



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis metabolómico en tres fenotipos
somaclonales de *Agave angustifolia* Haw.**

Tesis que presenta

Edder Darío Aguilar Méndez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2021

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de Edder Darío Aguilar Méndez, titulado “Análisis metabólico en tres fenotipos somaclonales de *Agave angustifolia* Haw.”, fue realizado en el laboratorio de Epigenética de Plantas de la Unidad Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología, bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 26 de mayo de 2021

PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to read 'Edder Darío Aguilar Méndez'. There are some additional scribbles and a vertical line crossing through the signature.

Biol. Edder Darío Aguilar Méndez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. y en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Ecología A.C., Campus 3, Clúster Científico y Tecnológico BioMimic®. Forma parte del proyecto Conacyt CB-2016 285898, Cátedra Moshinsky 2017 en el que participé bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Clelia De la Peña Seaman.

A mi comité revisor, el Dr. Víctor M. Loyola Vargas (CICY), el Dr. Martín Esqueda Valle (CIAD), el Dr. José Antonio Guerrero Analco (INECOL) y la Dra. Marina Vera Ku (CICY) por su tiempo y esfuerzo en la revisión de mi tesis y las evaluaciones tutorales.

Al técnico del laboratorio de epigenética del CICY, el Ing. Gaspar Eduardo Castillo Castro y al Dr. Juan Luis Monribo Villanueva, técnico académico del laboratorio de química de productos naturales del INECOL, por su invaluable ayuda técnica en los análisis por espectrometría de masas y metabolómica realizados en mi trabajo de tesis.

A la M. en C. Cristina Landa Cansigno, el M. en C. Dennis Adrián Infante Rodríguez y la M. en C. Rosa Angélica Gutiérrez Sánchez, estudiantes del Laboratorio de química de productos naturales de INECOL, por la asesoría proporcionada en el curso de “Introducción al software R aplicado a la investigación en química de productos naturales” que facilitó la interpretación de los resultados de metabolómica.

A todos los miembros del laboratorio de química de productos naturales del INECOL, Epigenética y el Banco de Germoplasma del CICY.

A los integrantes del equipo del laboratorio del Dr. Víctor M. Loyola Vargas y a su técnico M.C. Rosa María Galáz Ávalos por todo su apoyo.

A todos mis compañeros del CICY y de otras instituciones que me brindaron su apoyo académico.

Al los Proyectos CONACyT CB-2016 285898 y Cátedra Moshinsky 2017 por el financiamiento otorgado para la realización de mi tesis.

Al CONACyT por la beca otorgada No. 714916

Al INECOL-Clúster BioMimic® por el acceso a sus instalaciones.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. por las instalaciones prestadas.

DEDICATORIAS

A mi gran familia, que son todos mis amigos y a la persona que aun sin conocernos me ha dado toda la motivación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	
ABSTRACT.....	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	3
1.1. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	3
1.2. VARIACIÓN SOMACLONAL.....	4
1.3. CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN AGAVE.....	5
1.4. METABOLITOS EN AGAVES.....	5
1.5 METABOLISMO DE PLANTAS ALBINAS	11
1.6 CIENCIAS “ÓMICAS” EN SISTEMAS BIOLÓGICOS DE PLANTAS	13
1.7 METABOLÓMICA DE PLANTAS	15
1.8 JUSTIFICACIÓN.....	17
1.9 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
1.10 OBJETIVO GENERAL.....	18
1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
CAPÍTULO II. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN <i>A. angustifolia</i> POR HPTLC.....	20
2.1 INTRODUCCIÓN	20

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.2.1 MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN METANÓLICA	21
2.2.2 EXTRACCIONES LÍQUIDO-LÍQUIDO (PARTICIONES)	21
2.2.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL HPTLC	22
2.3 RESULTADOS	22
2.3.1 PARTICIÓN HEXÁNICA DE LOS EXTRACTOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	23
2.3.2 PARTICIÓN DICLOROMETÁNICA DE LOS EXTRACTOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	26
2.3.3 FRACCIÓN CON ACETATO DE ETILO DE LOS EXTRACTOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	27
2.3.4 FRACCIÓN ACUOSA DE LOS EXTRACTOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	30
2.4 DISCUSIÓN	32
CAPÍTULO III. METABOLÓMICA NO DIRIGIDA DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN <i>A. angustifolia</i> BASADA EN UPLC-MS-QTOF	34
3.1 INTRODUCCIÓN	34
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.2.1 MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN METANÓLICA	36
3.2.2 ANÁLISIS DE DATOS	37
3.3 RESULTADOS	37
3.3.1 EXTRACCIÓN METANÓLICA Y OBTENCIÓN DE LOS DATOS METABÓLICOS DE CADA FENOTIPO DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	37
3.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL METABOLOMA DE LOS TRES FENOTIPOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	38

3.3.3 COMPARACIONES Y ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE RUTAS DE LOS TRES FENOTIPOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	44
3.4 DISCUSIÓN	50
CAPITULO IV. METABOLÓMICA DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES	53
4.1 INTRODUCCIÓN	53
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
4.2.1 MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN METANÓLICA	54
4.2.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	55
4.2.3 ANÁLISIS DE DATOS	56
4.3 RESULTADOS	56
4.3.1 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS TRES FENOTIPOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	56
4.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CANTIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS CUANTIFICADOS EN LOS TRES FENOTIPOS DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	59
4.3.3 ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE LA FLAVONA, EL FLAVONOL Y LOS FENILPROPANOIDES EN CADA FENOTIPO DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i>	60
4.4 DISCUSIÓN	66
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFÍA	69
Anexo	84

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Variantes somaclonales de <i>Agave angustifolia</i> Haw	2
Figura 1.1 Cultivo de tejidos vegetales	3
Figura 1.2 Técnicas utilizadas en metabolómica	16
Figura 1.3 Estrategia experimental	19
Figura 2.1 HPTLC de la partición hexánica iluminados con diferentes tipos de luz de los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A)	24
Figura 2.2 Placas de la parte hexánica reveladas con DPPH, ácido fosfomolibdico y <i>p</i> -anisaldehído	25
Figura 2.3 HPTLC de la partición diclorometánica bajo diferentes tipos de luz de los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A)	26
Figura 2.4 Placas con los compuestos extraídos de la partición diclorometánica con DPPH, y revelados con ácido fosfomolibdico y anisaldehído	27
Figura 2.5 HPTLC de los compuestos presentes en la partición con acetato de etilo analizado con diferentes tipos de luz	28
Figura 2.6 Análisis de los compuestos presentes en la partición de acetato de etilo con DPPH, ácido fosfomolibdico y anisaldehído	29
Figura 2.7 HPTLC de los compuestos presentes en la partición acuosa revelados con diferentes tipos de luz	30
Figura 2.8 Revelados de los compuestos presentes en la partición acuosa con DPPH, ácido fosfomolibdico y anisaldehído	31
Figura 3.1 Muestras representativas de los extractos de hoja y meristemo de cada fenotipo. Verde (G), variegado (V) y albino (A)	38

Figura 3.2 Cromatogramas representativos de los extractos en hoja y meristemo de cada fenotipo	39
Figura 3.3 Diagrama de Venn de las relaciones m/z en hoja y meristemo de cada fenotipo	40
Figura 3.4 Análisis de varianza (ANOVA) de las m/z en los modos de ionización positivo y negativo de los tres fenotipos	41
Figura 3.5 Análisis de componentes principales (PCA) de las m/z en los modos de ionización positivo y negativo de los tres fenotipos	42
Figura 3.6 Mapas de calor y dendogramas de las m/z en los modos de ionización positivo y negativo de los tres fenotipos	44
Figura 3.7 Compuestos tentativos de la ruta de biosíntesis de flavonoides en hoja y meristemo de los tres fenotipos	48
Figura 3.8 Compuestos tentativos de la ruta de biosíntesis de flavona y flavonol en hoja y meristemo de los tres fenotipos	50
Figura 4.1 Análisis de varianza (ANOVA) de los compuestos fenólicos en hoja y meristemo de los tres fenotipos	60
Figura 4.2 Análisis de componentes Principales (PCA) de los compuestos fenólicos en hoja y meristemo de los tres fenotipos	62
Figura 4.3 Mapa de calor de los compuestos fenólicos en hoja y meristemo de los tres fenotipos	63
Figura 4.4 Análisis de correlación de los compuestos fenólicos en hoja y meristemo de los tres fenotipos	64
Figura 4.5 Compuestos de la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides identificados y cuantificados en hoja y meristemo de los tres fenotipos	65

Figura 4.6 Compuestos de la ruta de biosíntesis de flavona y flavonol 66
identificados y cuantificados en hoja y meristemo de los tres fenotipos

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Compuestos químicos reportados en el género <i>Agave</i> en la última década	6
Cuadro 2.1 Fases móviles utilizadas para correr las placas de HPTLC con los extractos de los tres fenotipos	22
Cuadro 2.2 Rendimientos de los extractos de cada fenotipo	23
Cuadro 2.3 Rendimientos de las particiones de cada extracto	23
Cuadro 3.1 Resumen de los análisis de comparación y enriquecimiento de rutas de los tres fenotipos	46
Cuadro 4.1 Perfil del gradiente de elución para la fase móvil de las muestras de los tres fenotipos en el UPLC-MS-QqQ	56
Cuadro 4.2 Condiciones del equipo de UPLC-MS-QqQ para la inyección de las muestras de los tres fenotipos	57
Cuadro 4.3 Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos de la hoja de los tres fenotipos	58
Cuadro 4.4 Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos del meristemo de los tres fenotipos	59

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
3GT	Enzima 3-O-glucosiltransferasa
6-BAP	6-benciladenina
A	Fenotipo albino
AH	Hojas del fenotipo albino
AM	Meristemo del fenotipo albino
ANOVA	Análisis de varianza
BF	Biosíntesis de flavonoides
BFF	Biosíntesis de flavona y flavonol
BFP	Biosíntesis de fenilpropanoides
CE	Electroforesis capilar (por sus siglas en inglés)
CE-MS	Electroforesis capilar acoplada a espectrómetro de masas (por sus siglas en inglés)
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés)
dsDNA	ADN de cadena doble (por sus siglas en inglés)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EROs	Especies reactivas de oxígeno
G	Fenotipo verde

GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (por sus siglas en inglés)
GH	Hojas del fenotipo verde
GM	Meristemo del fenotipo verde
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)
HPTLC	Cromatografía en capa delgada de alta resolución (por sus siglas en inglés)
LC	Cromatografía de líquidos (por sus siglas en inglés)
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)
m/z	Relación masa-carga
MS	Medio Murashige y Skoog
PCA	Análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés)
POR	Protoclorofilida oxidoreductasa
RF	Factor de retención (por sus siglas en inglés)
RMN	Resonancia magnética nuclear
TLC	Cromatografía en capa delgada (por sus siglas en inglés)
UPLC-MS/MS	Cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución acoplado a espectro de masas en tándem (por sus siglas en inglés)
UPLC-MS-QqQ.	Cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectro de masas triple cuadrupolo (por sus siglas en inglés)

UPLC-MS-QTOF	Cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
UV	Radiación ultravioleta
V	Fenotipo variegado
VH	Hojas del fenotipo variegado
VM	Meristemo del fenotipo variegado
VS	Variación somaclonal

RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica que ha permitido un mejor desarrollo en el cultivo de plantas del género *Agave*, entre otras. Algunas especies de gran importancia económica que han sido propagadas con estas herramientas son: *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. fourcroydes*; las dos primeras son utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas y la última para la obtención de fibras. Durante la micropropagación de *A. angustifolia*, se generó una variante somaclonal (VS) dando como resultado un fenotipo variegado (V) y otro albino (A). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que estos fenotipos presentan diferencias fisiológicas, moleculares y epigenéticas. Para entender mejor sus diferencias, el objetivo de este trabajo fue comparar los metabolomas de los tres fenotipos de esta especie. En el segundo capítulo de esta tesis se presenta el perfil metabólico utilizando cromatografía en capa delgada de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés) en los tres fenotipos: verde (G), variegado (V) y albino (A). En el tercer capítulo, se muestran los resultados del análisis comparativo por metabolómica no dirigida empleando cromatografía de ultra alta resolución acoplada a espectrómetro de masas de alta resolución del tipo cuadrupolo y tiempo de vuelo (UPLC-HRMS-QTOF, por sus siglas en inglés) de los tres fenotipos. Finalmente, en el capítulo IV, se presenta la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos de los tres fenotipos utilizando cromatografía de alto rendimiento acoplada a espectro de masa triple cuádruplo (UPLC-MS-QqQ por sus siglas en inglés). Los principales resultados que se obtuvieron fueron una notable actividad antioxidante en los tres fenotipos, en especial el fenotipo A, observándose que las rutas de biosíntesis de los fenilpropanoides (BFP), los flavonoides (BF), las flavonas y los flavonoles (BFF) se encuentran activas en los tres fenotipos. Sin embargo, se determinó una mayor concentración de los compuestos en la hoja del fenotipo G, mientras que la hoja del fenotipo A presenta una disminución en la concentración de los compuestos glicosilados, a diferencia del meristemo, en el cual las rutas se encuentran sin cambio en los tres fenotipos. Por lo que se concluye que la ruta de BFF en las hojas del fenotipo A tiene una disminución en los compuestos glucosilados como kaempferol y quercetina.

