polyphenolic compounds. *Industrial crops and products*, 117, 235-244.

Guinda, A., Rada, M., Delgado, T., Gutierrez-Adanez, P., y Castellano, J. M. (2010). Pentacyclic triterpenoids from olive fruit and leaf. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(17), 9685-9691.

Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Siordia-Reyes, A. G., Meckes-Fischer, M., y Jiménez-Arellanes, A. (2016). Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(7), 644-651.

Guzmán-Ávila, R., Flores-Morales, V., Paoli, P., Camici, G., Ramírez-Espinosa, J. J., Cerón-Romero, L., y Estrada-Soto, S. (2018). Ursolic acid derivatives as potential antidiabetic agents: In vitro, in vivo, and in silico studies. *Drug development research*, 79(2), 70-80.

Haas, C., Hengelhaupt, K. C., Kümmitz, S., Bley, T., Pavlov, A., y Steingroewer, J. (2014). *Salvia* suspension cultures as production systems for oleanolic and ursolic acid. *Acta physiologiae plantarum*, 36(8), 2137-2147.

Halder, M., Sarkar, S., y 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.

Hao G, Jiang X, Feng L, Tao R, Li Y, Huang L. (2016). Cloning, molecular characterization and functional analysis of a putative R2R3-MYB transcription factor of the phenolic acid biosynthetic pathway in *S. miltiorrhiza* Bge. f. *alba*. *Plant Cell Tiss Org Cult*; 124:151-168.

Hashemi, S. M., Naghavi, M. R. (2016). Production and gene expresión of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 125, 31-41. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2004.215.219>

- Hidalgo, D., Martínez-Márquez, A., Moyano, E., Bru-Martínez, R., Corchete, P., y Palazon, J. (2017). Bioconversion of stilbenes in genetically engineered root and cell cultures of tobacco. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Hristova, V. A., y Popova, L. P. (2002). Treatment with methyl jasmonate alleviates the effects of paraquat on photosynthesis in barley plants. *Photosynthetica*, 40(4), 567-574.
- Huang, T., Gao, W. Y., Wang, J., Cao, Y., Zhao, Y. X., Huang, L. Q., y Liu, C. X. (2010). Selection and optimization of a high-producing tissue culture of *Panax ginseng* CA Meyer. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), 765-772.
- Huang, L., Li, J., Ye, H., Li, C., Wang, H., Liu, B., y Zhang, Y. (2012). Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. *Planta*, 236(5), 1571-1581.
- Huang, P., Xia, L., Liu, W., Jiang, R., Liu, X., Tang, Q., y Zeng, J. (2018). Hairy root induction and benzyloisoquinoline alkaloid production in *Macleaya cordata*. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- Ilieva M, Pavlov A. (1999). Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture: nitrogen effect. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15:711–714
- Ismail, I., Gor, M. C., Mohamed-Hussein, Z. A., Zainal, Z., y Noor, N. M. (2011). Alteration of abiotic stress responsive genes in *Polygonum minus* roots by jasmonic acid elicitation. *Plants and Environment*, 3, 49-88.
- Jain, C., Khatana, S., y Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(2), 494-498.
- Jakovljević, D., Topuzović, M., y Stanković, M. (2019). Nutrient limitation as a tool for the induction of secondary metabolites with antioxidant activity in basil cultivars. *Industrial Crops and Products*, 138, 111462.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S., y Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 9, 26-38.
- Janicsák, G., Veres, K., Kakasy, A. Z., y Máthé, I. (2006). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical systematics and ecology*, 34(5), 392-396.
- Kanatt, S. R., Chander, R., y Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100(2), 451-458.

Kaur K., Pati P.K. (2018) Stress-Induced Metabolite Production Utilizing Plant Hairy Roots. In: Srivastava V., Mehrotra S., Mishra S. (eds) *Hairy Roots*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5_6.

Khwaza, V., Oyedele, O. O., y Aderibigbe, B. A. (2018). Antiviral activities of oleanolic acid and its analogues. *Molecules*, 23(9), 2300.

Kikowska M, Budzianowski J, Krawczyk A, Thiem B (2012) Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in in vitro cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiol Plant* 34:2425–243

Kikowska, M., Kowalczyk, M., Stochmal, A., y Thiem, B. (2019). Enhanced accumulation of triterpenoid saponins in in vitro plantlets and dedifferentiated cultures of *Eryngium planum* L.: a medicinal plant. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 60(1), 147- 154.

Kim, O.T., Kim, S.H., Ohyama, K. y Muranaka, T. (2010). Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl-diphosphate synthase. *Plant Cell Reports*, 29: 403–411.

Kim YB, Kim JK, Uddin MR, Xu H, Park WT, Tuan PA, Li X, Chung E, Lee J, Park SU. 2013. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. *PLOS ONE* 8(5):e64199 [DOI 10.1371/journal.pone.0064199](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064199).

Kintzios S, Makri O, Panagiotopoulos E, Scapeti M (2003) In vitro rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biotechnol Lett* 25:405–408

Kováčik, J., y Klejdus, B. (2014). Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. *Food chemistry*, 142, 334-341.

Kümmritz, S., Haas, C., Pavlov, A. I., Geib, D., Ulber, R., Bley, T., y Steingroewer, J. (2014). Determination of triterpenic acids and screening for valuable secondary metabolites in *Salvia* sp. suspension cultures. *Natural product communications*, 9(1), 1934578X1400900107.

Kümmritz, S., Louis, M., Haas, C., Oehmichen, F., Gantz, S., Delenk, H., y Steingroewer, J. (2016). Fungal elicitors combined with a sucrose feed significantly enhance triterpene production of a *Salvia fruticosa* cell suspension. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(16), 7071-7082.

Kuźma, Ł., Bruchajzer, E., y Wysokińska, H. (2009). Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6-7), 406-410.

Lambert, E., Faizal, A., y Geelen, D. (2011). Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164(2), 220-237.

- Laszczyk, M. N. (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta medica*, 75(15), 1549-1560.
- Lee, S. Y., Xu, H., Kim, Y. K., y Park, S. U. (2008). Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 969-972.
- Li, J., Li, B., Luo, L., Cao, F., Yang, B., Gao, J., Yan, Y., Zhang, G., Peng, L., y Hu, B. (2020). Increased phenolic acid and tanshinone production and transcriptional responses of biosynthetic genes in hairy root cultures of *Salvia przewalskii* Maxim. treated with methyl jasmonate and salicylic acid. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 8565-8578.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., y Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89.
- Li, B., Wang, B., Li, H., Peng, L., Ru, M., Liang, Z., y Zhu, Y. (2016). Establishment of *Salvia castanea* Diels f. *tomentosa* Stib. hairy root cultures and the promotion of tanshinone accumulation and gene expression with Ag⁺, methyl jasmonate, and yeast extract elicitation. *Protoplasma*, 253(1), 87-100.
- Liang ZS, Yang DF, Liang X, Zhang YJ, Liu Y, Liu FH (2012) Roles of reactive oxygen species in methyl jasmonate and nitric oxide-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell Reports* 31, 873–883. doi:10.1007/s00299-011-1208-6
- Lin Y, Yan Y. (2012). Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microb Cell Fact*; 11:42.
- Liu, L., Yang, D., Liang, T., Zhang, H., He, Z., y Liang, Z. (2016). Phosphate starvation promoted the accumulation of phenolic acids by inducing the key enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant cell reports*, 35(9), 1933-1942.
- Liu, L., Yang, D., Xing, B., Zhang, H., y Liang, Z. (2018). *Salvia castanea* hairy roots are more tolerant to phosphate deficiency than *Salvia miltiorrhiza* hairy roots based on the secondary metabolism and antioxidant defenses. *Molecules*, 23(5), 1132.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6(3):280–287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)
- Lourenço, P. M., de Castro, S., Martins, T. M., Clemente, A., y Domingos, A. (2002). Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme and microbial technology*, 31(3), 242-249.

- Lu, X., Hao, L., Wang, F., Huang, C., y Wu, S. (2013). Molecular cloning and overexpression of the tyrosine aminotransferase (TAT) gene leads to increased rosmarinic acid yield in *Perilla frutescens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115(1), 69-83.
- M.N. Laszczyk, Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy, *Planta Med.* 75 (2009) 1549–1560.
- Ma, Z.Q., Zhang, S.S., (2010). Light intensity affects growth, photosynthetic capability, and total flavonoid accumulation of *Anoectochilus* plants. *HortScience* 45, 863–867.
- Majumdar, S., Garai, S., y Jha, S. (2011). Genetic transformation of *Bacopa monnieri* by wild type strains of *Agrobacterium rhizogenes* stimulates production of bacopa saponins in transformed calli and plants. *Plant cell reports*, 30(5), 941-954.
- Mallol A, Cusidó RM, Palazón J, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. 2001. Ginsenoside production in different phenotypes of *Panax ginseng* transformed roots. *Phytochemistry* 57:365–371
- Manuhara, Y. S. W., Kristanti, A. N., Utami, E. S. W., y Yachya, A. (2015). Effect of sucrose and potassium nitrate on biomass and saponin content of *Talinum paniculatum* Gaertn. hairy root in balloon-type bubble bioreactor. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(12), 1027-1032.
- Mathur, A., Gangwar, A., Mathur, A. K., Verma, P., Uniyal, G. C., y Lal, R. K. (2010). Growth kinetics and ginsenosides production in transformed hairy roots of American ginseng—*Panax quinquefolium* L. *Biotechnology letters*, 32(3), 457-461.
- Mauro, M. L., Costantino, P., y Bettini, P. P. (2017). The never ending story of rol genes: a century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(2), 201-212.
- Mehrotra S, Goel MK, Srivastava V, Rahman LU (2015a) Hairy root biotechnology of *Rauwolfia serpentina*: a potent approach for the production of pharmaceutically important terpenoid indole alkaloids. *Biotechnol Lett* 37(2):253–263
- Misra, R. C., Maiti, P., Chanotiya, C. S., Shanker, K., y Ghosh, S. (2014). Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in sweet basil. *Plant Physiology*, 164(2), 1028-1044.
- Misra, R. C., Sharma, S., Garg, A., Chanotiya, C. S., y Ghosh, S. (2017). Two CYP716A subfamily cytochrome P450 monooxygenases of sweet basil play similar but nonredundant roles in ursane- and oleanane-type pentacyclic triterpene biosynthesis. *New Phytologist*, 214(2), 706-720.
- Mishra, M. R., Srivastava, R. K., y Akhtar, N. (2019). Abiotic stresses of salinity and water to enhance alkaloids production in cell suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology*, 9(1), 7-14.

- Mizukami, H., Tabira, Y., y Ellis, B. E. (1993). Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 12(12), 706-709.
- Modarres, M., Bahabadi, S. E., y Yazdi, M. E. T. (2018). Enhanced production of phenolic acids in cell suspension culture of *Salvia leriifolia* Benth. using growth regulators and sucrose. *Cytotechnology*, 70(2), 741-750.
- Moghadam, Y. A., Piri, K., Bahramnejad, B., Ghiasvand, T. (2014). Dopamine production in hairy root cultures of *Portulaca oleracea* (Purslane) using *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Agr. Sci. Tech.* 16, 409-420.
- Monroy-Ortíz C., Castillo-España P. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el Estado de Morelos. CONABIO. Pp.158.
- Moreno Hernández Yolotl. (2015). Generación de raíces pilosas de *Lepechinia caulescens* mediante el uso de *Agrobacterium rhizogenes* para la producción de ácido ursólico y oleanólico. Tesis de Maestría. Cuernavaca, Mor. México
- Moyano E, Fornale S, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry* 52:1287–1292
- Murthy HN, Lee EJ, Paek KY (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118:1–16
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol.* 15: 473-479.
- Murthy HN, Chung IM (2013) Establishment of *Gymnema sylvestre* hairy root cultures for the production of gymnemic acid. *Acta Physiol Plant* 35 (10):3067–3073
- Nagella, P., y Murthy, H. N. (2011). Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(1), 119-124.
- Nagella, P., Thiruvengadam, M., Jung, S. J., Murthy, H. N., y Chung, I. M. (2013). Establishment of *Gymnema sylvestre* hairy root cultures for the production of gymnemic acid. *Acta physiologiae plantarum*, 35(10), 3067-3073.
- Naik, P. M., y Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors–role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. *Abiotic and biotic stress in plants-recent advances and future perspectives*, 247-277.

- Narayani, M., y Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry reviews*, 16(6), 1227-1252.
- Nourozi, E., Hosseini, B., y Hassani, A. (2014). A reliable and efficient protocol for induction of hairy roots in *Agastache foeniculum*. *Biologia*, 69(7), 870-879.
- Pandey H, Pandey P, Singh S, Gupta R, Banerjee S (2015) Production of anti-cancer triterpene (betulinic acid) from callus cultures of different *Ocimum* species and its elicitation. *Protoplasma* 252:647–655
- Pandey, P., Singh, S., y Banerjee, S. (2019). *Ocimum basilicum* suspension culture as resource for bioactive triterpenoids: yield enrichment by elicitation and bioreactor cultivation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(1), 65-75.
- Pant, B. D., Pant, P., Erban, A., Huhman, D., Kopka, J., y SCHEIBLE, W. R. (2015). Identification of primary and secondary metabolites with phosphorus status-dependent abundance in *A. rabidopsis*, and of the transcription factor PHR 1 as a major regulator of metabolic changes during phosphorus limitation. *Plant, cell y environment*, 38(1), 172-187.
- Park MR, Baek SH, Benildo G, de Los Reyes BG, Yun SJ, Hasenstein KH (2012) Transcriptome profiling characterizes phosphate deficiency effects on carbohydrate metabolism in rice leaves. *J Plant Physiol* 169:193–205
- Park, W. T., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Yeo, S. K., Jeon, J., Park, J. S., y Park, S. U. (2016). Yeast extract and silver nitrate induce the expression of phenylpropanoid biosynthetic genes and induce the accumulation of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* cell culture. *Molecules*, 21(4), 426.
- Patra, B., Schluttenhofer, C., Wu, Y.M., Pattanaik, S., Ling, Y., (2013). Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. *BBA Gene Regul. Mech.* 1829 (11), 1236-1247
- Pavlov, A., y Bley, T. (Eds.). (2018). *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems*. Cham: Springer.
- Pavlov, A., Georgiev, V., y Ilieva, M. (2005). Betalain biosynthesis by red beet (*Beta vulgaris* L.) hairy root culture. *Process Biochemistry*, 40(5), 1531-1533.
- Peret B, Clement M, Nussaume L, Desnos T (2011) Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci* 16:1360–1385
- Pérez-Hernández, J., Martínez-Trujillo, A., y Nicasio-Torres, P. (2019). Optimization of active compounds production by interaction between nitrate and copper in *Sphaeralcea angustifolia* cell suspension using Response Surface Methodology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136(2), 407-413.