ABSTRACT

Plant tissue culture (PTC) is a biotechnological tool that has allowed a better development in the culture of *Agave* genus, among others. Some species of economic importance that have been propagated with these tools are: *A. tequilana*, *A. angustifolia* and *A. fourcroydes*; the first two are used to make alcoholic beverages and the last one to obtain fibers. During the micropropagation of *A. angustifolia*, a somaclonal variation (SV) was generated, resulting in a variegated (V) and an albino (A) phenotypes. Previous studies carried out at our laboratory have shown that these phenotypes present physiological, molecular and epigenetic differences. In order to have a better understanding about their metabolomic differences, the aim of this work was to compare the metabolomes of the three somaclonal variants of this species. In the second chapter of this dissertation, the metabolic profile of the three phenotypes: green (G), variegated (V) and albino (A), is presented using High-resolution Thin Layer Chromatography (HPTLC). In the third chapter, the results of comparative analysis by non-targeted metabolomics are shown using High Performance Chromatography coupled to Quadrupole Mass Spectrum Time of Flight (UPLC-MS-QTOF) from the three phenotypes. Finally, in Chapter IV, the identification and quantification of phenolic compounds of the three phenotypes is presented using High Performance Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrum (UPLC-MS-QqQ). The main results that were obtained here were related to a remarkable antioxidant activity of the three phenotypes, especially the A phenotype. Observing that, the biosynthetic pathways of phenylpropanoids (BFP), flavonoids (BF), flavones and flavonols (BFF) are active in the three phenotypes. However, the higher concentration of the compounds was determined in the G phenotype leaf, while the A phenotype leaf showed a decrease in the concentration of the glycosylated compounds, unlike the meristem in which the pathways were intact in the three phenotypes. Therefore, it is concluded that the BFF pathway in A phenotype leaves had a decrease in glycosylated compounds such as kaempferol and quercetin.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica que ha permitido mejorar el cultivo de plantas del género *Agave*. Algunas de las especies de agave de gran importancia económica que han sido propagadas utilizando técnicas de CTV son *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. fourcroydes*, las cuales son utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas, las dos primeras, y la última, para la obtención de fibras (Gentry, 1982).

La mayor parte de los trabajos realizados utilizando CTV en *Agave* han sido con la finalidad de generar bancos de germoplasma y la micropropagación de especies elite con fines comerciales. Estas plantas son producidas por organogénesis o por embriogénesis somática tanto directa como indirecta (Monja-Mio, 2013; Robert *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 1987). Por otro lado, el CTV también es utilizado para la determinación de rutas biosintéticas usando aproximaciones metabolómicas como la espectrometría de masas (MS) acoplada a cromatografía de gases (GC) o líquidos (LC) (Ferdausi *et al.*, 2020).

La metabolómica, hoy en día, juega un papel importante en el estudio de las plantas y su uso en la biotecnología. Las plantas producen una gran variedad de productos químicos dependiendo de la especie, y en el caso de las plantas cultivadas *in vitro* del medio de cultivo. El análisis masivo de estos productos puede ayudar a sentar la bases de futuros estudios enfocados en su aprovechamiento con distintos fines dependiendo de su naturaleza (Ferdausi *et al.*, 2020; Saito y Matsuda, 2010).

En el género *Agave* se encuentran diversos compuestos, entre los que destacan los triterpenos, esteroides, taninos, cumarinas volátiles, flavonoides y azúcares reductores (Ahumada-Santos *et al.*, 2013), estos compuestos tienen una variada actividad biológica; por ejemplo, se ha observado que la actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria de los extractos de *A. tequilana* puede ayudar a reducir los niveles de proteinuria en ratones hembra (Gutiérrez Nava *et al.*, 2017). Otro ejemplo es la actividad antioxidante, se ha demostrado que los fenoles y los flavonoides en *A. angustifolia* y *A. sisalana* son una fuente potencial de antioxidantes que pueden utilizarse para la prevención de los daños provocados por el estrés oxidativo y el envejecimiento (Barreto *et al.*, 2020; Ibarra-Cantún *et al.*, 2020).

La concentración de algunos de estos compuestos de la familia de los fenoles, y los flavonoides, se ve afectada en plantas con fenotipos albinos como en el caso de *Camellia sinesis*, la cual cambia sus estrategias de respuesta al estrés y altera el patrón metabólico de la L-teanina y las catequinas. Esto se debe a que el albinismo afecta su equilibrio metabólico mejorando el metabolismo del nitrógeno y reduciendo la capacidad fotosintética (el metabolismo del carbono), lo cual puede producir una fotoinhibición y acumulación de especies reactivas de oxígeno (Dong *et al.*, 2018; C. Zhang *et al.*, 2020a).

Durante la micropropagación de *A. angustifolia* en nuestro laboratorio, se generó una variante somaclonal dando como resultado dos fenotipos, uno variegado y otro albino a partir del fenotipo original verde. Estos fenotipos presentan diferencias fisiológicas, moleculares y epigenéticas (Duarte-Aké *et al.*, 2016; Hernández-Castellano *et al.*, 2020; Us-Camas *et al.*, 2017). Por lo que, para entender mejor las diferencias entre los fenotipos, en este trabajo utilizamos análisis metabolómicos para determinar el patrón de los diferentes compuestos presentes en los tres fenotipos. Para ello comparamos los metabolomas de los tres fenotipos de *A. angustifolia*, verde, variegado y albino (**Figura 1**) y proponemos un modelo de estudio para el análisis de los metabolitos únicos de las plantas albinas.



Figura 1. Variantes somaclonales de *Agave angustifolia* Haw. Hojas y meristemos de los fenotipos verde, variegado y albino utilizados para los análisis metabolómicos.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es en conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta (células, tejidos u organismos) bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Loyola-Vargas *et al.*, 2008; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2012; 2018). En el CTV se pueden utilizar estructuras organizadas como meristemos, ápices, nodos, raíces, anteras y embriones. También puede llevarse a cabo con estructuras desorganizadas como callos, suspensiones celulares, y protoplastos (Klerk *et al.*, 2007) (**Figura 1.1**).

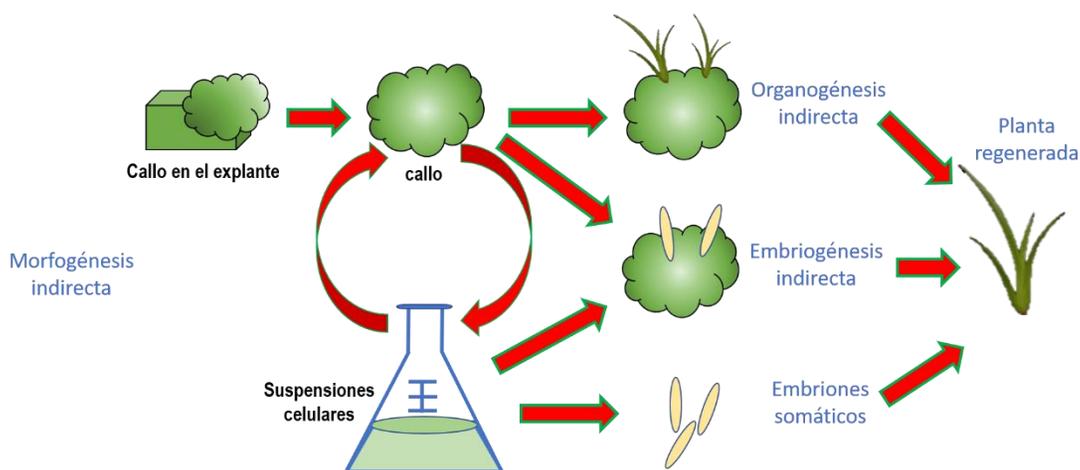


Figura 1.1 Cultivo de tejidos vegetales (CTV). Métodos de micropropagación por morfogénesis indirecta (modificado de Klerk *et al.*, 2007).

El principio biológico en que se basa esta herramienta es la totipotencia de las células vegetales, la cual se define como la capacidad de las células para dividirse y diferenciarse en cualquier tipo celular lo que permite desarrollar una planta completa (Potrykus, 2015). Las plantas pueden regenerarse en dos fases consecutivas, la fase de dediferenciación y la fase de inducción, ambas moduladas mediante reguladores del crecimiento (De Klerk *et al.*, 1997). Las aplicaciones del CTV son, la producción masiva de plantas, producción de plantas libres de virus, rescate de plantas en peligro de extinción, conservación de germoplasma, producción de plantas transgénicas, producción de metabolitos secundarios y estudios de ciencia básica. (Víctor Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

1.2. VARIACIÓN SOMACLONAL

Los cultivos de células y tejidos pueden conducir a variaciones en la secuencia del DNA, a alteraciones en el patrón de metilación, a la activación de transposones lo que lleva al fenómeno de la variación somaclonal (VS) (Azizi *et al.*, 2020). La VS es la diferencia fenotípica de los rasgos cuantitativos y cualitativos que ocurre entre las plantas regeneradas de cualquier tipo de cultivo de tejido (Larkin y Scowcroft, 1981). Esto podría deberse a la variación preexistente o inducida en algunos cultivos (Karp, 1995). La cantidad de variaciones que pueden ser esperadas cambia de acuerdo a la clona, genotipo, nivel de ploidia, naturaleza del explante, el número de subcultivos, edad de las plantas y el precondicionamiento del tejido (Veilleux y Johnson, 1998). La VS también puede ser producida por la presión de selección aplicada a las clonas como el nivel de sal, herbicidas, microorganismos o subproductos y metabolitos específicos (Skirvin *et al.*, 1994).

En la actualidad se estudia la ocurrencia de VS como una herramienta potencial de la biotecnología (Noormohammadi *et al.*, 2020). Entre los estudios que se han realizado sobre la ocurrencia de la VS podemos encontrar el análisis metabólico de la capacidad antioxidante de *Catharanthus roseus* con respecto a su variante somaclonal albina, en la que encontraron que los extractos (hechos con metanol al 80%) de la planta verde tienen los niveles más altos de fenoles y flavonoides con respecto a los extractos de brotes y callos con VS, también, los extractos de brotes verdes exhibieron la mejor capacidad de captación de radicales libres (Lee *et al.*, 2020).

Por otro lado, durante la micropropagación en *A. angustifolia* Haw. se generaron fortuitamente dos variantes somaclonales a partir de las plántulas verdes, el fenotipo variegado (V) y el fenotipo albino (A) (Duarte-Aké *et al.*, 2016). Entre los fenotipos de *A. angustifolia* se han observado cambios en los patrones de metilación, además el fenotipo albino carece de cloroplastos, por lo tanto de actividad fotosintética, también presenta un desarrollo epidérmico irregular y anomalías en el sistema estomático, lo que se ve reflejado en el intercambio de gases y la transpiración, todos estos cambios terminan afectando el metabolismo de las plantas albinas de *A. angustifolia* las cuales han mostrado bajos niveles de los transcritos implicados en las rutas de carotenoides y fotosíntesis (Hernández-Castellano *et al.*, 2020; Us-Camas *et al.*, 2017).

1.3. CULTIVO *in vitro* EN *Agave*

Varios de los trabajos realizados con *Agave* en CTV han sido con la finalidad de generar bancos de germoplasma y la micropropagación de especies elite comerciales. Estas plantas son producidas principalmente por organogénesis (formación de un primordio unipolar, ya sea apical o radical) y embriogénesis somática (formación de embriones sin la unión de gametos) tanto directa como indirecta (Monja, 2013). La embriogénesis somática es un requisito importante para el uso de varias herramientas biotecnológicas en el mejoramiento genético, así como para la propagación masiva de plantas (De-la-Peña *et al.*, 2015; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016; Nic-Can *et al.*, 2015; Santacruz-Ruvalcaba y Portillo, 2009).

Como una estrategia de propagación y conservación de plantas, se han obtenido embriones somáticos de *A. angustifolia* Haw. a partir de ejes embrionarios cigóticos, cultivados en el medio de Murashige y Skoog a 25% de su concentración, suplementado con 6 μM tiamina, 2.5 μM piridoxina, 13.57 μM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 4.4 μM de 6-benciladenina (6-BA) y 60 g L^{-1} de sacarosa. Estos embriones también se han sido utilizados para producir semillas sintéticas, lo cual se lleva a cabo encapsulando los embriones en una matriz de alginato de sodio embebida en un complejo con cloruro de calcio (Arzate-Fernández *et al.*, 2016).

Por otro lado, Robert *et al.*, (1987) reportaron la obtención de callos en *A. fourcroydes* a partir de vástagos en condiciones de oscuridad y raíces en condiciones de luz continua, para la propagación por organogénesis, utilizando como medio de cultivo el medio MS en el cual se había modificado el contenido de nitrógeno inorgánico y adicionado con 2,4-D y BA.

El cultivo *in vitro* ha ayudado a resolver problemas a los que se ha enfrentado el cultivo convencional del *Agave* y al igual que en otras especies vegetales es posible el aprovechamiento del potencial biotecnológico de la VS para realizar análisis fitoquímicos de las variantes somaclonales (Cancino-García *et al.*, 2020; Noormohammadi *et al.*, 2020).

1.4. METABOLITOS EN AGAVES

En *Agave* se encuentran diversos compuestos como triterpenos, esteroides, taninos, cumarinas volátiles, flavonoides, alcaloides y azúcares reductores. Se sabe que los

compuestos como los taninos, flavonoides y saponinas esteroidales tienen actividad biológica (Raji *et al.*, 2019; Ahumada-Santos *et al.*, 2013).

Las saponinas son compuestos que se pueden encontrar en diferentes especies de plantas como los agaves, la característica principal es que su esqueleto proviene del oxidoesqualeno, un precursor de treinta átomos de carbono; estos compuestos pueden presentar residuos de glucosidos (Vincken *et al.*, 2007). Las saponinas se caracterizan por su estructura que contiene un triterpeno o un esteroide aglicona y una o más cadenas de azúcares, tienen aplicaciones como agentes antifúngicos, antibacterianos, anticancerígenos, adyuvantes y actividad antihemolítica, entre otras propiedades (Guclu-Ustundag y Mazza, 2007).

También existen estudios enfocados en la caracterización de fructanos de *A. fourcroydes* con potencial prebiótico, los cuales pueden ser utilizados como alimento para animales. Los fructanos de *A. fourcroydes* se consideran candidatos a prebióticos por ser buenos sustratos para las bacterias ácido-lácticas beneficiosas (García-Curbelo *et al.*, 2016).

En un estudio realizado en Sinaloa, México por Ahumada-Santos *et al.*, (2013) en diferentes especies de *Agave* se determinó que *A. ornithobroma* es una de las especies con mayor diversidad de fitoquímicos reportados, sin embargo, *A. tequilana* y *A. rzedowskiana* presentaron mayor actividad antibacterial y mayor actividad antioxidante, respectivamente. Por otro lado, los taninos y los flavonoides determinados en los extractos orgánicos de estas especies de *Agave* poseen actividad antioxidante, antitumoral y antibacterial contra *Streptococcus* grupo A-4, *Salmonella enterica typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* 25922 y A011, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Enterococcus faecalis* 29212, *Staphylococcus aureus* 3 y 29213, además, se han determinado algunas otras actividades como inmunomodulador, antiinflamatorio (Gutiérrez Nava *et al.*, 2017), antifúngico (Santos *et al.*, 2009), y antihipertensivo (Duncan *et al.*, 1999).

En la última década se han identificado compuestos para el género *Agave* mediante análisis cuantitativos y cualitativos (**Cuadro 1.1**), los cuales han permitido conocer mejor su potencial como fuente de fitoquímicos bioactivos de especies como *A. atrovirens* (Olvera-García *et al.*, 2015) o variedades hortícolas con fines ornamentales, como *A. angustifolia* var *marginata* hort. ex Gentry (Pereira *et al.*, 2017).

Cuadro 1.1 Compuestos químicos reportados en el género *Agave* en la última década. Se han reportado 113 compuestos identificados mediante herramientas como UPLC-MS-QTOF y la RMN.

Compuesto	Especie	Cita
(E)-1-Metoximetoxi-1-tetradecano-3-ol	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-tri-O-metil-manitol	<i>A. sisalana</i> <i>A. tequilana</i>	Wang <i>et al.</i> (2014); Mellado-Mojica y López (2012).
1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-glucitol	<i>A. tequilana</i>	Mellado-Mojica y López (2012).
1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-glucitol	<i>A. tequilana</i>	Mellado-Mojica y López (2012).
1, 2, 5, 6-Tetra-O-acetil-(1-deuterio)-3, 4-di-O-metil-hexitol-glucitol	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
1, 2, 5, 6-Tetra-O-acetil-(1-deuterio)-3, 4-di-O-metil-hexitol-manitol	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
1, 5-Di-O-acetil-2, 3, 4, 6-tetra-O-metil-glucitol	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metil-hexitol	<i>A. sisalana</i> <i>A. tequilana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014); Mellado-Mojica y López (2012);
10,18-Bisnorabieta-5,7,9(10),11,13-pentaeno	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
10,18-Bisnorabieta-8,11,13-trieno	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
11 α -hidroxidiosgenina	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
1-Ketosa	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
2,5,6-tri-O-acetil-1,3,4-tri-O-metil-manitol	<i>A. tequilana</i> , <i>A. fourcroydes</i>	Mellado-Mojica y López (2012); García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
2,4-Bis(dimetilbencil)-6-t-butilfenol	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
2,5-Ciclohexadieno-1,4-diona	<i>A. angustifolia</i>	Pereira <i>et al.</i> , (2017)
25R-5 α -espirostan-12-ona-3 β -ol-3-O-[[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosido]	<i>A. angustifolia</i>	Hernández-Valle <i>et al.</i> , (2014)
2-furancarboxialdehído,5-(hidroximetil)	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

2-Undecanona	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
3,9-dihidroeucmina	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
3-[O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O]-[O-6-deoxi-α-L-manopiranosil]- (1→4)-β-D-xilopiranosil-(1→2)-O-β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-galactopiranosil)oxi]- (3β,5α,22α,25R)-26-(β-D-glucopiranosiloxi-22-metoxi-furostano	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
3'-deoxisapanona	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
3-dehidro-des-N-26-metil-dihidro-pseudotomatidina	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
5,7-dihidroxi-3-(4'-metoxibencil)-4-chromanona	<i>A. angustifolia</i>	Hernández-Valle <i>et al.</i> , (2014)
5,7-dihidroxi-7-flavona	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014));
5α-hidroxi-6β-metil tigogenina	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
7-hidroxi-3-(4-hidroxibencil) cromano	<i>A. angustifolia</i>	Hernández-Valle <i>et al.</i> , (2014)
7-hidroxi-4'-metoxihomoisoflavona	<i>A. atrovirens</i>	Cerda (2011)
7-O-metilleucomol	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
Ácido 1,2-bencenodicarboxílico	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Ácido 9-octadecanoico	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Ácido ascórbico		Santos-Zea <i>et al.</i> , (2012)
Ácido benzoico	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Ácido deshidroabiético	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Ácido gálico	<i>A. atrovirens</i>	Cerda (2011)
Ácido hexadecanoico	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Ácido hexadecenoico	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Ácido linoleico	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Ácido málico-1-metil éster	<i>A. atrovirens</i> , <i>A. sisalana</i>	Cerda (2011); Wang <i>et al.</i> (2014)
Ácido octadecanoico	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Ácido octadecatrienoico	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Ácido palmítico	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

Ácido tetracosanoico	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012) Santos-Zea <i>et al.</i> , (2012)
Ácido γ -aminobutírico (GABA)		
Agavina	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
Arabinosa	<i>A. durangensis</i> , <i>A. wocomahi</i> , <i>A. shrevei</i> , <i>A. atrovirens</i> <i>A. salmiana</i>	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> (2009); Cerde (2011); Puente-Garza <i>et al.</i> (2018)
Benzotiazol	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Cantalasaponina-1 o [(25R)-5 α - espirostan-3 β ,6 α ,23 α -triol-3,6- di-O- β -D-glucopiranosido]	<i>A. americana</i>	Monterrosas-Brisson <i>et al.</i> (2013).
Cetopentanososa	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
D-fructofuranosa	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
Dihidro-bonducelina	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O- metil-D-glucitol	<i>A. tequilana</i> , <i>A. fourcroydes</i>	Mellado-Mojica y López (2012); García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O- metil-D-manitol	<i>A. tequilana</i> , <i>A. fourcroydes</i>	Mellado-Mojica y López, (2012) García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
Diosgenina	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Dognósidos	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
Dotriacontano	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Eicosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Espirostan-3-ona,(5 α ,25R)	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Fenol, 2(1-1- dimetiletil)-4-(1- metil-1-feniletil)	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Fenol, 2,4,6-tris(1-metil-1- feniletil)	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Fenol, 2,6-bis(1-1- dimetiletil)-4- (1-metil-1-feniletil)	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Fenol,2,4-bis(1-metil-1-feniletil)	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Fitano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Fitosteril glucósido	<i>A. angustifolia</i>	Hernández-Valle <i>et al.</i> , (2014)
Flavona	<i>A. atrovirens</i>	Cerde (2011)
Flavonol	<i>A. atrovirens</i>	Cerde (2011)
Flavonona	<i>A. atrovirens</i>	Cerde (2011)

Fructosa	<i>A. cantala</i> , <i>A. americana</i> , <i>A. sisilana</i> , <i>A. tequilana</i> , <i>A. angustifolia</i>	Monterrosas-Brisson <i>et al.</i> (2013)
Gitogenina	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Glucosa	<i>A. atrovirens</i>	Cerda (2011)
Glucósido de clorogenina 1	<i>A. salmiana</i>	Monterrosas-Brisson <i>et al.</i> (2013); Puente-Garza <i>et al.</i> (2018)
Glucósido de hecogenina 1	<i>A. salmiana</i> , <i>A. sisalana</i>	Puente-Garza <i>et al.</i> (2018); Tewari <i>et al.</i> (2014)
Glucósido de hecogenina 2	<i>A. salmiana</i> , <i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014) Puente-Garza <i>et al.</i> (2018)
Glucósido de tigogenina	<i>A. salmiana</i> , <i>A. americana</i>	Monterrosas-Brisson <i>et al.</i> (2013); Puente-Garza <i>et al.</i> (2018)
Heneicosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Hentricontano	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Heptacosano	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Hidroxitolueno butilado	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Homoisoflavonoide	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
Icosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Inulobiosa	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
Isoflavona	<i>A. atrovirens</i>	Cerda (2011)
Kaempferol	<i>A. salmiana</i> , <i>A. durangensis</i> , <i>A. wocomahi</i> , <i>A. shrevei</i> , <i>A. atrovirens</i>	Almaraz-Abarca <i>et al.</i> (2009); Puente-Garza <i>et al.</i> (2018)
Kaempferol 3-(2G-glucosilrutinosido-	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
Kaempferol 3-rutinosil 4'-glucósido	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
Licogenina	<i>A. sisalana</i>	Tewari <i>et al.</i> (2014)
Miricetina-3-O-ramnósido	<i>A. atrovirens</i> , <i>durangensis</i>	Cerda (2011); Almaraz-Abarca <i>et al.</i> (2009).
Mono-2-etilhexil ftalato	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Docosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Neokestosa	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
Neotigogenina	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Heptadecano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Hexacosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Hexadecano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)

Nistosa	<i>A. fourcroydes</i>	García-Curbelo <i>et al.</i> (2015)
n-Octacosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Octadecano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Nonacosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Nonacosano	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
Nonadecano	<i>A. atrovirens,</i> <i>A. attenuata</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015), Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Pentadecano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Triacontano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
n-Undecano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Pentacosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Quercetina	<i>A. salmiana,</i> <i>A. durangensis,</i> <i>A. wocomahi</i> <i>A. shrevei,</i> <i>A. atrovirens</i>	Puente-Garza <i>et al.</i> (2018); Almaraz-Abarca <i>et al.</i> , (2009)
Riboflavina	<i>A. sisalana</i>	Santos-Zea <i>et al.</i> , (2012)
Sarsapogenina	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> , (2012)
Tetracosano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Tetradecano	<i>A. attenuata</i>	Rizwan <i>et al.</i> (2012)
Tiamina	<i>A. attenuata</i>	Santos-Zea <i>et al.</i> , (2012)
Tigogenina	<i>A. sisalana</i>	Wang <i>et al.</i> (2014)
Tricosano	<i>A. atrovirens</i>	Olvera-García <i>et al.</i> (2015)
β Sitosterol β-d-glucósido	<i>A. angustifolia</i>	López-Salazar <i>et al.</i> (2019)
β-sitosterol-3-O-β-D-glucósido	<i>A. mapisaga</i>	Santos-Zea <i>et al.</i> , (2012)

1.5 METABOLISMO DE PLANTAS ALBINAS

El albinismo es una variación poco común en el reino vegetal y se han reportado mutantes albinos de *Arabidopsis*, maíz, arroz, planta de té, etc. El albinismo en las plantas puede ser causado por uno o más factores, entre los que destacan el ambiente, el genotipo, el equilibrio hormonal, incompatibilidad del genoma nuclear y plastídico, eliminaciones de ADN plastídico y alteraciones en la biosíntesis de clorofila (Cai *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2018; Ruf *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020a).