- Pérez-Hernández N., Ponce-Monter H., Medina J. A., Joseph-Nathan P. (2008). Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 115. pp. 30-35
- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 207-227.
- Petersen, M. y Simmonds, M.S.J. (2003). Rosmarinic acid, *Phytochemistry* 62 (2) 121-125.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., y Wolters, S. (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1663-1679.
- Pilaisangsuee, V., Somboon, T., Tonglairoum, P., Keawracha, P., Wongsu, T., Kongbangkerd, A., y Limmongkon, A. (2018). Enhancement of stilbene compounds and anti-inflammatory activity of methyl jasmonate and cyclodextrin elicited peanut hairy root culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(1), 165-179.
- Praveen N, Murthy HN (2013) Withanolide A production from *Withania somnifera* hairy root cultures with improved growth by altering the concentrations of macro elements and nitrogen source in the medium. *Acta Physiol Plant* 35:811–816
- Praveen, N., y Murthy, H. N. (2012). Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 241-243.
- Praveen N, Murthy HN, Chung IM (2011) Improvement of growth and gymnemic acid production by altering the macro elements concentration and nitrogen source supply in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. *Ind Crops Prod* 33:282–286
- Rajashekar T, Rajendran I, Ravishankar GA, Venkataraman LV (1991) Influence of nutrient stress on pyrethrin production in cultured cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Curr Sci* 60:705–707
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., y 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.
- Rawat, J. M., Bhandari, A., Raturi, M., y Rawat, B. (2019). Agrobacterium rhizogenes Mediated Hairy Root Cultures: A Promising Approach for Production of Useful Metabolites. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 103-118). Elsevier.

Reis, A., Boutet-Mercey, S., Massot, S., Ratet, P., y Zuanazzi, J. A. S. (2019). Isoflavone production in hairy root cultures and plantlets of *Trifolium pratense*. *Biotechnology letters*, 41(3), 427-442.

Rzedowski J, Rzedowski GC. (1987). Flora fanerogámica del valle de México. Esc.Nal. Ciencias Biológicas IPN. Instituto de Ecología. México. vol 11, p. 296

Rzedowski, G.C., Rzedowski, J. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. México, pp. 630

Rozita O, Abdullah MA, Hasan MA, Marziah M, Siti MMK (2005) Optimization and elucidation of interactions between ammonium, nitrate and phosphate in *Centella asiática* cell culture using response surface methodology. *Biotechnol Bioprocess Eng* 10:192–197.

Ru, M., Wang, K., Bai, Z., Peng, L., He, S., Pei, T., ... y Liang, Z. (2017). Molecular cloning and characterisation of two enzymes involved in the rosmarinic acid biosynthesis pathway of *Prunella vulgaris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(2), 381-390.

Ruffoni, B., Bertoli, A., Pistelli, L., y Pistelli, L. (2016). Micropropagation of *Salvia wagneriana* Polak and hairy root cultures with rosmarinic acid production. *Natural producto research*, 30(22), 2538-2544.

Rychter AM, Randall DD (1994) The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiol Plant* 91:383–388

Salmanzadeh, M., Sabet, M. S., Moieni, A., y Homaei, M. (2020). Heterologous expression of an acid phosphatase gene and phosphate limitation leads to substantial production of chicoric acid in *Echinacea purpurea* transgenic hairy roots. *Planta*, 251(1), 1-14.

Senthil, S., Sridevi, M., y Pugalendi, K. V. (2007). Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Toxicologic pathology*, 35(3), 418-423.

Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., y Do Choi, Y. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4788-4793.

Setamam, N. M., Sidik, N. J., Rahman, Z. A., y Zain, C. R. C. M. (2014). Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum* species explants. *BMC research notes*, 7(1), 414.

Shanmugam, M. K., Dai, X., Kumar, A. P., Tan, B. K., Sethi, G., y Bishayee, A. (2014). Oleanolic acid and its synthetic derivatives for the prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical evidence. *Cancer letters*, 346(2), 206-216.

Sharan, S., Sarin, N. B., y Mukhopadhyay, K. (2019). Elicitor-mediated enhanced accumulation of ursolic acid and eugenol in hairy root cultures of *Ocimum tenuiflorum* L. is age, dose, and duration dependent. *South African Journal of Botany*, 124, 199-210.

Sivanandhan G, Kapil Dev G, Jeyaraj M et al (2013) Increased production of withanolide A, withanone, and withaferin A in hairy root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal elicited with methyl jasmonate and salicylic acid. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 114:121–129. doi:10.1007/s11240-013-0297-z

Sivanesan I, Murugesan K (2008) An efficient regeneration from nodal explants of *Withania somnifera* Dunal. *Asian J Plant Sci* 7:551–556

Srivastava, S., y Srivastava, A. K. (2012). Azadirachtin production by hairy root cultivation of *Azadirachta indica* in a modified stirred tank reactor. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(9), 1549-1553.

Srivastava, S., y Srivastava, A. K. (2012). Statistical medium optimization for enhanced azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *In Vitro Cellular y Developmental Biology-Plant*, 48(1), 73-84.

Sumaryono, W., Proksch, P., Wray, V., Witte, L., y Hartmann, T. (1991). Qualitative and quantitative analysis of the phenolic constituents from *Orthosiphon aristatus*. *Planta medica*, 57(02), 176-180.

Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Kokoszka, A., and Furmanowa, M. (2009). Enhancement of taxane production in hairy root culture of *Taxus x media* var. *Hicksii*. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1950–1954.

Tabar, R. S., Moieni, A., y Monfared, S. R. (2019). Improving biomass and chicoric acid content in hairy roots of *Echinacea purpurea* L. *Biologia*, 74(8), 941-951.

Takahashi I, Hara M (2014) Enhancement of starch accumulation in plants by exogenously applied methyl jasmonate. *Plant Biotechnology Reports* 8, 143–149. doi:10.1007/s11816-013-0304-1

Taylor AR, Bloom AJ (1998) Ammonium, nitrate and proton fluxes along the maize root. *Plant Cell Environ* 21:1255–1263

Thiruvengadam M, Praveen N, John KM, Yang YS, Kim SH, Chung IM (2014) Establishment of *Momordica charantia* hairy root cultures for the production of phenolic compounds and determination of their biological activities. *Plant Cell Tiss Org Cult* 118:545–557

Trócsányi, E., György, Z., y Zámboriné-Németh, É. (2020). New insights into rosmarinic acid biosynthesis based on molecular studies. *Current Plant Biology*, 100162.

Vasanthaiah, H., y Kambiranda, D. (Eds.). (2011). *Plants and environment*. BoD–Books on Demand.

Vasconsuelo A, Boland R (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Sci* 172:861–875. doi:10.1016/j.plantsci.2007.01.006

Velu, G., Palanichamy, V., y Rajan, A. P. (2018). Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. In *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview* (pp. 135-156). Springer, Cham.

Vetal, M. D., Lade, V. G., y Rathod, V. K. (2012). Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* leaves: Kinetics and modeling. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 793-798.

Vergara MV, Estrada-Soto SE, Arellano-García J, Rivera-Leyva JC, Castillo-España P, Flores AF, Perea-Arango I. 2017. Methyl jasmonate and salicylic acid enhanced the production of ursolic and oleanolic acid in callus cultures of *Lepechinia caulescens*. *Pharmacognosy Magazine* 13(Suppl 4):S886_S889.

Wang, C. T., Liu, H., Gao, X. S., y Zhang, H. X. (2010). Overexpression of G10H and ORCA3 in the hairy roots of *Catharanthus roseus* improves catharanthine production. *Plant cell reports*, 29(8), 887-894.

Weremczuk-Jeżyna, I., Skała, E., Olszewska, M. A., Kiss, A. K., Balcerczak, E., Wysokińska, H., y Kicel, A. (2016). The identification and quantitative determination of rosmarinic acid and salvianolic acid B in hairy root cultures of *Dracocephalum forrestii* WW Smith. *Industrial Crops and Products*, 91, 125-131.

Wink, M. (2010). Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. *Annual plant reviews volume 40: Biochemistry of plant secondary metabolism*, 1-19.

Wu J, Zhong JJ (1999) Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects. *J Biotechnol* 68:89–99. doi:10.1016/S0168-1656(98)00195-3

Xiao Y, Gao S, Di P, Chen J, Chen W, Zhang L (2009) Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Physiol Plant* 137:1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01257.x>

Xing, B., Yang, D., Liu, L., Han, R., Sun, Y., y Liang, Z. (2018). Phenolic acid production is more effectively enhanced than tanshinone production by methyl jasmonate in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(1), 119-129.

- Xu, H., Kim, Y. K., Jin, X., Lee, S. Y., y Park, S. U. (2008). Rosmarinic acid biosynthesis in callus and cell cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2(9), 237-241.
- Yan Qm, Shi M, Ng J, Wu JY (2006) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci* **170**: 853–858
- Yendo, A. C., de Costa, F., Gosmann, G., y Fett-Neto, A. G. (2010). Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. *Molecular biotechnology*, 46(1), 94-104.
- Y.B. Kim, J.K. Kim, M.R. Uddin, H. Xu, W.T. Park, P.A. Tuan, X. Li, E. Chung, J.H. Lee, S.U. Park, Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate, PLoS One 8 (5) (2013) 64199.
- Yousefian, S., Lohrasebi, T., Farhadpour, M., y Haghbeen, K. (2020). Effect of methyl jasmonate on phenolic acids accumulation and the expression profile of their biosynthesis-related genes in *Mentha spicata* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142, 285-297.
- Yousefian, Z., Golkar, P., y Mirjalili, M. H. (2020). Production Enhancement of Medicinally Active Coumarin and Phenolic Compounds in Hairy Root Cultures of *Pelargonium sidoides*: The Effect of Elicitation and Sucrose. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-14.
- Yu H, Liu X, Gao S et al (2014) Molecular cloning and functional characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 117(2):265–277
- Yu, X., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, X., Lang, D., y Zhang, X. (2019). The roles of methyl jasmonate to stress in plants. *Functional Plant Biology*, 46(3), 197-212.
- Zhang, Y. H., y Zhong, J. J. (1997). Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme and microbial technology*, 21(1), 59-63.
- Zhao, J., Davis, L. C., y Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.
- Z. Zhou, H. Tan, Q. Li, J. Chen, S. Gao, Y. Wang, W. Chen, L. Zhang, CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of RAS in *Salvia miltiorrhiza*, *Phytochemistry* 148 (2018) 63–70.
- Zerin, T., Lee, M., Jang, W. S., Nam, K. W., y Song, H. Y. (2016). Anti-inflammatory potential of ursolic acid in *Mycobacterium tuberculosis*-sensitized and Concanavalin A-stimulated cells. *Molecular medicine reports*, 13(3), 2736-2744.

Zhang J, Gao WY, Wang J, Li XL, Xiao PG (2011) Improvement of growth and periplocin yield of *Periploca sepium* adventitious root cultures by altering nitrogen source supply. *Chin Herb Med* 3:226–231

Zhang S, Yan Y, Wang B et al (2014) Selective responses of enzymes in the two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *J Biosci Bioeng* 117(5):645–651

Zhang, B., Chen, M., Pu, S., Chen, L., Zhang, X., Zhang, J., y Zhu, C. (2020). Identification of secondary metabolites in *Tripterygium wilfordii* hairy roots and culture optimization for enhancing wilforine and wilforine production. *Industrial Crops and products*, 148, 112276.

Zhong, J. J., y Wang, S. J. (1998). Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process biochemistry*, 33(6), 671-675.

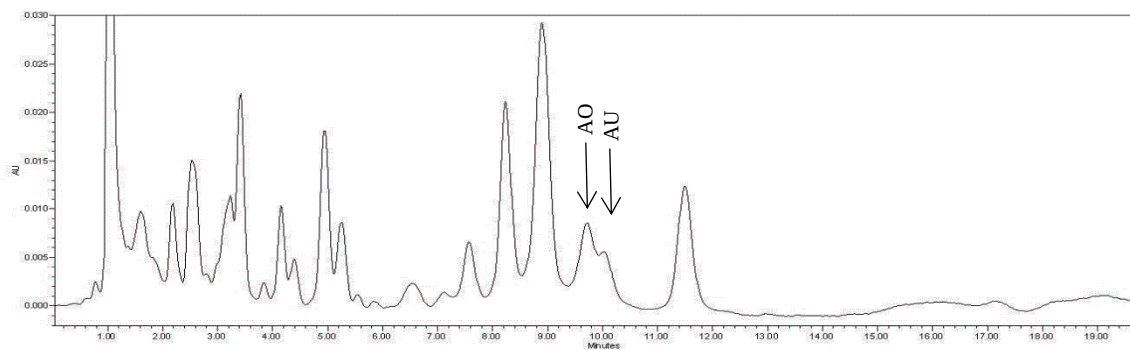
Zhou, Z., Tan, H., Li, Q., Chen, J., Gao, S., Wang, Y., ... y Zhang, L. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis of RAS in *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 148, 63-70.

Zhu, Z., y Tian, S. (2012). Resistant responses of tomato fruit treated with exogenous methyl jasmonate to *Botrytis cinerea* infection. *Scientia Horticulturae*, 142, 38-43.