Para la mayoría de los cultivos, el fenotipo albino tiene efectos indeseables dado que presentan bajo rendimiento e infertilidad debido al deterioro de los órganos fotosintéticos y al desequilibrio del metabolismo del carbono y el nitrógeno (Abbo *et al.*, 2003). Sin embargo, el caso de la planta de té es distinto, ya que el fenotipo albino posee características

metabólicas de calidad que están relacionadas positivamente con beneficios a la salud humana y la medicina (Zhang *et al.*, 2020a).

Los metabolitos más característicos de la planta de té albina son la L-teanina y el ácido glutámico, los cuales se encuentran en concentraciones de casi el doble con respecto a la planta de fenotipo verde. De hecho, el ingreso por plantar el fenotipo albino es diez veces superior que el de plantar el fenotipo verde (Cheng *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018).

En la planta de té albina se ven alterados mecanismos metabólicos como la respuesta a especies reactivas de oxígeno (EROs) (Dong *et al.*, 2018). En primer lugar, fortalece la actividad enzimática antioxidante de la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa para proteger la membrana citoplasmática y mejorar la capacidad de defenderse del estrés abiótico (Dong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017b). En segundo lugar, la planta de té convierte la violaxantina en zeaxantina lo que aumenta significativamente el contenido de zeaxantina para proteger a la planta de la fotoinhibición, además de que participa en la disipación térmica del exceso de energía absorbida de la luz (Du *et al.*, 2009). En tercer lugar, la planta de té acumula niveles más altos de dihidroxi-flavonoides, principalmente galato de catequina, (-)-epicatequina, quercetina y glicósidos de quercetina, que juegan un papel vital en la protección de las plantas contra el exceso de radiación UV-B o la radiación solar (Zhang *et al.*, 2017b).

La principal característica de los fenotipos albinos es la ausencia de pigmentos fotosintéticos en distintos niveles (Zhang *et al.*, 2020). La biosíntesis de clorofila es un proceso bioquímico complejo catalizado por múltiples enzimas, y la sustancia inicial es el ácido glutámico o el alfa-cetoglutarato (Fromme *et al.*, 2003). Sin embargo, altos niveles de glutamato y una regulación positiva de la glutamil-tARN sintetasa a nivel de genes y proteínas no aumentó el contenido de clorofila, lo que sugiere que pueden existir múltiples genes involucrados en el primer paso de la síntesis de clorofila (Feng *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016).

Un paso importante en la ruta de síntesis de la clorofila es la conversión de protoclorofilida en clorofilida catalizada por la NADPH-protoclorofilida oxidoreductasa (POR), siendo la única reacción que requiere luz (Griffiths, 1978). Se han identificado tres genes *POR* (*PORA*, *PORB*, *PORC*) en *Arabidopsis* (Armstrong *et al.*, 1995) y dos (*PORA*, *PORB*) en arroz (Chen *et al.*, 2013). Cuando disminuye la expresión de los genes que codifican para estas proteínas se produce una disminución en el contenido de clorofila, mientras que si se

encuentran sobreexpresados muestran mayor tolerancia al daño fotooxidativo (Dong *et al.*, 2018; Oosawa *et al.*, 2000; Sakuraba *et al.*, 2013). Además, se propone que la proteína PORA existe para establecer la estructura cristalina del etioplasto prolamelar (Blomqvist *et al.*, 2008) y que no solo funciona como una enzima catalítica sino que también actúa como una enzima que protege la clorofila. Se ha demostrado que en plántulas etioladas de cebada la descomposición de la proteína PORA bajo la luz es para formar la membrana tilacoidal rápidamente y favorecer el reverdecimiento (Reinbothe *et al.*, 1995). Por lo tanto, la baja expresión de *PORA* puede estar entre los contribuyentes a la estructura anormal del cloroplasto con tilacoides poco desarrollados y grana desorganizada. En el caso de las plantas albinas de té el cambio en los cloroplastos es lo que afecta el metabolismo de carbono y nitrógeno (Zhang *et al.*, 2020a).

Existen especies como *C. roseus* en la que los efectos de la multiplicación de brotes albinos han recibido poca atención. Hace unos meses se documentó la detección simultánea de fitoquímicos importantes, como alcaloides y fenólicos en cultivos de callos y brotes de *C. roseus* con albinismo, en los que las mejores propiedades antioxidantes se obtuvieron en los brotes verdes, seguido de los extractos de los brotes albinos, callos y otras variantes somaclonales (Lee *et al.*, 2020).

Los estudios sobre las propiedades antioxidantes de *C. roseus* han arrojado resultados variables; por ejemplo, Moon *et al.*, (2018) reportaron que la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los cultivos de células en suspensión de *C. roseus* aumentaron debido a la exposición de estos a irradiaciones de luz UV. Por otro lado, Pham *et al.*, (2018) descubrieron que la actividad biológica observada de los extractos de tallo de *C. roseus* dependían en gran medida de los disolventes utilizados, lo que sugiere que se trata de diferentes compuestos.

1.6 CIENCIAS “ÓMICAS” EN SISTEMAS BIOLÓGICOS DE PLANTAS

Para poder comprender los diferentes niveles de organización en las funciones celulares (NOFC) se requiere un enfoque integrador con experimentos que proporcionen información masiva, denominado como datos “ómicos”, que incluyen genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica (Fukushima *et al.*, 2009).

Tradicionalmente, el análisis de datos ómicos se ha llevado a cabo en un solo NOFC, en el que no se ha considerado el análisis de los datos en conjunto. Por ejemplo, el rápido

progreso en la genómica está permitiendo realizar comparaciones estructurales y funcionales detalladas de genes involucrados en diversos procesos biológicos entre diferentes especies de plantas, como *Arabidopsis* y arroz, lo que ha generado el surgimiento de nuevos estudios de genómica comparativa (Shimamoto y Kyojuka, 2002; Wu *et al.*, 2019). Aunque la genómica brinda una visión del acervo genético de las especies y nos permite entender la variación genotípica, solo explica uno de NOFC celular, por lo que para explicar un nuevo nivel se requiere de la transcriptómica.

La transcriptómica se utiliza para hacer estudios puntuales de los genes que se expresan en cierto momento y bajo ciertas condiciones específicas, como la exposición a condiciones ambientales desfavorables a las que las plantas deben responder rápidamente para mantener su homeostasis (Solano-De La Cruz *et al.*, 2019). En la literatura se pueden encontrar una gran cantidad de análisis transcriptómicos, un ejemplo en *Erigeron canadensis* revela una rápida respuesta fotosintética y hormonal a la aplicación de un herbicida de naturaleza auxínica (McCauley *et al.*, 2020). Otro ejemplo, es el estudio de la interacción planta-patógeno entre la vainilla y *Fusarium oxysporum* en el que se encontró la acumulación de transcritos relacionados con la traducción en plantas de vainilla tras los primeros estadios de la infección (Cánovas *et al.*, 2004; Solano-De La Cruz *et al.*, 2019). Sin embargo, para conocer si realmente esos genes sobreexpresados se traducen en proteínas es necesario profundizar a nivel de la proteómica.

La proteómica se está convirtiendo en una poderosa herramienta para la caracterización funcional de plantas modelo y especies de cultivos, gracias a la disponibilidad de secuencias de nucleótidos y al progreso logrado en la identificación de proteínas por espectrometría de masas (Cánovas *et al.*, 2004). La "proteómica de precisión" a gran escala, basada en la espectrometría de masas, ahora permite la caracterización de eventos de señalización en todo el genoma a nivel de modificaciones postraduccionales, interacciones proteína-proteína y cambios en la abundancia de las proteínas. Además, se pueden realizar análisis de enzimas en conjunto con datos metabolómicos para el estudio de rutas metabólicas (Frukh *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2019). Por ejemplo, un reciente estudio proteómico en la planta de té reveló que los niveles de flavonoides son inversamente proporcionales a la madurez de la hoja y que la yema contenía la más baja actividad de fotosíntesis y fijación de carbono, pero la mayor capacidad de biosíntesis de flavonoides en comparación a la hoja madura, particularmente por el alto nivel de proteínas relacionadas con el ácido shikímico y los flavonoides (Wu *et al.*, 2019).

1.7 METABOLÓMICA DE PLANTAS

La metabolómica, hoy en día, juega un papel importante en el estudio fundamental de las plantas y la biotecnología, ya que las plantas producen colectivamente una gran variedad de productos químicos con múltiples funciones, mucho más de lo que producen la mayoría de otros organismos; por lo tanto, la metabolómica es de gran importancia en la biología vegetal (Saito y Matsuda, 2010).

Para los análisis metabólicos se utilizan distintas técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) o las de separación acopladas a un espectrómetro de masas – la electroforesis capilar (CE-MS), la cromatografía de gases (GC-MS) y de líquidos (LC-MS) – estas últimas dos son las más adecuadas para la cuantificación e identificación de un importante número de compuestos químicos (Feng *et al.*, 2020; De Vos *et al.*, 2007; Weckwerth, 2003).

La RMN no es destructiva lo que permite a la muestra seguir con su análisis, también, brinda información estructural y funcional importante de los metabolomas, lo que permite entender los procesos biológicos en los que están involucrados el conjunto de metabolomas analizados, sin embargo, una de sus principales limitaciones es su baja sensibilidad lo que la hace inapropiada para el análisis de un gran número de metabolitos, sobretodo los presentes en concentraciones traza (Zhang *et al.*, 2012).