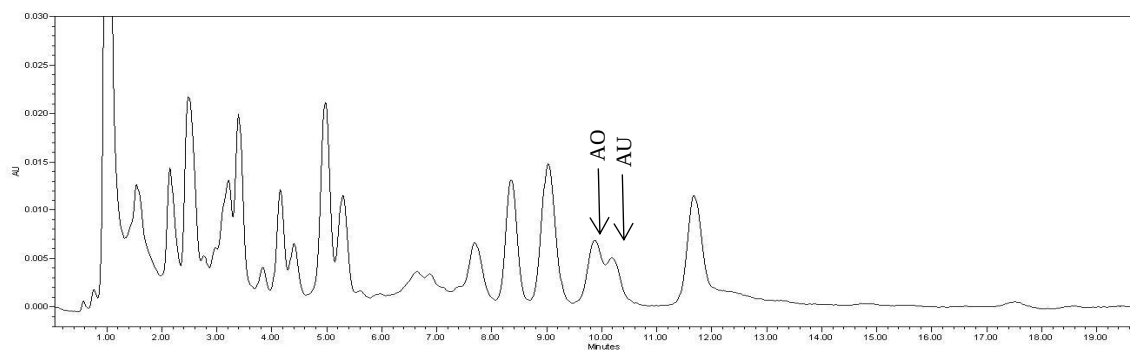
Zhu, C., Miao, G., Guo, J., Huo, Y. 2014. Establishment of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. hairy root culture and optimization of its culture conditions for the production of triptolide and wilforine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 823-834.

XIII. ANEXO 1

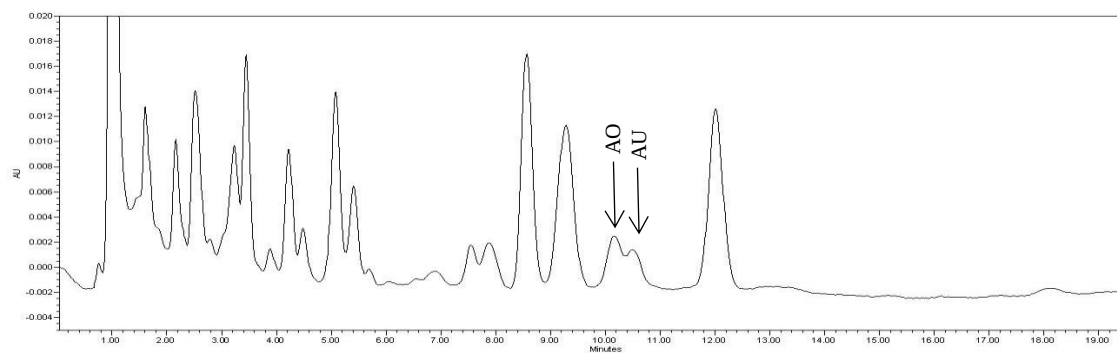
Cromatogramas de extractos diclorometánicos de las diferentes líneas de raíces transformadas. a) Línea 2, b) Línea 3, c) Línea 4, d) Línea 6, e) Línea 7, f) Línea 8, g) Línea 9, h) Línea 10, i) Línea 11, j) Línea 12, k) Línea 13, l) Línea 14, m) Línea 15.