El método GC-MS es una técnica por elección de las más usadas para el análisis de moléculas orgánicas pequeñas y volátiles como bencenos, alcoholes y aromáticos, así como moléculas simples como esteroides, ácidos grasos y hormonas. Por otro lado, el LC-MS es un método que no requiere que los compuestos sean volátiles y en general, los extractos crudos obtenidos por extracción simple y procedimientos de purificación parcial se reservan para análisis LC-MS ya que la separación por HPLC o UPLC permite analizar compuestos por su polaridad por lo que junto con las nuevas tecnologías de ionización suave hace más robusto este tipo de análisis (Abdelhafez *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2020; Matsuda *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

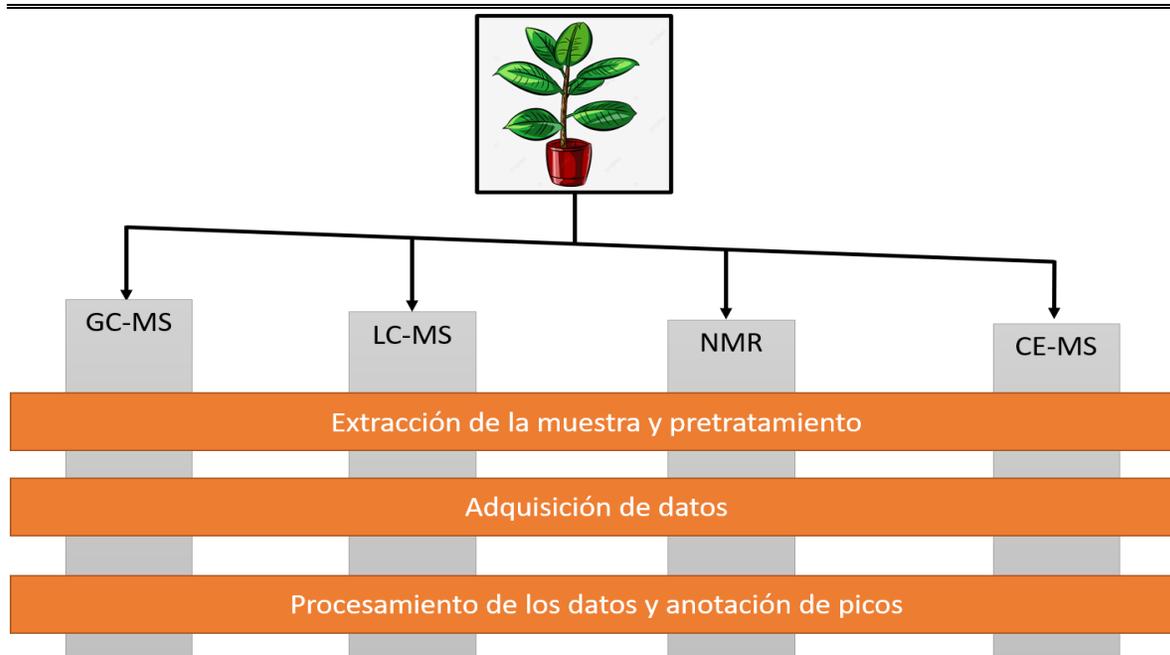


Figura 2.2 Técnicas utilizadas en metabolómica. Se muestran las diferentes técnicas con los equipos más utilizados y los pasos representativos en la generación de datos metabolómicos. Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS), cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS), resonancia magnética nuclear (NMR) y electroforesis capilar acoplada a espectrómetro de masas (CE-MS).

Sin embargo, aunque se han realizado mejoras sustanciales en el campo de la metabolómica, la anotación uniforme de metabolitos en bases de datos a través de los esfuerzos de estandarización internacional sigue siendo un desafío y hasta ahora las plataformas basadas en MS son las más utilizadas en la metabolómica vegetal (Arkorful *et al.*, 2020; Boonchaisri *et al.*, 2020; Saito y Matsuda, 2010).

Basados en LC-MS, se han identificado en plantas de té un total de 130 metabolitos significativos, y de éstos, 103 mostraron una abundancia claramente aumentada en el fenotipo amarillo, especialmente nucleótidos y aminoácidos así como sus derivados y flavonoides (Wang *et al.*, 2020).

Por otro lado, en los tallos y raíces de *C. roseus* se ha podido identificar marcadores químicos relacionados con la expresión final del color de la flor, mediante el análisis del perfil metabólico de las hojas. Los resultados mostraron que el color de la flor se caracteriza por un patrón de metabolitos, por ejemplo, tallo y hojas de flores naranja = kaempferol;

hojas, tallos y flores de color rosa y púrpura = sacarosa, glucosa, 2,3 -ácido dihidroxibenzoico; flores y hojas rojas = ácido málico, ácido fumárico y asparagina (Pan *et al.*, 2016).

Un ejemplo en la metabolómica de plantas con H-NMR es la identificación de metabolitos antihelmínticos de *Lysiloma latisiliquum*, aunque ya se conocía su actividad antiparasitaria se desconocían los metabolitos asociados a dicha actividad, por lo que con NMR se pudieron identificar señales de metabolitos glucosilados de quercetina y arbutina, sin la necesidad de estudios fitoquímicos previos (Hernández-Bolio *et al.*, 2018).

También existen análisis combinados, por ejemplo UPLC-MS/MS y RNA-seq en *Hydrangea macrophylla* variegada reveló cambios metabólicos que involucran múltiples vías en el tejido de la hoja albina, centradas en el ciclo de Krebs, debido a que la zona albina de las hojas se volvió más delgada, la estructura del cloroplasto desapareció, una gran cantidad de leucoplastos reemplazó a los cloroplastos (Li *et al.*, 2020).

Un ejemplo más de análisis combinados es la metabolómica basada en LC-MS junto con análisis proteómicos que se realizó en cultivos embriogénicos y no embriogénicos de aguacate criollo y Hass, en los que se observaron la vía fenilpropanoide más activa en los cultivos embriogénicos en comparación con los no embriogénicos y una mejora para la producción de los componentes básicos de la lignina y los flavonoides, los cuales juegan un papel en el refuerzo de la pared celular para tolerar la respuesta al estrés (Olivares-García *et al.*, 2020).

Actualmente, los análisis masivos de datos han hecho importantes contribuciones al campo de la metabolómica de plantas y se presenta como una herramienta para biotecnología, gracias a ello se han podido conocer metabolitos de las plantas albinas que pueden ser de beneficio para el hombre, tanto económicamente como en el campo de la salud, sin embargo, aún falta profundizar en el conocimiento del metabolismo de las plantas albinas.

1.8 JUSTIFICACIÓN

En diferentes especies de *Agave* se han hecho extractos que tienen actividades de interés biotecnológico, como agentes inmunomoduladores (Chen *et al.*, 2009), antifúngicos (Verastegui *et al.*, 2008), antiinflamatorios (Da Silva *et al.*, 2002), antiparasitarios (Orestes *et al.*, 2008) y con actividad antihipertensiva (Duncan *et al.*, 1999). Tan sólo en la última

década se han reportado 113 compuestos del género *Agave*, y en la actualidad la metabolómica juega un papel importante en el estudio de estas plantas con potencial biotecnológico.

Durante la micropropagación de *A. angustifolia* Haw. se generaron dos fenotipos diferentes al verde (G): variegado (V) y albino (A). Estas plantas presentan diferencias fisiológicas, moleculares y epigenéticas (Duarte-Aké *et al.*, 2016; Hernández-Castellano *et al.*, 2020; Us-Camas *et al.*, 2017). Para la mayoría de los cultivos, el fenotipo albino tiene efectos indeseables dado que presentan bajo rendimiento e infertilidad debido al deterioro de los órganos fotosintéticos y al desequilibrio del metabolismo del carbono y el nitrógeno (Abbo *et al.*, 2003). Sin embargo, se sabe que existen especies como *C. sinesnis* cuyo fenotipo albino tiene una mayor producción de metabolitos de interés económico y de importancia en el área de la salud.

El análisis comparativo de los metabolomas permitirá profundizar más en las diferencias de compuestos químicos entre cada fenotipo, obteniendo datos masivos de los extractos con la finalidad de conocer mejor el metabolismo de las plantas albinas y sus posibles aplicaciones dentro de la biotecnología. Es por ello, que en este trabajo el objetivo es analizar y comparar los metabolomas de los tres fenotipos de *A. angustifolia*.

1.9 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las diferencias entre los metabolitos de los fenotipos, verde, variegado y albino de *Agave angustifolia* Haw.?

1.10 OBJETIVO GENERAL

Analizar y comparar los metabolomas de los tres fenotipos de *A. angustifolia* Haw.

1.11 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar el perfil cromatográfico de los tres fenotipos de *A. angustifolia*.

Analizar el metaboloma de los tres fenotipos de *A. angustifolia*.

Identificar y cuantificar los compuestos fenólicos de cada fenotipo de *A. angustifolia* Haw.

1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

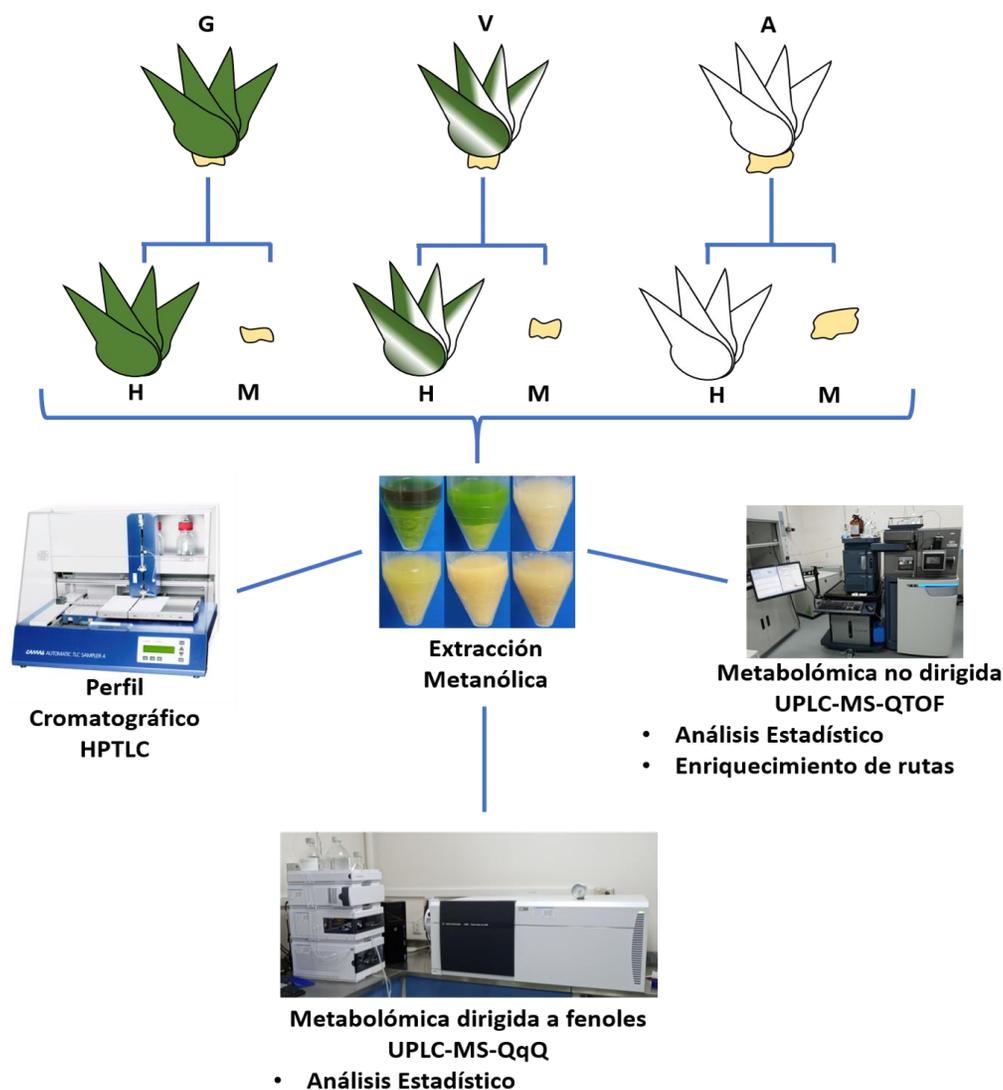


Figura 1.3 Estrategia experimental: se utilizó tejido meristemático (M) y de hoja (H) de cada fenotipo para las extracciones metanólicas. Se analizó el perfil de cada fenotipo para las extracciones metanólicas. Se analizó el perfil de cada fenotipo con cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), el análisis metabolómico no dirigida se realizó por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas tipo cuadrupolo y tiempo de vuelo (UPLC-MS-QTOF) y el análisis metabolómico dirigida a fenoles usando cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas tipo triple cuadrupolo (UPLC-MS-QqQ). G: plántula de fenotipo verde; V: plántula de fenotipo variegado; A: plántula de fenotipo albino.

**CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS
PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC**

2.1 INTRODUCCIÓN

La cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) es un método que puede usarse para detectar sustancias, es tan simple de usar como la cromatografía en capa delgada (TLC) estándar, pero tiene muchas más ventajas como por ejemplo ser más sensible, mayor capacidad para el procesamiento de muestras, menor tiempo de análisis y menor cantidad de solventes utilizados (Arup *et al.*, 1993).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) suele ser un método de elección para estudios de perfiles fitoquímicos. Sin embargo, con el desarrollo de capas adsorbentes de alto rendimiento e instrumentación sofisticada para la aplicación de muestras, el desarrollo de cromatogramas, la derivatización y la evaluación de cromatogramas, la HPTLC se hizo más popular (Ogegbo *et al.*, 2012; Shewiyo *et al.*, 2012).

La HPTLC combinada con el análisis de imágenes y los métodos de reconocimiento de patrones se han utilizado para generar un perfil fitoquímico y la clasificación de 52 muestras de propóleos colectadas en Serbia y una muestra en Croacia (Ristivojević *et al.*, 2014). También, la técnica de HPTLC ha sido utilizada en plantas medicinales para desarrollar métodos de control de calidad, rápidos, sensibles y reproducibles, analizando varios extractos a la vez. Sin embargo, actualmente se utiliza en conjunto con otros métodos de análisis para hacer estudios más robustos de fitoquímica (Bajaj *et al.*, 2018).

Este tipo de técnicas ya se han utilizado en *A. angustifolia* para caracterizar y cuantificar β -sitosterol- β -d-glucósido extraído de la piña de este agave. En primer lugar, utilizaron la HPTLC para identificar el metabolito con un estándar lo que les permitió cuantificarlo. En segundo lugar, utilizaron espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier para identificar los grupos funcionales. Por último, se utilizó un análisis con HPLC-ESI-MS (López-Salazar *et al.*, 2019).

Las técnicas de HPTLC son complementarias para la caracterización de los perfiles metabólicos y pueden ser utilizadas para conocer las diferencias en la composición química

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

y actividad antioxidante en las muestras, así como el mejor tipo de solventes para utilizar en la separación y resolución de los metabolitos de los tres fenotipos de *A. angustifolia*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal y extracción metanólica

Se utilizaron plantas de cada uno de los fenotipos (G, V y A) de entre 2.5 y 3 cm de altura cultivadas en el medio de cultivo MSB (**Anexo 1**). Las plántulas se colocaron en tubos de plástico de 15 mL y se congelaron para su posterior liofilización.

Para la extracción se siguió el protocolo reportado por De Vos et al., (2007) con algunas modificaciones. El material vegetal liofilizado fue triturado en morteros de porcelana y se almacenó en tubos de plástico de 50 mL a -20 °C. Posteriormente, se colocaron 3 g de cada muestra en tubos de plástico de 15 mL.

Para la extracción metanólica se utilizó una mezcla de metanol (99.9%) y de ácido fórmico (0.1%) ambos grado HPLC (Sigma Aldrich). A cada muestra se le agregaron 20 mL de la mezcla metanol-fórmico por cada gramo de tejido. Se mezcló bien el tejido con el disolvente y la muestra se colocó en un baño de ultrasonificación (marca Branson 3800) cuatro veces por 15 min cada vez. Entre cada ciclo de ultrasonificación, la muestra se mezcló en un vortex con el fin de homogenizar bien la muestra.

Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min (centrifuga eppendorf 5804 R), se colectó el disolvente y se descartó el precipitado. Los extractos se colocaron en matraces de bola de 250 mL, previamente pesados, y se concentraron en un rotavapor (Büchi R11) a 122 mbar y 40 °C.

2.2.2 Extracciones líquido-líquido (particiones)

Los extractos crudos de los tres fenotipos se resuspendieron en 8 mL de metanol y 8 mL de agua (en una mezcla 1:1 MeOH-H₂O). Posteriormente, se agregaron 48 mL de hexano (tres veces el volumen del extracto crudo) y a continuación la muestra se colocó en un embudo de separación, se agitó hasta tener una mezcla homogénea y se dejó reposar hasta que se formaran dos fases. Se colectó la fase hexánica y se dejó el extracto disuelto en metanol y agua en el embudo; dicho proceso se repitió cuatro veces. El extracto

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

resultante de la partición con hexano se utilizó para hacer la partición con diclorometano y después con acetato de etilo de la misma forma que se realizó con el hexano. Las particiones fueron recolectadas en matraces de bola previamente pesados para llevar a concentrar mediante rotoevaporación a presión reducida (Büchi RII). Los rendimientos se obtuvieron pesando los matraces con el extracto, a excepción de las muestras del extracto crudo, las cuales fueron liofilizadas en tubos de plástico de 15 mL previamente pesados.

2.2.3 Preparación de muestras para el HPTLC

Las muestras se resuspendieron en los mismos disolventes con los que se extrajo cada partición y se colocaron en viales de 1.5 mL. Se utilizó N₂ de alta pureza para aplicar un microlitro de cada extracto (a una concentración de 30 mg mL⁻¹) en las placas de HPTLC (marca Merk, fase normal HPTLC, silica gel 60 F-254), utilizándose diferentes fases móviles (**Cuadro 2.1**) para desarrollar las placas de cada partición. El frente de disolvente fue de 70 mm. Las placas posteriormente fueron reveladas con luz visible, luz UV a 366 y 254 nm, DPPH (0.2%), ácido fosfomolibdico (20 g ácido fosfomolibdico, 2.5 g de sulfato sérico en 500 mL de ácido sulfúrico al 5%) y *p*-anisaldehído.

Cuadro 2.1. Fases móviles utilizadas para correr las placas de HPTLC con los extractos de los tres fenotipos. Disolventes utilizados y sus proporciones para la fase móvil en la TLC, hexano (Hx), acetona (An), diclorometano (CH₂Cl₂), metanol (MeOH), acetato de etilo (AcOEt), etanol (EtOH), butanol (n-BuOH), isopropanol y agua (H₂O).

Partición	Proporción	Disolventes
Hexano	7:3	Hx:An
Diclorometano	9:1:1	CH ₂ Cl ₂ :MeOH:An
Acetato de etilo	7:2:1	AcOEt:EtOH:H ₂ O
Acuoso/metanólico	5:3:2	n-BuOH:isopropanol:H ₂ O

2.3 RESULTADOS

Los rendimientos de los extractos (**Cuadro 2.2**) fueron más altos para las plantas de los fenotipos G y A, mientras que el fenotipo V tuvo hasta un 9% menos, los rendimientos en las particiones (**Cuadro 2.3**) variaron dependiendo del solvente utilizado, siendo la parte acuosa la que tuvo los valores más altos en los tres fenotipos. Por otro lado, los menores rendimientos de los fenotipos G y A se dieron con la partición con diclorometano y para el fenotipo V con la partición con acetato de etilo.

**CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS
PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC**

Cuadro 2.2 Rendimientos de los extractos de cada fenotipo. Se muestran los resultados de peso seco en los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A).

Fenotipo	Peso seco (%)	Extracto (mg)
Verde	31.22	948.2
Variegado	22.89	702.9
Albino	30.19	911.8

Con la partición hexánica, el fenotipo G tuvo el mejor rendimiento seguido del fenotipo V y luego el A. Para la pare de diclorometano, el fenotipo A tuvo el mejor rendimiento seguido por el fenotipo G y luego el V. El rendimiento más alto de la parte de acetato de etilo fue del fenotipo A siendo más del doble que el rendimiento del fenotipo V. Por último, en la parte acuosa el mejor rendimiento fue del fenotipo A seguido por el fenotipo V y finalmente el fonotipo G (**Cuadro 2.3**).

Cuadro 2.3 Rendimientos de las particiones de cada extracto. Se calcularon a partir del peso del extracto de los fenotipos.

Fenotipo	Partición acuosa	Partición hexánica	Partición con diclorometano	Partición con acetato de etilo
Verde	199.4 mg	61.2 mg	44.4 mg	61.6 mg
Variegado	329.1 mg	60 mg	40.5 mg	26.6 mg
Albino	371.6 mg	57 mg	53.6 mg	72.1 mg

2.3.1 Partición hexánica de los extractos de *A. angustifolia*

En la partición hexánica, cuando las placas se visualizaron con luz visible, se observaron bandas asignables a los pigmentos de los fenotipos G y V. Se aprecian bandas de mayor tamaño e intensidad en el fenotipo G en comparación con el V, también pueden observarse bandas con diferente color y el mismo Rf de 0.55 en el fenotipo G (**Figura 2.1 B**).

En el caso de las placas desarrolladas con luz UV a 254 nm (**Figura 2.1 C**) se observó un patrón de bandas similar entre el fenotipo G y el V, también se apreció un compuesto en común entre los tres fenotipos con un Rf de 0.4 (marcado con una flecha), dicho compuesto

**CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS
PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC**

se pudo apreciar de mejor manera en las placas reveladas con ácido fosfomolibdico y con *p*-anisaldehído.

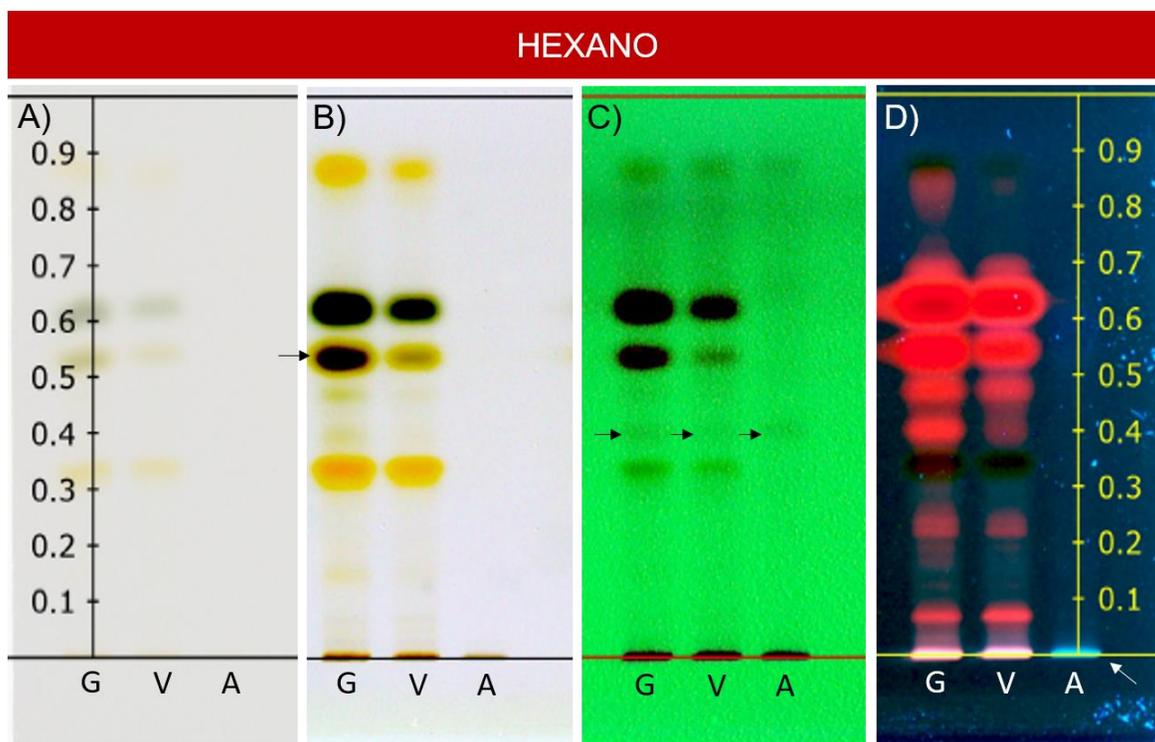


Figura 2.1 HPTLC de la partición hexánica iluminados con diferentes tipos de luz de los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A). A) y B) Placa visualizada con luz visible reflejada y transmitida, respectivamente, con diferentes contrastes; C) Placa visualizada con luz UV 254 nm; D) Placa visualizada con luz UV 366 nm. Sistema de elución 7:3 Hx:An.

Para las placas visualizadas con luz UV a 366 nm, se pudieron observar compuestos con fluorescencia roja y otros compuestos no observados utilizando luz visible, ni luz UV a 254 nm en los fenotipos G y V (**Figura 2.1 D**). Además, se pudo observar un compuesto con fluorescencia azul (marcado con la flecha blanca; **Figura 2.1 D**) en el origen del fenotipo A.

La prueba de actividad antioxidante con el radical DPPH (**Figura 2.2 B**), en la cual se colocaron 5 μ L de vitamina C en la parte superior de la placa como testigo positivo, muestra cinco compuestos (marcados con las flechas negras) con actividad antioxidante en el fenotipo A, mientras que para los fenotipos G y V se pueden visualizar solamente cuatro compuestos con actividad antioxidante con menor intensidad con respecto del fenotipo A.