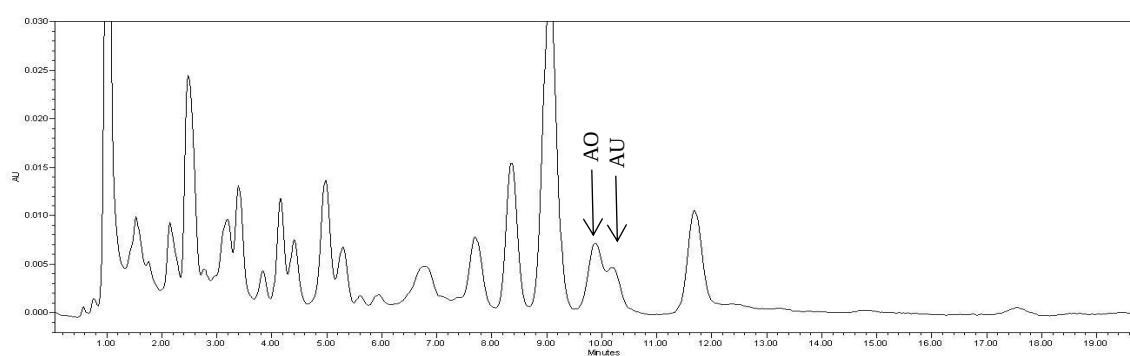
a



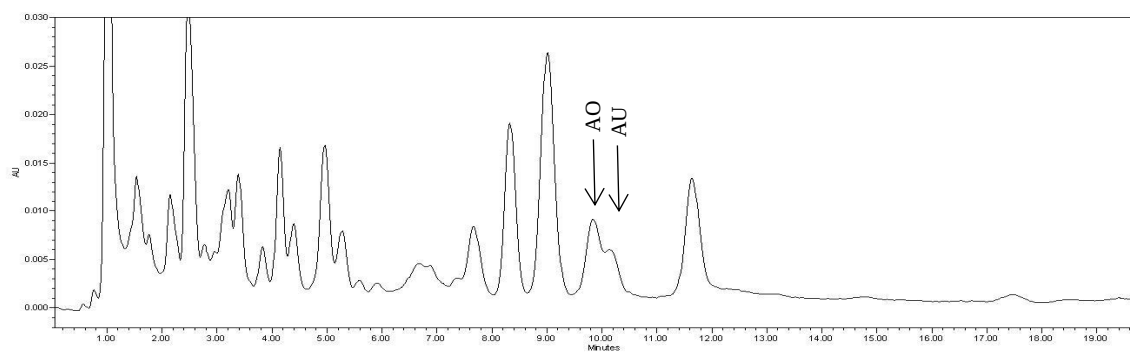
b



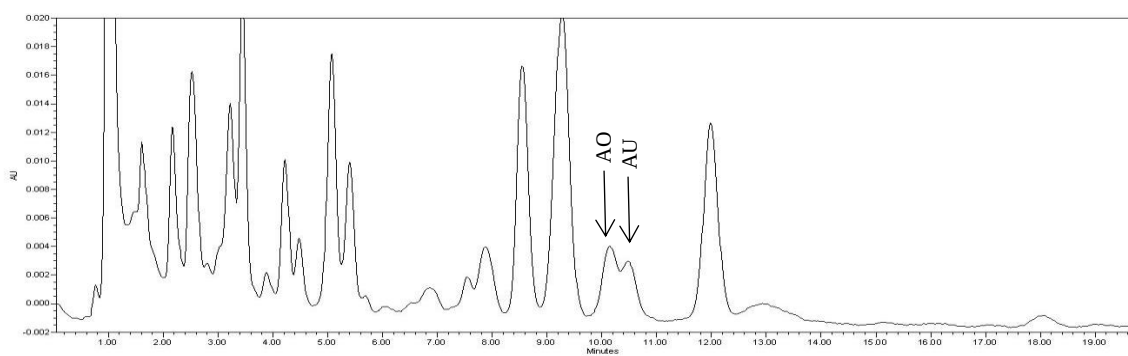
c



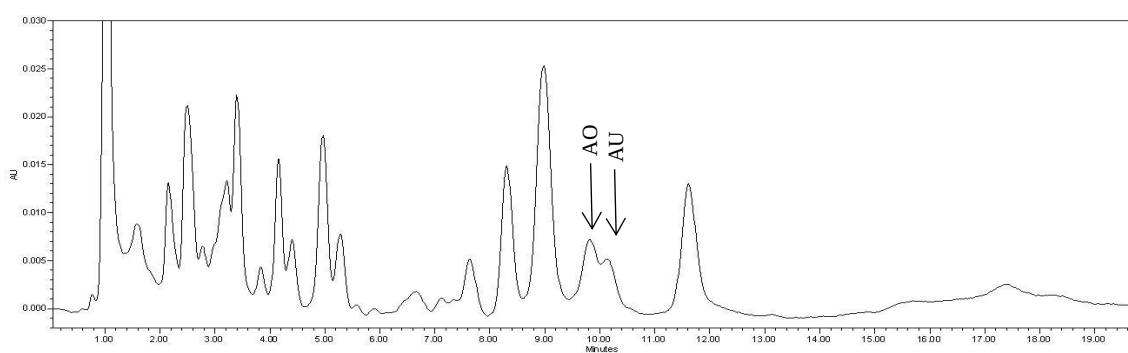
d



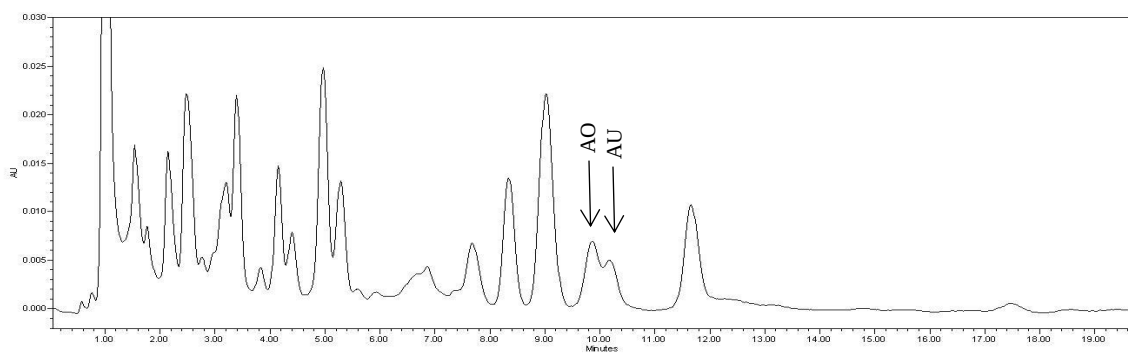
e



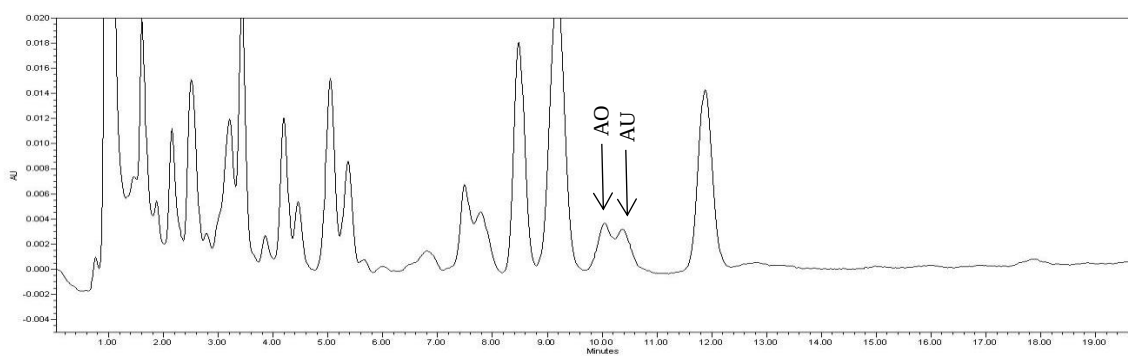
f



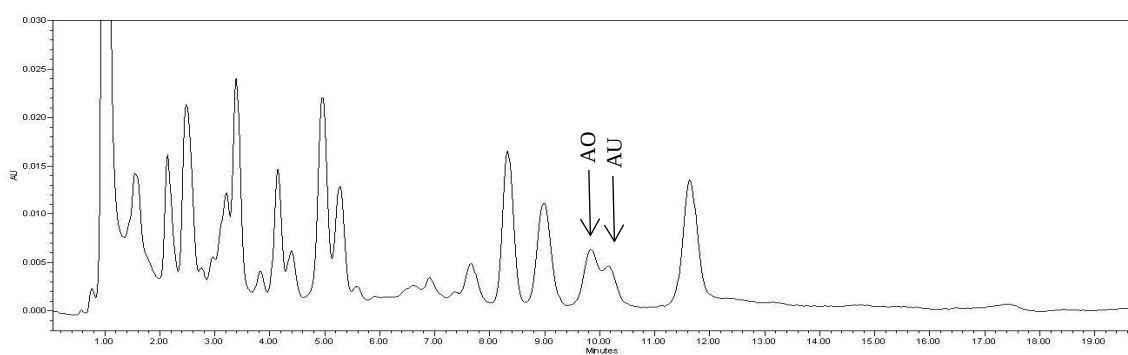
g



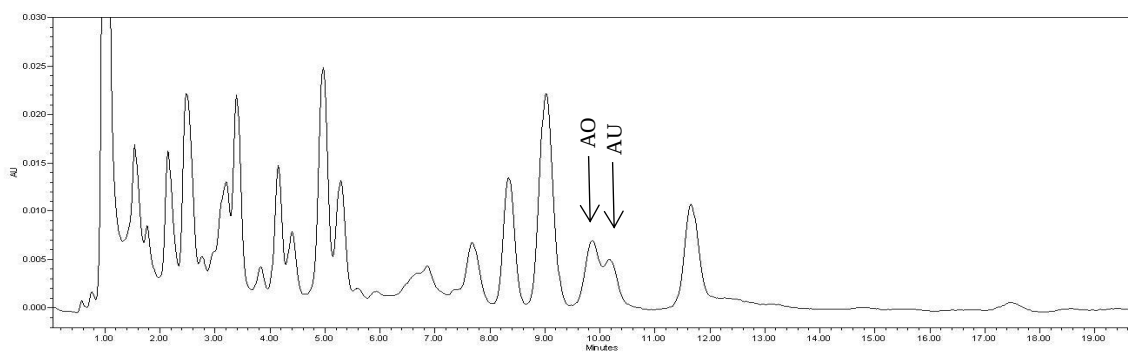
h



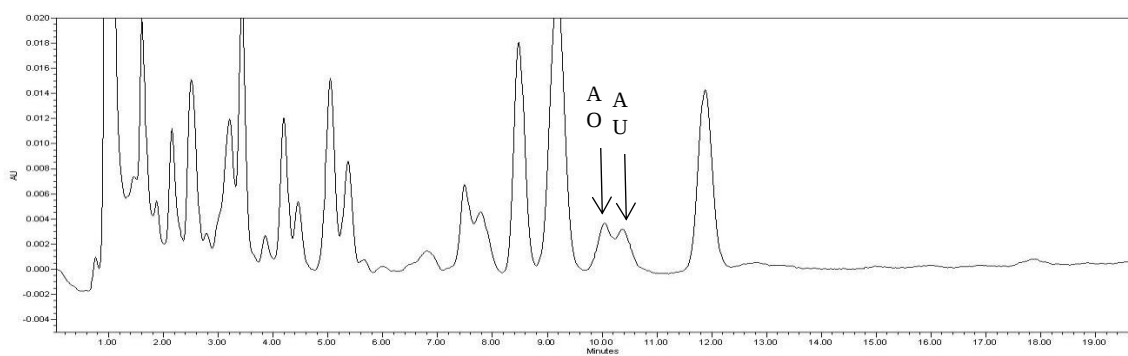
i



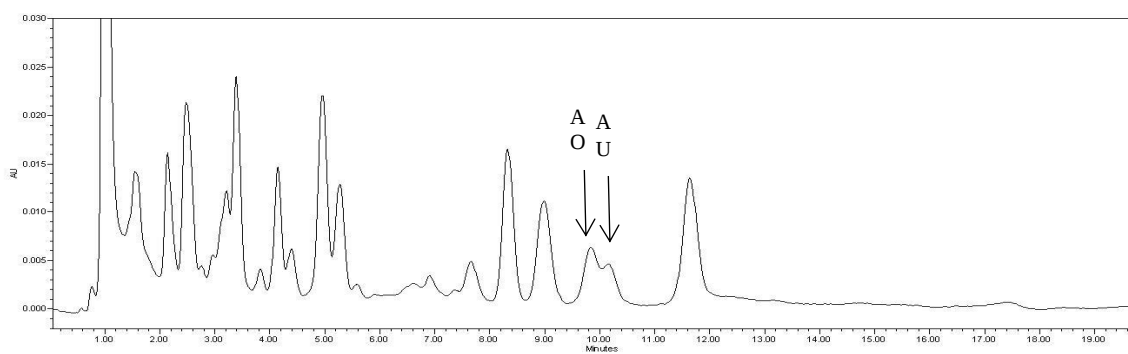
j



k



l



m



Methyl jasmonate enhances ursolic, oleanolic and rosmarinic acid production and sucrose induced biomass accumulation, in hairy roots of *Lepechinia caulescens*

Victor M. Vergara-Martínez^{1,*}, Samuel E. Estrada-Soto², Susana Valencia-Díaz¹, Karlina García-Sosa³, Luis Manuel Peña-Rodríguez³, José de Jesús Arellano-García¹ and Irene Perea-Arango^{1,*}

¹Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

²Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

³Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, Mexico

*These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Background. Ursolic (UA), oleanolic (OA) and rosmarinic (RA) acids are bioactive metabolites found in *Lepechinia caulescens* that have generated interest for their health benefits, which include antimicrobial, antioxidant, antimutagenic, gastroprotective, antidiabetic, antihypertensive and anti-inflammatory properties, among others. To date, very few attempts have been made to evaluate the potential for simultaneous production of these bioactive compounds, using a biotechnological approach. Hairy root cultures offer a biotechnology approach that can be used to study the factors affecting the biosynthesis and the production of UA, OA and RA. In the current study, we established hairy root cultures of *L. caulescens* and evaluated the effect of sucrose on biomass accumulation, and the effect of different concentrations and times of exposure of methyl jasmonate (MeJA), on the accumulation of UA, OA and RA.

Methods. Leaves from plants of *L. caulescens* were inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834. PCR of *rolB* gene confirmed the transgenic nature of hairy roots. Hairy roots were subcultured in semisolid MSB5 medium, supplemented with 15, 30, 45 or 60 g/L sucrose and after 4 weeks, dry weight was determined. The accumulation of UA, OA and RA of wild plants and hairy roots were determined by HPLC. Finally, the hairy roots were treated with 0, 100, 200 and 300 μ M of MeJA and the content of bioactive compounds was analyzed, after 24, 48 and 72 h.

Results. High frequency transformation (75%) was achieved, using leaf explants from axenic seedlings, infected with *A. rhizogenes*. The hairy roots showed an enhanced linear biomass accumulation, in response to the increase in sucrose concentration. The hairy root cultures in MSB5 medium, supplemented with 45 g/L sucrose, were capable to synthesizing UA (0.29 ± 0.00 mg/g DW), OA ($0.57 \pm$

Submitted 20 November 2020
Accepted 24 March 2021 Published
27 April 2021

Corresponding author
Irene Perea-Arango,
iperea@uaem.mx

Academic editor Paolo
Costantino

Additional Information and
Declarations can be found on page
12

DOI 10.7717/peerj.11279

Copyright
2021 Vergara-Martínez et al.

Distributed under

0.00 mg/g DW) and RA (41.6 ± 0.31 mg/g DW), about two, seven and three times more, respectively, than in roots from wild plants. Elicitation time and concentration of MeJA resulted in significant enhancement in the production of UA, OA and RA, with treatments elicited for 24 h, with a concentration of greatest accumulation.

Conclusion. This is the first report on development of hairy root cultures of *L. caulescens*. Future studies should aim towards further improving triterpenes and polyphenolic compound production in hairy roots of *L. caulescens*, for use in the pharmaceutical and biotechnological industry.

Keywords Hairy roots, *Lepechinia caulescens*, Ursolic acid, Oleanolic acid, Rosmarinic acid, Elicitation, Methyl jasmonate, Sucrose, *Agrobacterium rhizogenes*

Subjects Biotechnology, Molecular Biology, Plant Science

INTRODUCTION

The triterpenoids ursolic acid (UA) and oleanolic acid (OA), together with rosmarinic acid (RA), an ester of caffeic acid, are secondary metabolites that have gained considerable importance over the last few decades in the pharmaceutical, cosmetic, food and agrochemical industries, due to their wide range of biological activities which include antimicrobial, antioxidant, antimutagenic, gastroprotective, antidiabetic, antihypertensive and anti-inflammatory properties (Qiang et al., 2011; Estrada-Soto et al., 2012; Rios et al., 2012; Soica et al., 2014; Baranauskaite et al., 2016; Lu et al., 2018; Elufioye & Habtemariam, 2019; Giles-Rivas et al., 2020). These compounds commonly occur in stems, leaves and flowers of the Lamiaceae plant family (Woźniak, Skapska S, Marszałek, 2015). However, production levels in nature can be quite low, are often sporadic, and are highly dependent upon factors such as climate, soil, pests and developmental stage of the source plant (Lu, Tang & Li, 2016). Likewise, their chemical synthesis is complex and costly (Phillips et al.,

2006; Salvador et al., 2014). Thus, biotechnology options for the production of UA, OA and RA are very necessary. In a recent study, *Lepechinia caulescens* (Ortega) Epling (Lamiaceae), an herbaceous plant used in Mexican folk medicine has been proposed as an alternative source for the production of UA and OA. This plant has elevated triterpene contents (UA: 16.58 mg/g DW and OA: 1.94 mg/g DW), and its callus cultures also accumulate these bioactive compounds (Vergara et al., 2017). However, the culture of undifferentiated cells or calli often provokes problems such as somaclonal variation that can produce low yields of the metabolites of interest and result in genetic and biochemical instability (Srivastava, Gambhir & Sharma, 2013; Ochoa-Villarreal et al., 2016). In contrast, in some cases, hairy root cultures obtained by transformation mediated by *Agrobacterium rhizogenes*, have been shown to be a better option than undifferentiated cell cultures, for the production of bioactive metabolites (Habibi et al., 2016; Häkkinen et al., 2016). Hairy root culture is one of the

most efficient tools offered by plant biotechnology for producing secondary metabolites of important industrial interest, particularly pharmaceutical and cosmetic. One of the main advantages of using hairy root cultures is their stable and fast growth rate, without using growth regulators, as well as their genetic and biochemical stability ([Roychowdhury, Halder & Jha, 2017](#)). There are strategies that can be used for the hairy root culture system,

e.g., the use of elicitors or stressing agents, which can increase the production of secondary metabolites ([Alsoufi et al., 2019](#); [A, ckgöz, 2020](#)). The well known elicitor methyl jasmonate (MeJA) is a phytohormone that contributes to the hyperproduction of secondary plant metabolites, as it plays an essential role in the regulation of specific genes, involved in plant development and defense mechanisms against different biotic and abiotic stresses ([Ji et al., 2019](#); [Baek et al., 2020](#)). Although previous studies have examined the effects of MeJA on the production of UA, OA and RA in Lamiaceae family ([Ruffoni et al., 2016](#); [Li et al., 2020](#); [Yousefian et al., 2020](#)), few studies, with the exception of *Ocimum basilicum* suspension cultures ([Pandey, Singh & Banerjee, 2019](#)), have been designed to explore the feasibility of up-scaling the production of these three bioactive metabolites, using an in vitro culture system. Here, we describe the first protocol for the establishment of hairy root culture of *L. caulescens* and present a comparative analysis of the effects of different concentrations and times of exposure to MeJA on the production of UA, OA, and RA. Our results provide valuable guidance for further basic and applied research, aimed at increasing bioactive metabolites in members of the Lamiaceae family.

MATERIALS & METHODS

Induction and culture of hairy roots

Wild plants of *L. caulescens* were collected from Morelos State, Mexico. The plant was identified in the HUMO Herbarium, Autonomous University of Morelos, where a voucher specimen (32444) was deposited. Mature seeds were germinated and grown *in vitro* on MS medium, solidified with 3.0 g/L phytagel ([Vergara et al., 2017](#)). Hairy roots were induced on sterile 4-week-old leaves. Leaf explants consisted of a petiole and small portions of leaf blade. Prior to infection, the *Agrobacterium rhizogenes* strain ATCC 15834 (American Type Cultures Collection, Manassas, USA), harboring agropine-type plasmid pRi15834 was cultivated on liquid YM medium ([Hooykaas et al., 1977](#)) in an orbital shaker at 150 rpm in the dark at 28 °C, until the optical density at $\lambda = 600$ nm (OD₆₀₀) reached 0.5.

Twenty explants of each type were inoculated with *A. rhizogenes* by immersing them in bacterial suspension for 1 min, and then blotted on filter paper. Control explants were treated identically, using YM medium without bacteria. Thereafter, the infected explants and controls were placed for 24 h on MSB5 medium containing MS salts ([Murashige & Skoog, 1962](#)), B5 vitamins ([Gamborg, Miller & Ojima, 1968](#)), 0.1 g/L myo-inositol, 30 g/L sucrose and then solidified with 3.0 g/L phytagel. The medium was adjusted to pH 5.7, before being autoclaved at 121 °C for 25 min.

Following co-cultivation, the inoculated and control explants were washed with sterile water, blotted dry on sterile filter paper and placed on MSB5 medium, supplemented with

400 mg/L cefotaxime and 400 mg/L ceftriaxone, in order to eliminate bacteria. After four weeks in the dark at 25 °C, the roots formed by infected explants were cut off and transferred into Petri dishes containing 30 mL MSB5 media with no growth regulators and maintained in the dark. Each excised fast growing root was propagated as a separate clone or line. Transformation frequency was calculated as a percentage of the number of inoculated explants that formed roots, out of the total number of explants used for transformation. Root tips (~2 g fresh weight) were harvested from 4-week old hairy root cultures and subcultures were commenced at 4-week intervals, in the same media and in dark conditions.

DNA extraction and PCR analysis

Total DNA of *L. caulescens* hairy roots and seedlings were extracted using the ZR Plant/Seed DNA MicroPrep™ kit (Zymo Research), following manufacturer's instructions. The quality and quantity of DNA were analyzed using a Nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo scientific). Specific primers for *rolB* were used to detect PCR of transgenes in DNA extracts from roots, present in the T-DNA region of pRi15834 from *A. rhizogenes*. The primer pair for amplifying the *rolB* region was 5'ATGGATCCCAAATTGCTATCCCCACGA3' and 3'TTAGGCTTCTTCATTCGGTTTACTGCAGC5' (Ashraf et al., 2015). These yields amplified products of 776 bp. Further hairy root lines were tested for the absence of *A. rhizogenes* contamination, using the primer set; forward primer

5'ATGCCGATCGAGCTCAAGT3' and reverse primer 3'CCTGACCCAAACATCTCGGCTG

CCA5', which amplified a specific sequence (338 bp) of *virD2* gene, located outside the T-DNA (Haas et al., 1995). The genomic DNA from normal roots obtained from *in vitro* seedlings and DNA of bacteria were used as controls. The PCR mix for each amplification contained Taq Buffer 10X (Vivantis, USA) 2.5 µL, MgCl₂ (25 mM) 1.6 µL, dTNPs (2 mM) 2 µL, primers 3 µL, Taq polymerase 0.5 µL (Vivantis, USA) 9.4 µL ultrapure water and 1 µL DNA (50 ng/ µL) template, at a final volume of 25 µL. Conditions for cycles consisted of an initial denaturation at 94 °C for 5 min; followed by 42 cycles of 1 min denaturation at 94 °C, annealing at 52.5 °C for 1.5 min, and extension at 72 °C for 2 min. A final extension cycle of 10 min at 72 °C, completed the PCR. PCR products were resolved by electrophoresis, using 0.8% (w/v) agarose gels in TAE buffer (0.5 M EDTA, 80 mM Tris acetate at pH 8.0), stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and observed under UV light.

Effect of sucrose concentration on biomass accumulation

One-month old hairy roots (~2 g fresh weight) of L1 and L5 were inoculated into 250 mL jars, containing 20 mL modified MSB5 medium, supplemented with 15, 30, 45 or 60 g/L sucrose. All other components of MSB5 medium remained unchanged. The hairy roots were incubated in darkness at 25 °C for 4 weeks. Subsequently, roots were dried to a constant weight, in an oven set at 30 °C, to determine dry weight (DW). Each treatment consisted of six replicates. Biomass data were analyzed by linear regressions using STATISTICA 7 software; possibility of significance ($P < 0.05$). The coefficient of determination (R^2) was calculated to establish the strength of linear association between the values.

Extraction and quantification of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids

Powdered samples of plant material were extracted by successive maceration at room temperature with hexane, dichloromethane and methanol, every 72 h on three occasions respectively, at a ratio of 1:10 (w/v). Extracts were filtered using filter paper and then air dried in a fume hood.

Separation of UA, OA and RA was achieved, using an analytical high performance liquid chromatography system (Waters HPLC System) and the Waters XBridge™ C18 column (4.6 mm $\text{\AA}$ ~75 mm). The triterpenes from dichloromethane extracts were separated by applying a mobile phase of methanol: acidic water (H_3PO_4) 83:17 (v/v), at a flow rate

of 0.9 mL/min. Separation of RA present in the methanolic extracts was performed by elution, using a linear gradient of solvents A (acetonitrile) and B (0.01% phosphoric acid solution). The gradient was as follows: 5 min 90:10% A:B, 20 min 74:26% A:B and 10 min 90:10% A:B. Elution was performed at a solvent flow rate of one mL/min. Waters 996 photodiode array detector system was used for both triterpene (250 nm) and RA (230 nm) detection. Calibration curves were plotted at six concentrations for each of the standard solutions in methanol, in order to undertake a linear regression analysis of the peak area for each concentration. The corresponding retention time (Rt) and ultraviolet spectrum of the standard and the sample, confirmed the presence of UA (Rt 10.67 min), OA (Rt 10.36 min), and RA (Rt 14.10 min) ([Shekarchi et al., 2012](#); [Vergara et al., 2017](#)). Hairy root extracts were spiked with the corresponding standard to confirm identification of UA, OA and RA. Standard references were obtained from Sigma-Aldrich (purity: ≥ 97). All solvents were HPLC grade. Mean values were obtained from three replicates of a pooled sample. Results are presented in milligrams (mg) per gram (g) of DW. All data were analyzed by one-way ANOVA, using STATISTICA 7 software. Significance between means was tested by Tukey's test ($P < 0.05$).

Elicitation experiments

Two grams of hairy roots were inoculated into 20 mL MSB5 medium supplemented with 45 g/L in 250 mL jars and maintained in the dark at 25 °C. After 15 days of incubation (exponential phase), MeJA was added individually to each semisolid media to reach a final concentration of 0, 100, 200 and 300 μM . Effects of elicitation on the production of UA, OA and RA in hairy roots were measured after 24, 48 and 72 h grown in these media. The stock solutions of MeJA (95%, Sigma-Aldrich) were prepared by dissolving in 1:99 ethanol:water (v:v) and filtering through a 0.22 μm membrane filter. Ethanol and distilled water were added to control media. Each treatment consisted of five repetitions. All data were analyzed by two-way ANOVA, using STATISTICA 7 software. Significance between means was tested by Tukey's test ($P < 0.05$).

RESULTS

Induction and selection of hairy roots

In this study, hairy roots of *L. caulescens* were generated from axenic leaf explants, infected with *A. rhizogenes* ATCC 15834 (Fig. 1A). Four weeks after infection, hairy roots were induced in almost 75% of the infected leaf blade explants. In contrast, hairy roots did not develop on infected petioles. A total of 56 roots were isolated from infected leaf explants and cultured in MSB5 medium with antibiotic. Whereas the transformed roots showed extensive branching and lack of geotropism, the non-transformed roots turned brown and died, without any evidence of growth (Figs. 1B–1C). After two subcultures in MSB5 medium, the obtained hairy root lines kept their morphology and formed numerous pale yellow branches that began intertwining to form a knot like structure, with short lateral branches and spontaneous callus formation (Fig. 1D). The transgenic nature of eleven hairy root lines was confirmed by PCR analysis when PCR products of DNA isolated from hairy roots, showed the expected 776 bp amplicon corresponding to the *rolB* gene, which

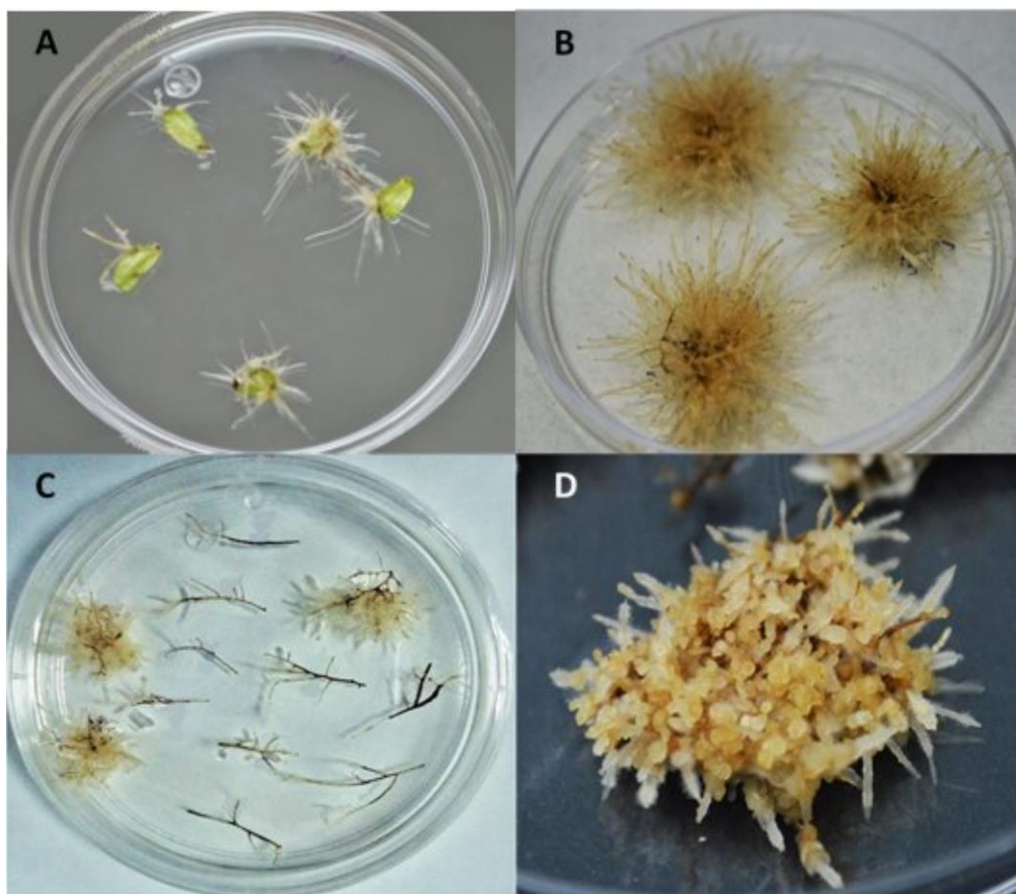


Figure 1 *Agrobacterium rhizogenes* 15834 strain mediated transformation of *L. caulescens*. (A) Hairy roots produced from axenic leaf explants infected with *A. rhizogenes*; (B) individualized and selected transformed root lines; (C) Selection of actively growing hairy roots, non-transformed roots died without any evidence of growth; (D) agglomeration of hairy roots with short lateral branches and spontaneous callus formation.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.11279/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.11279/fig-1)

was also observed in the positive control (bacterial DNA); alternatively, the PCR product from uninfected *L. caulescens* seedlings could not be amplified (Fig. 2). Ten of the hairy root lines analyzed did not amplify the *virD2* gene fragment indicating the absence of *A. rhizogenes* contamination in these cultures (supplementary material). After 4 subcultures, only L1 and L5 showed satisfactory growth without callus formation and were selected for further study. The other nine hairy root lines formed multiples callus and ceased growth.

Effect of sucrose concentration on hairy root growth

Two lines characterized by hairy root morphology, transgenic nature (detection of *rol* genes) and constant growth rate during 160 days were selected to evaluate the effect of the variation of sucrose concentration in the MSB5 medium on the accumulation of biomass and morphology. As shown in Fig. 3, after 4 weeks in culture, hairy roots showed a proportionate increase in DW, in response to an increase in the concentration of sucrose. Although the highest sucrose concentration treatment (60 g/L) induced browning and

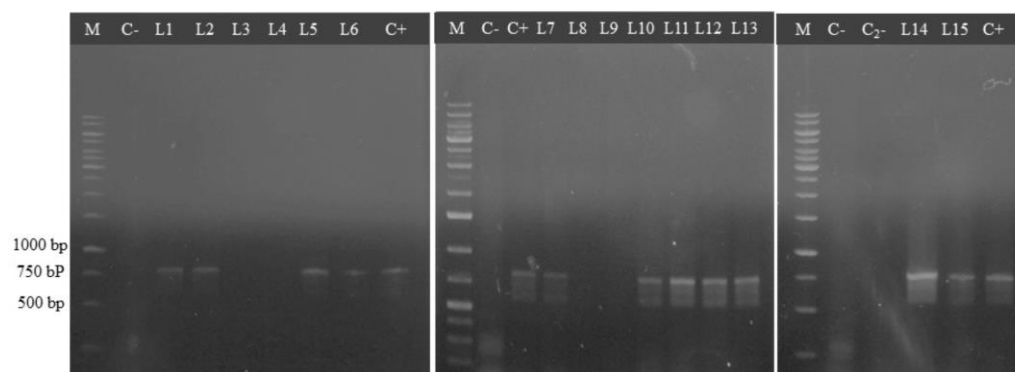


Figure 2 PCR amplification of *rol B* gene fragment. M, molecular size DNA ladder (1 Kb); C+, total DNA from *A. rhizogenes* ATCC15834 strain used as a positive control. C- and C₂⁻, non-infected seedling roots and non-DNA template PCR reaction as negative controls; L1-L15, hairy roots lines.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.11279/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.11279/fig-2)

thinning of roots, hairy roots grown in MSB5 medium, supplemented with 15, 30 and 45 g/L sucrose, showed less stress symptoms. Noticeably, the hairy roots cultured in media supplemented with 45 g/L of sucrose showed a consistent reduction in formation of calli, were more elongated, thick, and pale yellow (Fig. 3B). Also, both lines have a similar pattern of biomass accumulation (Fig. 3). On the basis of these findings, a culture medium with 45-g/L of sucrose was selected to carry out comparative analysis on the production of bioactive metabolites in hairy root cultures of *L. caulescens* elicited by MeJA.

HPLC analyses of wild plants and hairy root cultures

The contents of UA, OA and RA in extracts from wild plants were compared with those from two lines of four week old hairy root cultures (Table 1). While, the wild leaves showed a much higher content of three metabolites than the hairy roots, the accumulation of these metabolites in the hairy root cultures was greater than that detected in wild root extracts. Interestingly, RA levels were between 2.9 - to 1.5 times higher in hairy root cultures than in wild roots (14.15 ± 0.09 mg/g DW), but similar to wild leaves (28.08 ± 0.53 mg/g DW).

Effect of methyl jasmonate on the content of UA, OA and RA in hairy roots of *L. caulescens*

The L5 hairy root line was selected for these evaluations because of its growth stability, absence of calli and superior accumulation of both triterpenes, when compared to L1 line. The production of UA showed significant differences ($F_{6;24} = 6.581$ and $P < 0.001$) between the interaction of MeJA concentration and elicitation time. The highest concentration of UA was obtained by eliciting the cultures for 24 h with 300 μ M of MeJA with a production of 0.22 ± 0.00 mg/g DW. Alternatively, the lowest concentration of UA (0.08 ± 0.01 mg/g DW) was obtained in the control treatment (48 h elicitation without MeJA) (Fig. 4). Similar results were obtained for the accumulation of OA; the interactions MeJA concentration and elicitation time showed significant differences ($F_{6;24} = 6.631$ and $P < 0.001$), the highest yield of OA (0.24 ± 0.00 mg/g DW) was obtained by eliciting the hairy roots cultures with a concentration of 300 μ M of MeJA, for 24 h; while the lowest concentration