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS
PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

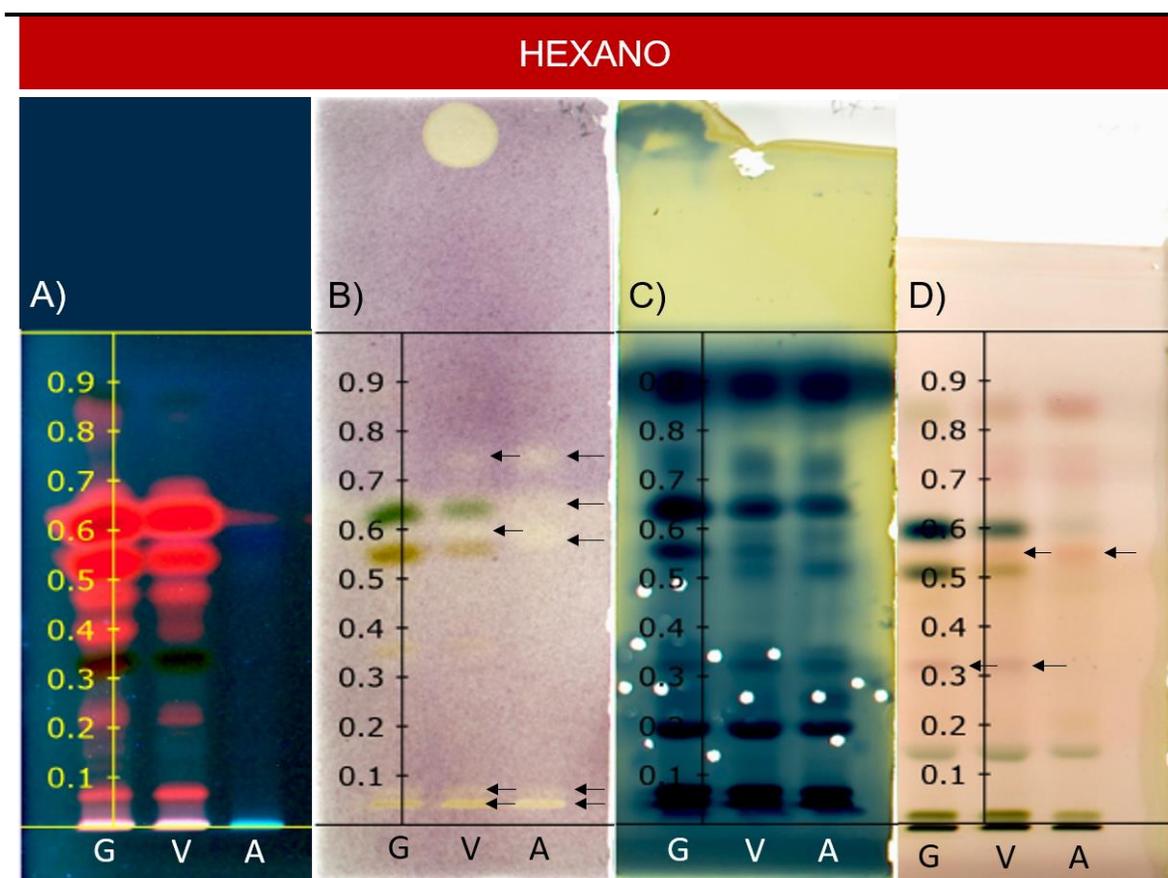


Figura 2.2 Placas de la parte hexánica reveladas con DPPH, ácido fosfomolibdico y *p*-anisaldehído. Actividad antioxidante y azúcares comparados con el revelado de ácido fosfomolibdico bajo luz UV a 366 nm en el fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). A) Placa visualizada con luz UV a 366 nm, B) Placa revelada con DPPH, C) Placa revelada con ácido fosfomolibdico, D) Placa revelada con *p*-anisaldehído. Sistema de elución 7:3 Hx:An.

El ácido fosfomolibdico es un revelador general, que ayuda a observar con mayor nitidez las bandas de los compuestos que se presentan en los revelados con luz visible y luz UV, con lo que se puede apreciar de mejor manera las bandas que tiene la actividad antioxidante (**Figura 2.2 C y B**). Por otro lado, en la placa revelada con *p*-anisaldehído (**Figura 2.2 D**) se pudo observar un patrón característico de cada fenotipo. El fenotipo V comparte una banda con el fenotipo G (flecha negra a un Rf de 0.3, **Figura 2.2 D**) que no se aprecia en el fenotipo A y a su vez el fenotipo V comparte una banda (flecha negra a un Rf de 0.55, **Figura 2.2 D**) con el fenotipo A que no se aprecia en el fenotipo G. Por otro lado, el revelado

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

con *p*-anisaldehído permite dar perspectiva de los compuestos que se mostraron con actividad antioxidante y con el revelado de ácido fosfomolíbico.

2.3.2 Partición diclorometánica de los extractos de *A. angustifolia*

En las muestras particionadas con diclorometano y visualizadas bajo luz visible no se encontraron compuestos (**Figura 2.3 A**). Por otro lado, la visualización con luz UV a 254 nm se observaron pocas bandas no bien definidas (**Figura 2.3 B**), mientras que utilizando la luz UV a 366 nm se pudieron ver un par de bandas de fluorescencia azul compartidas entre los fenotipos A y V, además de un par de bandas con fluorescencia roja compartidas por los fenotipos G y V (**Figura 2.3 C**).

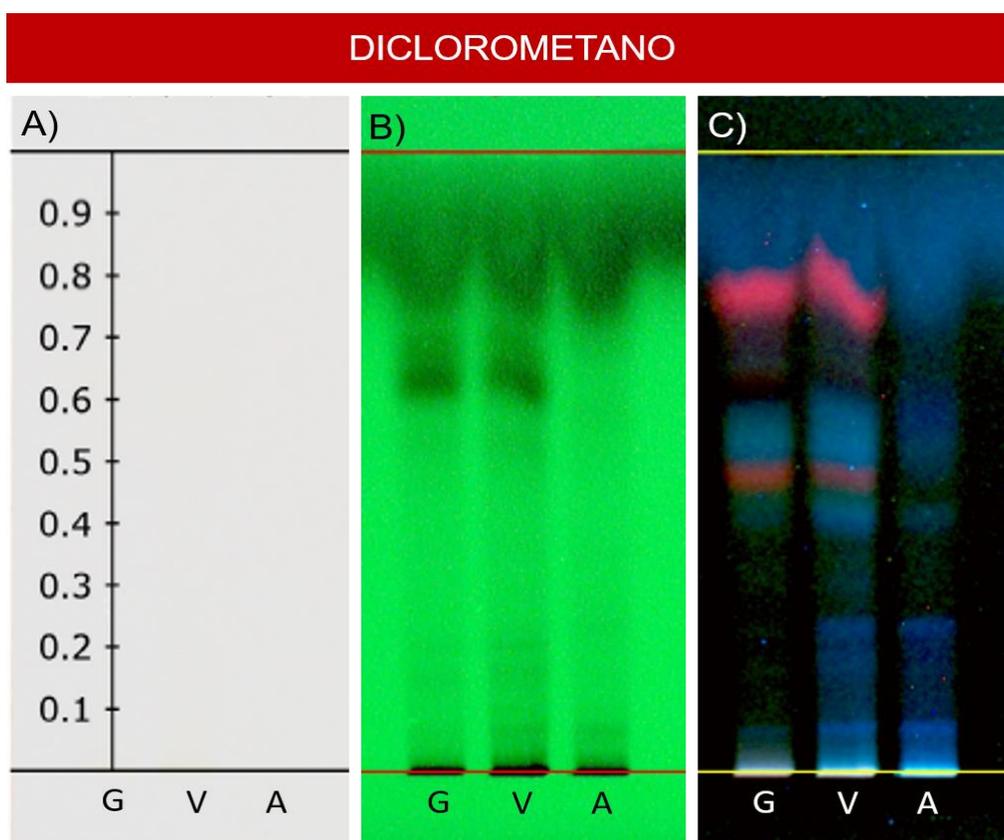


Figura 2.3 HPTLC de la partición diclorometánica bajo diferentes tipos de luz de los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A). A) placa visualizada con luz visible; B) placa visualizada con luz UV 254 nm; C) placa visualizada con luz UV 366 nm. Sistema de elución 9:1:1 CH₂Cl₂:MeOH:An.

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

La prueba de actividad antioxidante permitió observar dos compuestos con un R_f de 0.65 en los fenotipos G y V, y también en el origen de la corrida de los tres fenotipos (**Figura 2.4 B**). Estos compuestos se pueden apreciar mejor en el revelado con ácido fosfomolibdico (**Figura 2.4 C**). La placa revelada con *p*-anisaldehído mostró un compuesto presente en el fenotipo V que no se distingue o estaba muy tenue en los otros dos fenotipos (**Figura 2.4 D**).

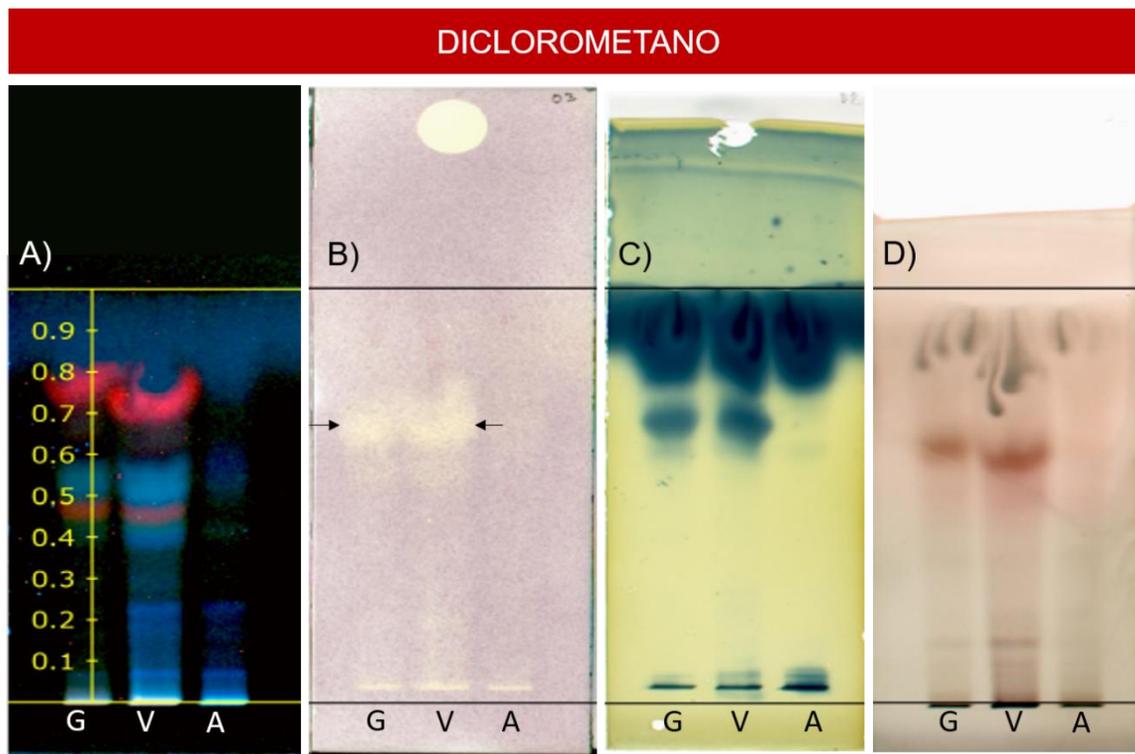


Figura 2.4 Placas con los compuestos extraídos de la partición diclorometánica con DPPH, y revelados con ácido fosfomolibdico y *p*-anisaldehído. Actividad antioxidante y azúcares comparados con el revelado de ácido fosfomolibdico y las muestras visualizadas con luz UV a 366 nm en el fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). A) placa visualizada con luz UV a 366 nm, B) placa revelada con DPPH, C) placa revelada con ácido fosfomolibdico, D) placa revelada con *p*-anisaldehído. Sistema de elución 9:1:1 CH₂Cl₂:MeOH:An.

2.3.3 Fracción con acetato de etilo de los extractos de *A. angustifolia*

Entre los resultados que se obtuvieron de las fracciones con acetato de etilo se pudo observar que en las placas iluminadas con luz visible no mostraron ningún compuesto

**CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS
PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC**

(Figura 2.5 A). Sin embargo, iluminadas con luz UV a 254 nm se encontró un amplio patrón de bandeo en comparación con las particiones antes descritas. Se observó similitud entre los fenotipos G y A, siendo la intensidad y el tamaño de bandas mayor en el fenotipo A (Figura 2.5 B).