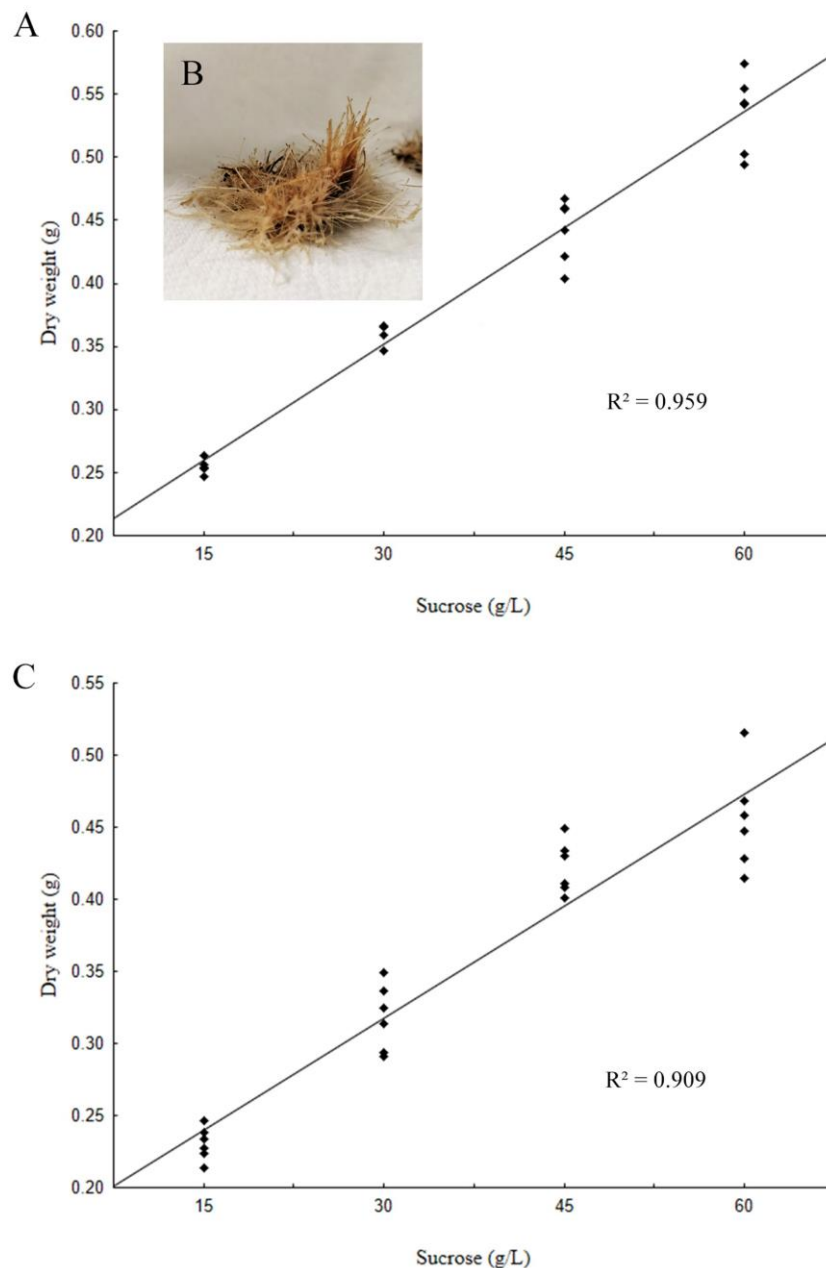


Figure 3 Effect of the variation of sucrose concentration in the MSB5 medium, on the accumulation of biomass of hairy root cultures. (A) L1: $R^2 = 0.959$, $P < 0.05$; (B) hairy roots of *Lepechinia caulescens* grown in MSB5 medium added with 45 g of sucrose; (C) L5: $R^2 = 0.909$, $P < 0.05$.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.11279/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.11279/fig-3)

of OA (0.07 ± 0.00 mg/g DW) was obtained in the control treatment (72 h elicitation, without MeJA) (Fig. 4). The accumulation of RA was also favored by eliciting cultures with MeJA. Interactions between MeJA concentration and elicitation time showed significant differences ($F_{6;24}=1491.0$ and $P < 0.001$). The highest accumulation of RA (60.27 ± 0.88 mg/g DW) was obtained by eliciting the cultures with 200 μ M of MeJA for 24 h; and the

Table 1 Comparative accumulation of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids in extracts from hairy roots and wild plants of *L. caulescens*. The results are mean values $\pm$ SD of three replicates for each plant material. Different letters mean significant statistical differences between samples according to a one-way ANOVA, followed by the post hoc Tukey's test for multiple comparison at $p < 0.05$. UA, ursolic acid; OA, oleanolic acid; RA, rosmarinic acid.

Material	UA (mg/g DW)	OA (mg/g DW)	RA (mg/g DW)
Hairy root lines			
L1	0.10 ± 0.00^D	0.17 ± 0.00^C	41.66 ± 0.31^A
L5	0.29 ± 0.00^B	0.57 ± 0.00^B	21.60 ± 0.38^C
Wild roots	0.17 ± 0.00^C	0.08 ± 0.00^D	14.15 ± 0.09^D
Wild leaves	16.58 ± 0.05^A	1.94 ± 0.05^A	28.08 ± 0.53^B

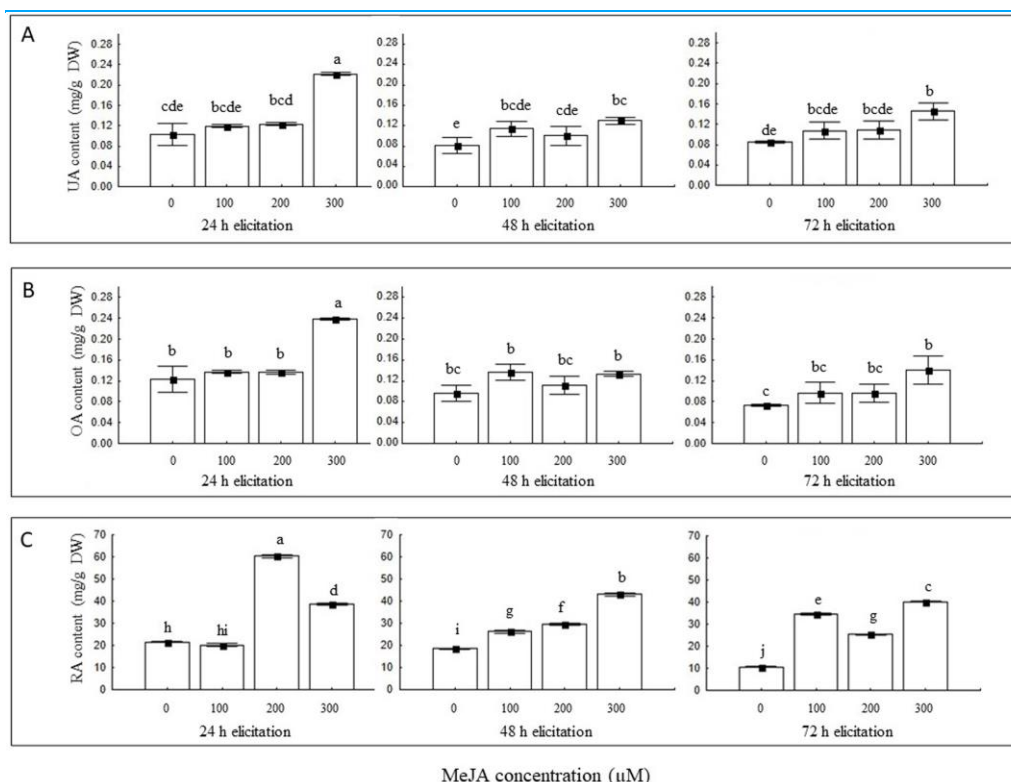


Figure 4 Effect of MeJA concentration and time exposure on ursolic acid (A), oleanolic acid (B), and rosmarinic acid (C) content in hairy roots cultures line 5. Results are the mean of five replicates $\pm$ standard deviation. Different letters indicate significant differences by Tukey's test ($P < 0.05$).

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.11279/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.11279/fig-4)

lowest concentration (10.71 ± 0.34 mg/g DW) was obtained in the control treatment (72 h, without MeJA) (Fig. 4).

According to statistical analyses, the yield means of the elicitation time factor ($F_{3,24} = 23.127$, $F_{3,24} = 43.374$ and $F_{3,24} = 695.78$ for UA, OA and RA respectively, $P < 0.001$ for all cases) and the concentration of MeJA ($F_{3,24} = 49.213$, $F_{3,24} = 36.881$ and $F_{3,24} = 4114.9$ to UA, OA and RA respectively, $P < 0.001$ for all cases) have a positive effect

on the production of UA, OA and RA; with treatments elicited for 24 h with a concentration of 300 μ M of MeJA, showing greatest accumulation.

DISCUSSION

L. caulescens represents a suitable plant species for the establishment of plant tissue cultures to produce UA, OA and RA, as valuable additive and bioactive compounds for pharmaceutical, cosmetic and food industries (Perez-Hernandez et al., 2008; Vergara et al., 2017). Hair roots induced by *A. rhizogenes* provide an attractive alternative system to classic technologies to produce bioactive compounds, because of their higher degree of genetic and biochemical stability (Tabar, Moieni & Monfared, 2019). In this investigation, hairy root cultures of *L. caulescens* were established from leaf explants, using *A. rhizogenes* ATCC 15834. This strain is widely used for the production of important bioactive compounds from many aromatic and medicinal plants of the Lamiaceae family, such as *Prunella vulgaris* (Ru et al., 2016), *Dracocephalum kotschy* (Nourozi et al., 2019), *Nepeta teydea* (Fraga et al.,

2017) *Pogostemon Cablin* (He-Ping et al., 2011) and *Origanum vulgare* (Habibi et al., 2016). In most of these plant species and in *L. caulescens*, leaf explants stand out as the best tissue for transformation. Results from this investigation indicate that petiole explants were not susceptible to transformation by *A. rhizogenes*. These differences between leaf and petiole explants may be due to different tissue sensitivity to *Agrobacterium* strain, variations in T-DNA integration efficiency and varying survival rates of transgenic cells after treatment. The efficiency of *A. rhizogenes* strains to induce for hairy roots can vary greatly. It is well documented that success in *Agrobacterium*-mediated plant genetic transformation processes relies on various factors, such as bacterial strains, plasmid, age of explants, and capacity of target plant tissues for infection (Karami et al., 2009).

The transgenic nature of hairy root lines of *L. caulescens* was confirmed by PCR amplification of *rolB* gene of T-DNA. The *rolB* gene is crucial for the *de novo* induction of meristems and elongation of hairy roots (Mauro, Costantino & Bettini, 2017; Fathi, Mohebodini & Chamani, 2019). In the present study, all the selected hairy root lines exhibited a densely clumped growth, short branches and rapid plagiotropic growth on plant growth regulator free medium. This may be due to the lack of apical dominance here, owing to the expression of genes on the T-DNA.

The *L. caulescens* hairy roots kept in darkness are non autotrophic and thus rely solely on an external carbon source for their growth and metabolic requirements. Sucrose is the good carbon source for the cultivation of *in vitro* plant tissues, due to its effective absorption through the cell membrane (Ptak et al., 2020), which can provide energy, building blocks and osmotic pressure (Wiktorowska, Długosz & Janiszowska, 2010), but also affect hormone biosynthesis and secondary metabolism (Thompson et al., 2017). It can particularly affect the growth and development of hairy roots, just as it was observed in this study. However, and even though increased sucrose concentration in culture medium caused enhanced accumulation of hairy root biomass and decreased callus formation a steep increase in the browning of roots after 21 days of culture in 60 g/L of sucrose was observed; this can be associated with osmotic stress and loss of culture viability. Thus, the results from this study revealed that supplementing the medium with 45 g/L sucrose, improves biomass accumulation and morphology of *L. caulescens* hairy roots. The concentrations of between 3%–5% sucrose have frequently been

reported as optimal for biomass accumulation and production of secondary metabolites from adventitious roots and hairy root cultures, whereas higher concentrations of sucrose have an inhibitory effect on plant tissue culture growth (Vazquez-Flota *et al.*, 1994; Baque *et al.*, 2012; Praveen & Murthy, 2012). Similarly, the supplementation of cultures with sucrose has also been reported to influence the growth and development of hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* (Shinde, Malpathak & Fulzele, 2010), *Hypericum perforatum* (Cui *et al.*, 2010), *Azadirachta indica* (Srivastava & Srivastava, 2012) and *Daucus carota* (Mukherjee *et al.*, 2019).

The results presented here indicate that hairy root cultures of *L. caulencens* have the ability to synthesize and accumulate UA, OA and RA. However, there were apparent differences in their hairy root line content, when cultured under the same conditions. These differences between the L1 and L5 transgenic lines may be caused by varying expression levels of *rol* genes that possibly refer to plant genome variations at the T-DNA insertion site and in the copy number. Several authors have reported that the location and copy number of *rolB* and *rolC* genes, alone or in combination with each other, can affect hairy root growth and secondary metabolite production (Shkryl *et al.*, 2008; Ahlawat *et al.*, 2014; Dilshad *et al.*, 2015; Matvieieva *et al.*, 2020). Supplementation with MeJA significantly increased the amount of UA, OA and RA in the hairy roots of *L. caulencens*. This elicitor modulates key enzymes involved in the biosynthesis of triterpenes and phenolic compounds (Misra *et al.*, 2014). Wang *et al.* (2017) found that the addition of MeJA to cell cultures of *Achyranthes bidentata* in suspension, up-regulated the mRNA expression level of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene (*HMGR*), encoding a key enzyme to provide mevalonate for biosynthesis of triterpene acids. Likewise, Misra *et al.* (2014) and Misra *et al.* (2017) found that β -amyrin synthase (*AS*) and two cytochrome P450 monooxygenases genes, increased their expression levels in *Ocimum basilicum*, when elicited with 250 μ M MeJA, thus contributing to the accumulation of OA and UA. It has been observed that MeJA can also elevate the expression of the key genes involved in the biosynthesis of RA, such as phenylalanine ammonia-lyase gene (*PAL*), cinnamate 4-hydroxylase (*C4H*) and 4-coumarate: coenzyme-A (*CoA*) ligase (*4CL*), tyrosine aminotransferase (*TAT*), 4-hydroxyphenylpyruvate reductase (*HPPR*) and RA synthase (Kim *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2018; Fatemi *et al.*, 2019).

Several studies have shown that the effects of MeJA treatments may vary depending on plant species or specific secondary metabolite, as mentioned above. It has been demonstrated that elicitor concentration and exposure duration exert a stimulatory effect on certain plant systems, but result in null activity when applied to others, reflecting different sensibilities on the part of the molecular components involved in elicitation (Vasconsuelo & Boland, 2007; Verma *et al.*, 2014). In effect, the results from this study clearly demonstrate that the accumulation of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids depends on the concentrations of MeJA applied, and duration of exposure to the elicitor. Among the various MeJA treatments, 300 μ M MeJA for 24 h was suitable for increasing the production of UA and OA, whereas 200 μ M for 24 h of this elicitor was the optimum condition for improving RA production in *L. caulencens* hairy roots. Interestingly, when exposure time was increased to 48 or 72 h, the MeJA did not promote accumulation of triterpenes. These results concur with those reported by (Sharan, Sarin & Mukhopadhyay, 2019), who found variation in the yield of UA in *Ocimum tenuiflorum* hairy root cultures, depending on the concentration of MeJA (0, 30, 60 and 120 mg/L) and exposure times (4, 8 and 12 days). This effect on the part of MeJA was also observed in terms of OA yield from the cell cultures of *Achyranthes bidentata*, treated with 0.2 mM MeJA for 24, 48 and 72 h (Wang *et al.*,

2017) and for the accumulation of RA in the hairy root cultures of *Coleus forskohlii*, exposed to MeJA (0.1, 0.5 and 1.0 mM) for between 1 and 7 days (Li et al., 2005). As concentration and exposure time to the elicitor are plant specific, the results described in this paper may contribute to future molecular studies, designed to analyze the biosynthesis pathway of these valuable pharmaceutical compounds.

CONCLUSIONS

In summary, this is the first report to document the successful establishment of *L. caulescens* hairy root cultures. The hairy roots grown in MSB5 medium, supplemented with 45g/L sucrose, have the ability to synthesize and accumulate significantly higher UA, OA and RA concentrations than the wild plant. Furthermore, this study clearly demonstrated that the accumulation of these bioactive metabolites was dependent on the MeJA concentrations used, and duration of exposure to the elicitor. Future studies should aim to identify the regulatory factors that control the biosynthetic pathways of triterpenes and phenolic compounds in hairy roots of *L. caulescens*.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Centro de Investigación en Biotecnología of UAEM for providing necessary facilities with which to conduct this research. We are indebted to MI Ariadna Zenil Rodríguez for technical assistance.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This research was supported by a CONACYT grant for doctorate studies (559379/296765) and constitutes part of the doctoral thesis of VMVM in the PhD Program in Natural Sciences UAEM. There was no additional external funding received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

CONACYT: 559379/296765.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

Author Contributions

- Victor M. Vergara-Martínez and Irene Perea-Arango conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Samuel E. Estrada-Soto, Susana Valencia-Díaz, Karlina Garcia-Sosa, Luis Manuel PeñaRodríguez and José de Jesús Arellano-García analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Raw data are available as a [Supplemental File](#).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.11279#supplemental-information>.

REFERENCES

- Acıkgöz MA. 2020.** Establishment of cell suspension cultures of *Ocimum basilicum* L. and enhanced production of pharmaceutical active ingredients. *Industrial Crops and Products* **148**:112278 DOI [10.1016/j.indcrop.2020.112278](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112278).
- Ahlawat S, Saxena P, Alam P, Wajid S, Abdin MZ. 2014.** Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Journal of Plant Interactions* **9**(1):811–824 DOI [10.1080/17429145.2014.949885](https://doi.org/10.1080/17429145.2014.949885).
- Alsoufi ASM, Pączkowski C, Szakiel A, Długosz M. 2019.** Effect of jasmonic acid and chitosan on triterpenoid production in *Calendula officinalis* hairy root cultures. *Phytochemistry Letters* **31**:5–11 DOI [10.1016/j.phytol.2019.02.030](https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.02.030).
- Ashraf MF, Zain CRCM, Zainal Z, Noor NM, Anuar N, Markom M, Ismail I. 2015.** Establishment of *Persicaria minor* hairy roots and analysis of secreted β -caryophyllene in medium broth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **121**(1):11–20 DOI [10.1007/s11240-014-0674-2](https://doi.org/10.1007/s11240-014-0674-2).
- Baek S, Ho TT, Lee H, Jung G, Kim YE, Jeong CS, Park SY. 2020.** Enhanced biosynthesis of triterpenoids in *Centella asiatica* hairy root culture by precursor feeding and elicitation. *Plant Biotechnology Reports* **14**(1):45–53 DOI [10.1007/s11816-019-00573-w](https://doi.org/10.1007/s11816-019-00573-w).
- Baque MA, Elgirban A, Lee EJ, Paek KY. 2012.** Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum* **34**(2):405–415 DOI [10.1007/s11738-011-0837-2](https://doi.org/10.1007/s11738-011-0837-2).
- Baranauskaite J, Jakštas V, Ivanauskas L, Kopustinskiene DM, Drakšiene G, Masteikova R, Bernatoniene J. 2016.** Optimization of carvacrol, rosmarinic, oleanolic and ursolic acid extraction from oregano herbs (*Origanum onites* L., *Origanum vulgare* spp. hirtum and *Origanum vulgare* L.). *Natural Product Research* **30**(6):672–674 DOI [10.1080/14786419.2015.1038998](https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1038998).
- Cui XH, Murthy HN, Wu CH, Paek KY. 2010.** Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **103**(1):7–14 DOI [10.1007/s11240-010-9747-z](https://doi.org/10.1007/s11240-010-9747-z).
- Dilshad E, Cusido RM, Palazon J, Estrada KR, Bonfill M, Mirza B. 2015.** Enhanced artemisinin yield by expression of *rol* genes in *Artemisia annua*. *Malaria Journal* **14**:424 DOI [10.1186/s12936-015-0951-5](https://doi.org/10.1186/s12936-015-0951-5).

- Elufioye TO, Habtemariam S. 2019.** Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: insight into its mechanisms of action. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **112**:108600 DOI [10.1016/j.biopha.2019.108600](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108600).
- Estrada-Soto S, Navarrete-Vázquez G, León-Rivera I, Rios MY, Aguilar-Guadarrama B, Castillo-España P, Ortíz-Andrade R, Aguirre-Crespo F. 2012.** Antihypertensive effect of *Lepechinia caulescens* extract on spontaneously hypertensive rats. *Phytopharmacol* **2**:170–178.
- Fatemi F, Abdollahi MR, Mirzaie-asl A, Dastan D, Garagounis C, Papadopoulou K. 2019.** Identification and expression profiling of rosmarinic acid biosynthetic genes from *Satureja khuzistanica* under carbon nanotubes and methyl jasmonate elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **136**(3):561–573 DOI [10.1007/s11240-018-01537-8](https://doi.org/10.1007/s11240-018-01537-8).
- Fathi R, Mohebodini M, Chamani E. 2019.** High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation in *Cichorium intybus* L. via removing macronutrients. *Industrial Crops and Products* **128**:572–580 DOI [10.1016/j.indcrop.2018.11.050](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.050).
- Fraga BM, González-Coloma A, Alegre-Gómez S, López-Rodríguez M, Amador LJ, Díaz CE. 2017.** Bioactive constituents from transformed root cultures of *Nepeta teydea*. *Phytochemistry* **133**:59–68 DOI [10.1016/j.phytochem.2016.10.008](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.10.008).
- Gamborg OL, Miller R, Ojima K. 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**(1):151–158 DOI [10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).
- Giles-Rivas D, Estrada-Soto S, Aguilar-Guadarrama AB, Almanza-Pérez J, GarcíaJiménez S, Colín-Lozano B, Navarrete-Vázquez G, Villalobos-Molina R. 2020.** Antidiabetic effect of *Cordia morelosana*, chemical and pharmacological studies. *Journal of Ethnopharmacology* **251**:112543 DOI [10.1016/j.jep.2020.112543](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112543).
- Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S. 1995.** Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(8):2879–2884 DOI [10.1128/AEM.61.8.2879-2884.1995](https://doi.org/10.1128/AEM.61.8.2879-2884.1995).
- Habibi P, De Sa MFG, Da Silva ALL, Makhzoum A, Da Luz Costa J, Borghetti IA, Soccol CR. 2016.** Efficient genetic transformation and regeneration system from hairy root of *Origanum vulgare*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **22**(2):271–277 DOI [10.1007/s12298-016-0354-2](https://doi.org/10.1007/s12298-016-0354-2).
- Häkkinen ST, Moyano E, Cusidó RM, Oksman-Caldentey KM. 2016.** Exploring the metabolic stability of engineered hairy roots after 16 years maintenance. *Frontiers in Plant Science* **7**:1486.
- He-Ping S, Yong-Yue L, Tie-Shan S, Eric TPK. 2011.** Induction of hairy roots and plant regeneration from the medicinal plant *Pogostemon cablin*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **107**(2):251–260 DOI [10.1007/s11240-011-9976-9](https://doi.org/10.1007/s11240-011-9976-9).
- Hooykaas PJJ, Klapwijk PM, Nuti MP, Schilperoort RA, Rörsch A. 1977.** Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium ex planta*. *Microbiology* **98**(2):477–484.

- Ji JJ, Feng Q, Sun HF, Zhang XJ, Li XX, Li JK, Gao JP. 2019. Response of bioactive metabolite and biosynthesis related genes to methyl jasmonate elicitation in *Codonopsis pilosula*. *Molecules* **24**(3):533 DOI [10.3390/molecules24030533](https://doi.org/10.3390/molecules24030533).
- Karami O, Esna-Ashari M, Kurdistan GK, Aghavaisi B. 2009. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: the role of host. *Biologia Plantarum* **53**:201–212 DOI [10.1007/s10535-009-0041-z](https://doi.org/10.1007/s10535-009-0041-z).
- Kim YB, Kim JK, Uddin MR, Xu H, Park WT, Tuan PA, Li X, Chung E, Lee J, Park SU. 2013. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate. *PLOS ONE* **8**(5):e64199 DOI [10.1371/journal.pone.0064199](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064199).
- Li W, Koike K, Asada Y, Yoshikawa T, Nikaido T. 2005. Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **80**(2):151–155 DOI [10.1007/s11240-004-9541-x](https://doi.org/10.1007/s11240-004-9541-x).
- Li J, Li B, Luo L, Cao F, Yang B, Gao J, Yan Y, Zhang G, Peng L, Hu B. 2020. Increased phenolic acid and tanshinone production and transcriptional responses of biosynthetic genes in hairy root cultures of *Salvia przewalskii* Maxim. treated with methyl jasmonate and salicylic acid. *Molecular Biology Reports* **47**(11):8565–8578 DOI [10.1007/s11033-020-05899-1](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05899-1).
- Lu X, Tang K, Li P. 2016. Plant metabolic engineering strategies for the production of pharmaceutical terpenoids. *Frontiers in Plant Science* **7**:1647 DOI [10.3389/fpls.2016.01647](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01647).
- Lu C, Zhang C, Zhao F, Li D, Lu W. 2018. Biosynthesis of ursolic acid and oleanolic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *AIChE Journal* **64**(11):3794–3802 DOI [10.1002/aic.16370](https://doi.org/10.1002/aic.16370).
- Matvieieva NA, Morgun BV, Lakhneko OR, Duplij VP, Shakhovsky AM, Ratushnyak YI, Sidorenko M, Mickevicius S, Yevtushenko DP. 2020. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances the antioxidant potential of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Plant Physiology and Biochemistry* **152**:177–183 DOI [10.1016/j.plaphy.2020.04.020](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.020).
- Mauro ML, Costantino P, Bettini PP. 2017. The never ending story of rol genes: a century after. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **131**(2):201–212 DOI [10.1007/s11240-017-1277-5](https://doi.org/10.1007/s11240-017-1277-5).
- Misra RC, Maiti P, Chanotiya CS, Shanker K, Ghosh S. 2014. Methyl jasmonate-elicited transcriptional responses and pentacyclic triterpene biosynthesis in sweet basil. *Plant Physiology* **164**(2):1028–1044 DOI [10.1104/pp.113.232884](https://doi.org/10.1104/pp.113.232884).
- Misra RC, Sharma S, Garg A, Chanotiya CS, Ghosh S. 2017. Two CYP716A subfamily cytochrome P450 monooxygenases of sweet basil play similar but nonredundant roles in ursane-and oleanane-type pentacyclic triterpene biosynthesis. *New Phytologist* **214**(2):706–720 DOI [10.1111/nph.14412](https://doi.org/10.1111/nph.14412).
- Mukherjee S, Kutty NN, Bera P, Mitra A. 2019. Impact of light and sucrose supplementation on cellular differentiation, metabolic shift and modulation of gene expression in hairy roots of *Daucus carota*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **136**(2):383–397 DOI [10.1007/s11240-018-1523-5](https://doi.org/10.1007/s11240-018-1523-5).

- Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* **15**:473–497 DOI [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
- Nourozi E, Hosseini B, Maleki R, Mandoulakani BA. 2019.** Pharmaceutical important phenolic compounds overproduction and gene expression analysis in *Dracocephalum kotschy* hairy roots elicited by SiO₂ nanoparticles. *Industrial Crops Products* **133**:435–446 DOI [10.1016/j.indcrop.2019.03.053](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.053).
- Ochoa-Villarreal M, Howat-Susan HS, Jang MO, Jin Y-W, Lee E-K, Loake GJ. 2016.** Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports* **49**:149–158 DOI [10.5483/BMBRep.2016.49.3.264](https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.3.264).
- Pandey P, Singh S, Banerjee S. 2019.** *Ocimum basilicum* suspension culture as resource for bioactive triterpenoids: yield enrichment by elicitation and bioreactor cultivation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **137**(1):65–75 DOI [10.1007/s11240-018-01552-9](https://doi.org/10.1007/s11240-018-01552-9).
- Perez-Hernandez N, Ponce-Monter H, Medina JA, Joseph-Nathan P. 2008.** Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. *Journal of Ethnopharmacology* **1**(115):30–35.
- Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Matsuda SPT. 2006.** Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology* **9**(3):305–314 DOI [10.1016/j.pbi.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.004).
- Praveen N, Murthy HN. 2012.** Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. *Industrial Crops and Products* **35**(1):241–243 DOI [10.1016/j.indcrop.2011.07.009](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.009).
- Ptak A, Morańska E, Skrzypek E, Warchoń M, Spina R, Laurain-Mattar D, Simlat M. 2020.** Carbohydrates stimulated Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis in *Leucojum aestivum* L. plants cultured in RITA[®] bioreactor. *PeerJ* **8**:e8688 DOI [10.7717/peerj.8688](https://doi.org/10.7717/peerj.8688).
- Qiang Z, Ye Z, Hauck C, Murphy PA, McCoy JA, Widrlechner MP, Reddy MB, Hendrich S. 2011.** Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extracts across Caco-2 cell monolayers. *Journal of Ethnopharmacology* **137**(3):1107–1112 DOI [10.1016/j.jep.2011.07.037](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.037).
- Rios MY, López-Martínez S, López-Vallejo F, Medina-Franco JL, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, Navarrete-Vazquez G, Hidalgo-Figueroa S, Hernández-Abreu O, Estrada-Soto S. 2012.** Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: Ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia* **83**(6):1023–1029 DOI [10.1016/j.fitote.2012.05.014](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.05.014).
- Roychowdhury D, Halder M, Jha S. 2017.** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in medicinal plants: genetic stability in long-term culture. In: *Transgenesis and secondary metabolism*. Cham: Springer, 323–345.
- Ru M, An Y, Wang K, Peng L, Li B, Bai Z, Wang B, Liang Z. 2016.** *Prunella vulgaris* L. hairy roots: culture, growth, and elicitation by ethephon and salicylic acid.

- Engineering in Life Sciences* **16**(5):494–502 DOI [10.1002/elsc.201600001](https://doi.org/10.1002/elsc.201600001).
- Ruffoni B, Bertoli A, Pistelli L, Pistelli L. 2016.** Micropropagation of *Salvia wagneriana* Polak and hairy root cultures with rosmarinic acid production. *Natural Product Research* **30**(22):2538–2544 DOI [10.1080/14786419.2015.1120725](https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1120725).
- Salvador JAR, Leal AS, Alho DP, Goncalves BM, Valdeira AS, Mendes VI, Jing Y. 2014.** Highlights of pentacyclic triterpenoids in the cancer settings. *Studies in Natural Products Chemistry* **41**:33–73 DOI [10.1016/B978-0-444-63294-4.00002-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63294-4.00002-4).
- Sharan S, Sarin NB, Mukhopadhyay K. 2019.** Elicitor-mediated enhanced accumulation of ursolic acid and eugenol in hairy root cultures of *Ocimum tenuiflorum* L. is age, dose, and duration dependent. *South African Journal of Botany* **124**:199–210 DOI [10.1016/j.sajb.2019.05.009](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.009).
- Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Saeidnia S, Gohari AR, Hamedani MP. 2012.** Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacognosy Magazine* **8**(29):37–41 DOI [10.4103/0973-1296.93316](https://doi.org/10.4103/0973-1296.93316).
- Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP. 2010.** Impact of nutrient components on production of the phytoestrogens daidzein and genistein by hairy roots of *Psoralea corylifolia*. *Journal of Natural Medicines* **64**(3):346–353 DOI [10.1007/s11418-010-0419-4](https://doi.org/10.1007/s11418-010-0419-4).
- Shkryl YN, Veremeichik GN, Bulgakov VP, Tchernoded GK, Mischenko NP, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN. 2008.** Individual and combined effects of the *rolA*, B, and C genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed call. *Biotechnology & Bioengineering* **100**:118–125 DOI [10.1002/bit.21727](https://doi.org/10.1002/bit.21727).
- Soica C, Oprean C, Borcan F, Danciu C, Trandafirescu C, Coricovac D, Crăiniceanu Z, Dehelean CA, Munteanu M. 2014.** The synergistic biologic activity of oleanolic and ursolic acids in complex with hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin. *Molecules* **19**:4924–4940 DOI [10.3390/molecules19044924](https://doi.org/10.3390/molecules19044924).
- Srivastava DK, Gambhir G, Sharma P. 2013.** Plant cell and tissue culture techniques in crop improvement. In: Panesar PS, Marwaha SS, eds. *Biotechnology in agriculture and food processing, opportunities and challenges*. New York: CRC Press, Taylor and Francis, 73–131.
- Srivastava S, Srivastava AK. 2012.** Statistical medium optimization for enhanced azadirachtin production in hairy root culture of *Azadirachta indica*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **48**(1):73–84 DOI [10.1007/s11627-011-9395-y](https://doi.org/10.1007/s11627-011-9395-y).
- Tabar RS, Moieni A, Monfared SR. 2019.** Improving biomass and chicoric acid content in hairy roots of *Echinacea purpurea* L. *Biologia* **74**(8):941–951 DOI [10.2478/s11756-019-00232-z](https://doi.org/10.2478/s11756-019-00232-z).
- Thompson M, Gamage D, Hirotsu N, Martin A, Seneweera S. 2017.** Effects of elevated carbon dioxide on photosynthesis and carbon partitioning: a perspective on root sugar sensing and hormonal crosstalk. *Frontiers in Physiology* **8**:578 DOI [10.3389/fphys.2017.00578](https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00578).
- Vasconsuelo A, Boland R. 2007.** Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* **172**(5):861–875.

- Vazquez-Flota F, Moreno-Valenzuela O, Miranda-Ham MDL, Coello-Coello J, LoyolaVargas VM. 1994. Catharanthine and ajmalicine synthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **38**(2–3):273–279.
- Vergara MV, Estrada-Soto SE, Arellano-García J, Rivera-Leyva JC, Castillo-España P, Flores AF, Perea-Arango I. 2017. Methyl jasmonate and salicylic acid enhanced the production of ursolic and oleanolic acid in callus cultures of *Lepechinia caulescens*. *Pharmacognosy Magazine* **13**(Suppl 4):S886–S889.
- Verma P, Khan SA, Mathur AK, Ghosh S, Shanker K, Kalra A. 2014. Improved sanguinarine production via biotic and abiotic elicitations and precursor feeding in cell suspensions of latex-less variety of *Papaver somniferum* with their gene expression studies and upscaling in bioreactor. *Protoplasma* **251**(6):1359–1371.
- Wang QJ, Lei XY, Zheng LP, Wang JW. 2017. Molecular characterization of an elicitorresponsive 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene involved in oleanolic acid production in cell cultures of *Achyranthes bidentata*. *Plant Growth Regulation* **81**(2):335–343 DOI [10.1007/s10725-016-0210-y](https://doi.org/10.1007/s10725-016-0210-y).
- Wiktorowska E, Długosz M, Janiszowska W. 2010. Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology* **46**(1):14–20 DOI [10.1016/j.enzmictec.2009.09.002](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.002).
- Woźniak Ł, Skapska S, Marszałek K. 2015. Ursolic acid—a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules* **20**(11):20614–20641 DOI [10.3390/molecules201119721](https://doi.org/10.3390/molecules201119721).
- Xing B, Yang D, Liu L, Han R, Sun Y, Liang Z. 2018. Phenolic acid production is more effectively enhanced than tanshinone production by methyl jasmonate in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **134**:119–129 DOI [10.1007/s11240-018-1405-x](https://doi.org/10.1007/s11240-018-1405-x).
- Yousefian S, Lohrasebi T, Farhadpour M, Haghighi K. 2020. Effect of methyl jasmonate on phenolic acids accumulation and the expression profile of their biosynthesis-related genes in *Mentha spicata* hairy root cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* **142**:285–297 DOI [10.1007/s11240-020-01856-9](https://doi.org/10.1007/s11240-020-01856-9).

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

Tesis: Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción de biomasa y moléculas bioactivas en cultivos de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* Ort.

Alumno que lo presenta a revisión: VÍCTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2021-07-01 15:37:05 | Firmante

Y/FEoizEIWrSoZgaUDq8++FOxODXwA8hacAX6F8BFVhySMnHHZ/pxZRieh/dkIR/Qd8bRZMN9NFeuwanQuNz8sS1cG8kUT8NNJUfNT8etBM4M+SajJycl4QlqEf/H7sqExepjWIR36L+HFmogUiMAGK2wu0aH6B84+hRWfzrP4CN+DBCoRfm9ijHwA/nh7zPu3t/qB00NMW57Xqik05JYB9+aTS0vdX+r9IMuBAd2pus75WOPnckWrQ7rzpNsTDA7ULIfvhM8IYzam2W9GmB88CH9Cm7NJCILPOIDSVIAS1eIRlqjQHTKU/MjNnXXVXU9y8nlrB/jd3+l3LueLxhw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



oTrlsy

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Ztq2teclX3RMUVOD6k4w7AnXkxey48Bt>



Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

Tesis: Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción de biomasa y moléculas bioactivas en cultivos de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* Ort.

Alumno que lo presenta a revisión: VÍCTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

Tesis: Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción de biomasa y moléculas bioactivas en cultivos de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* Ort.

Alumno que lo presenta a revisión: VÍCTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2021-07-01 17:44:36 | Firmante

jW6rA4loTuz7lXIkBh2Jl4QPBkyBrPCPJTV3stZNCugrZBhnFKH3npvxcIHQ4165nTs8THTzCql9e7ra+LSFEI9STW5yl/MHFT9F+9JMj4fyAtjo5TIYdfk3S7CMame96TYyGQ2zpti/to6/mp0BhAtAchUO3Jsl6UrcIEmsipcmrIZMmJA472YTHU6smomZpPI3ISrtPh1Sdk1nM1vuHk1XICsGONU71wn7lfv/9qhi6Sifl4JU+CFZf2xBpbWkT5/YDbfsFwpcd4Izakfn2lkY4/6u4QrYi5P6CuakQyqyYISkhu32ty7Wc0VKNc876YF9ula0OZ+0gYSpdQkA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ZDoqTM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zj5CjGeCCY1bIOSKZFNyCqU7yuZ3bXd1>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

Tesis: Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción de biomasa y moléculas bioactivas en cultivos de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* Ort.

Alumno que lo presenta a revisión: VÍCTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUIS CASPETA GUADARRAMA | Fecha:2021-07-01 15:55:04 | Firmante

XkM+nyP01/iHVelyiplD6rJlxhFMGkApsWHSrNT7Z0/9kmmSa3TZs7z2hzBQYbtQ/UYISEgn8VN1MyZ/RpHlg0q2jEM9dp6IHUPI5LqptiirrrZ0PWW1jYnzu+iEeD/w3OO0FU57pH6
reY1EV7/Ga50tTMfRhOkPhPzUjhsMxKqq9ePmOm2d2DuOeOFklloaWc4ieGDoHp52JAOSTXtcKdd2U1IBIVelZuD7AXGiCkqVsOjzDMYI9HMa9fBRbDldoyoxgWTIERT+7j9M6a
8T48P7dHfYw8m1JbCC6Mw0SJcXLcla/K+2Btvl/admy0QU4VvHu/dBoN2zm6ZeF+A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



ioLSKM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HJ6AdMRHtE5wO4YVCO9sjhJtZnJOug7C>



Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

Tesis: Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción de biomasa y moléculas bioactivas en cultivos de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* Ort.

Alumno que lo presenta a revisión: VÍCTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2021-07-03 18:37:08 | Firmante

ep5LWcpu3FT8yIFmXetoj+abdR+Oys9nqh7BZD8xiZH2XlpjFaZMLf1Xbq3wk4N4wNFhSqXdV6GWQAiAo0aKMzRaCLFKVpGEf1HeDoW0FOUrMoZfxhzW+360Z8il6+Nj5dx88qMPyibOiNFHwOylGSXUj8z/t60dyB+/OV4qNb0nDlKyT1pqlKYLhNuHYnPP3T+Vdz2yFOBwJdBMWN8BWSVt/V+4mnUaEKrbdlOobwaAPJEj0GLqQ6c+11K/UK/GJAXI/Zp/4WZeKrDxjldem+apb82y2x1FywhLh0p0SNwO851LxLEuc5Nc9QO1o8yToAZkJBwU9MuMpFiJZtQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



tgDpBJ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/4RckSJuwTwBa1iJFXq3GeBWEOQ9x93os>



Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

Tesis: Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción de biomasa y moléculas bioactivas en cultivos de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* Ort.

Alumno que lo presenta a revisión: VÍCTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2021-07-01 16:02:29 | Firmante

FygDN3XPpqojnZonN9to1QPJWce7Te2vEOKVXYSKGthKbp02xTuTF26bpXXVr1DoSkzemXtLNZZcNXxiT2P+3iUj26q8qwrOyYwmrVNBMGht8OZNlj9V2pyivbBUeloAp6i6Qe6DHIfYw8BG7d/XVBmoK8Tr48T+zFJEG6itLMnw2k2gL6UEX/QYrhaE5H4zAY5jxBMsxCqbyCI7To+MWqHHDRuF7VuLYVK7Kkk3MFfxP06L6/6V/Y3fa8naOH/x+TpG5DSxYYXpplBgPIYZCgdJ6lP/rtQ0Xw5484Lp5ATXXx3lDZD8eoEeQoeb8NFSZBzJDegj+UcWW88iOhkhw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



29f4Eh

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/rKCO4fO0pxd3gT2si6LCaZtP4ScKHCf6>



Cuernavaca, Morelos, a 15 de junio del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (director de tesis CEIB, UAEM)

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto (FF, UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT, UNAM)

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Dr. Fernando Orozco Sánchez (UNC)

Tesis: Efecto de diferentes condiciones de cultivo en la producción de biomasa y moléculas bioactivas en cultivos de raíces transformadas de *Lepechinia caulescens* Ort.

Alumno que lo presenta a revisión: VÍCTOR MANUEL VERGARA MARTÍNEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. FERNANDO OROZCO SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO OROZCO SÁNCHEZ | Fecha:2021-06-30 21:45:30 | Firmante

WbpkX+BGpQ12FV4AaG//MT6lx310Q9qqi4Oh/CBJhzk+WzKLqmy+SnvSFwbQA0VzEDeyRT77YkD02dsuBYnSjtzXaELTiLRLYbVvEG3vXpEdGKm88aK4DErxbKpHRBbxJKicHvMrv1+ML1seW1SIScaQJUHTHivtaGleJkyHV5loyih8Ca5qevfmC2gqVB97db+1cromqznzkJl1+08weicXoSGDVe32YQns9SR+qSe2FB/BERyH+nHhJfFWQjtkOStnK8HUB5JJv/sZrj+JcEt9M/REBQQNdFHJZlco0H9tLDUN3cpV84cR5lc7rT8ZQRLvXOVIShgS9AoUQV0Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



sJWynX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3lsZCwTA328nAMemFIKmhMhMVdhyFUwUJ>