Por otra parte, el fenotipo V muestra un patrón con mayor intensidad en sus bandas, entre los Rf de 3 al 5.5, con respecto a los otros fenotipos en el cual las bandas se ven poco definidas debido a su tamaño. Se distinguió también un compuesto en común entre los fenotipos G y V, sin embargo, en el fenotipo V esta banda fue de mayor tamaño (Figura 2.5 B).

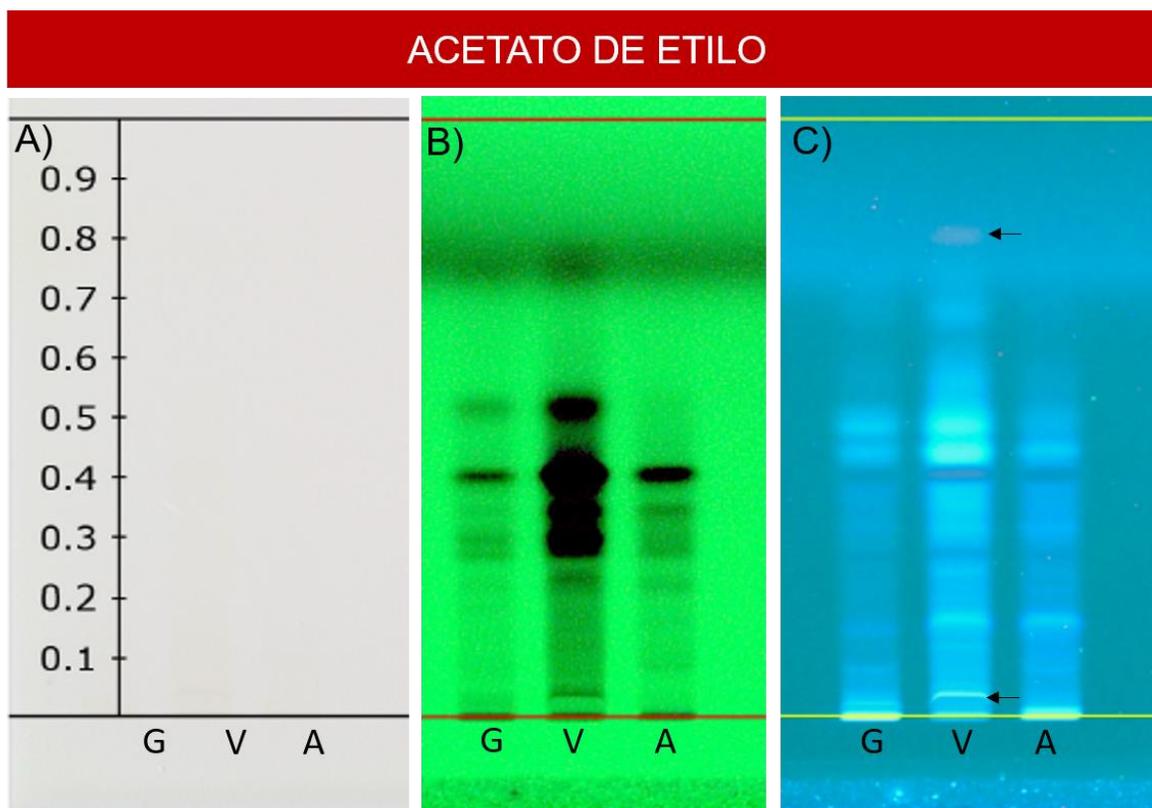


Figura 2.5 HPTLC de los compuestos presentes en la partición con acetato de etilo analizado con diferentes tipos de luz. Patrón cromatográfico visto con diferentes longitudes de onda en el fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). A) placa visualizada con luz visible, B) placa visualizada con luz UV 254 nm, C) placa visualizada con luz UV 366 nm. Sistema de elución 7:2:1 AcOEt:EtOH:H₂O.

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

En las placas analizadas con luz UV a 366 nm se pudieron distinguir patrones de bandeo bien diferenciadas entre cada fenotipo. Para el fenotipo V se pudieron observar dos bandas únicas con un Rf de 0.8 y 0.04 (marcadas con flechas negras, **Figura 2.5 C**).

Por otro lado, en la prueba de actividad antioxidante con DPPH se pudo observar actividad en forma de barrido en los tres fenotipos, siendo el fenotipo G el que menos mostró esta actividad, en tanto que los fenotipos V y A se puede apreciar una banda poco definida a un Rf de 0.45 (**Figura 2.6 B**).

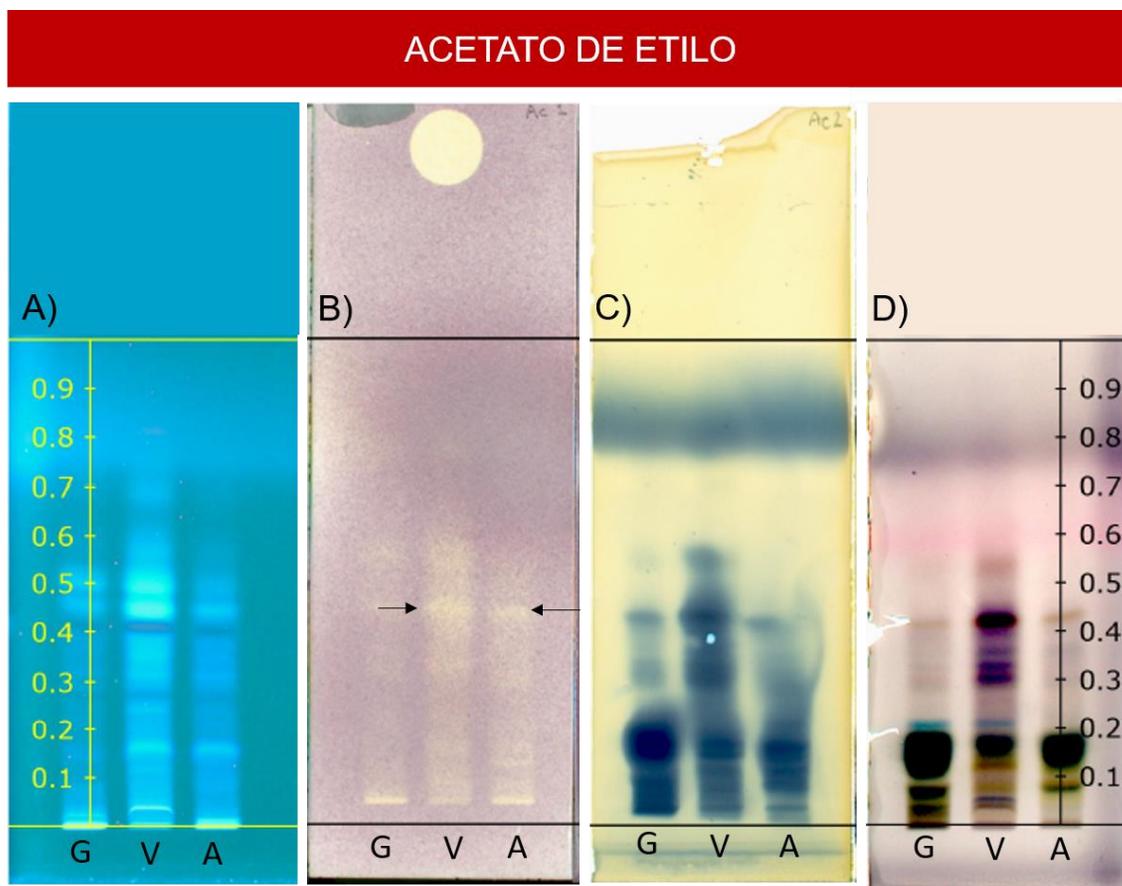


Figura 2.6 Análisis de los compuestos presentes en la partición de acetato de etilo con DPPH, ácido fosfomolibdico y anisaldehído. Actividad antioxidante y azúcares comparado con el revelado con ácido fosfomolibdico y expuestas a la luz UV a 366 nm en el fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). A) placa visualizada con luz UV a 366 nm, B) placa revelada con DPPH, C) placa revelada con ácido fosfomolibdico, D) placa revelada con anisaldehído. Sistema de elución 7:2:1 AcOEt:EtOH:H₂O.

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

La placa revelada con ácido fosfomolibdico tuvo perfiles diferentes en cada fenotipo, con conjuntos de bandas muy cercanas entre sí, las cuales se encontraban desde el origen de corrida hasta el Rf 0.2 (**Figura 2.6 C**). En el fenotipo V, el barrido se extendió hasta el Rf 0.6 y se logró distinguir algunas bandas, mientras que en los otros dos fenotipos esas mismas bandas se observaron más difusas (**Figura 2.6 C**).

El uso del *p*-anisaldehído permitió resolver mejor el patrón de bandeo de cada fenotipo. Se distinguieron 15 bandas para el fenotipo V, 10 para el fenotipo G y nueve para el fenotipo A (**Figura 2.6 D**). Se pudieron apreciar bandas de color verde claro, verde oscuro, azules, moradas y café-marrón, las cuales podrían ser glucósidos con diversas estructuras (**Figura 2.6 D**).

2.3.4 Fracción acuosa de los extractos de *A. angustifolia*

Los compuestos presentes en la parte acuosa y cuya presencia fue revelada con luz visible muestran un patrón de bandas muy tenue. Se aprecian dos bandas para el fenotipo V y tres bandas para el fenotipo A (**Figura 2.7 A**).

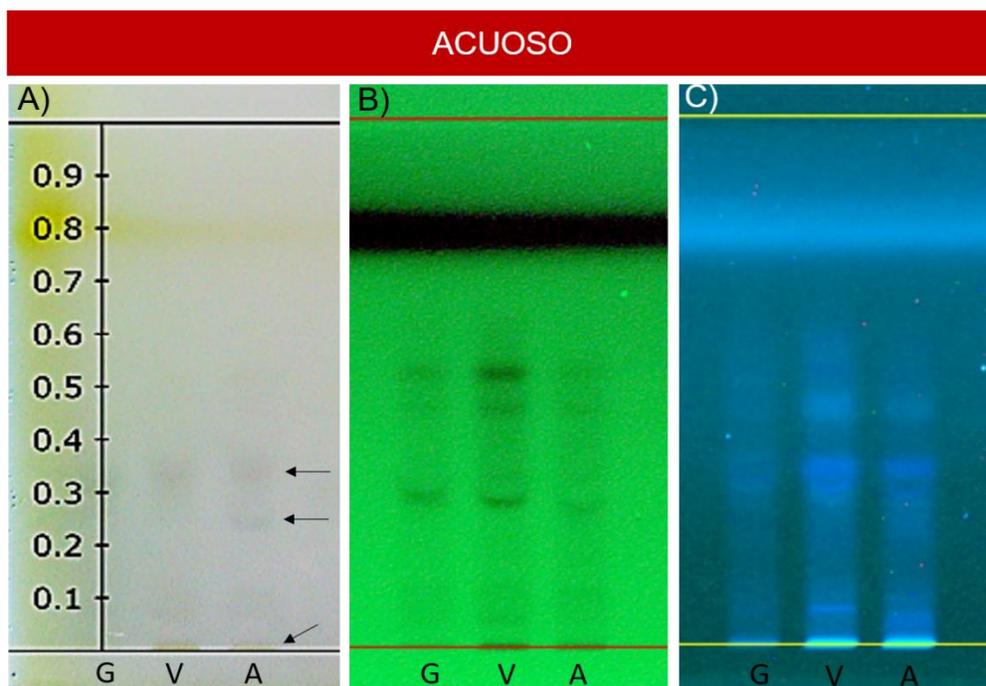


Figura 2.7 HPTLC de los compuestos presentes en la partición acuosa revelados con diferentes tipos de luz. Patrón cromatográfico observado con diferentes

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

longitudes de onda en el fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). A) placa visualizada con luz visible, B) placa visualizada con luz UV a 254 nm, C) placa visualizada con luz UV a 366 nm. Sistema de elución 5:3:2 n-BuOH:isopropanol:H₂O.

Las placas iluminadas con luz UV de 254 nm mostraron tres bandas para cada fenotipo en los R_f de 0.28, 0.45 y 0.52, siendo las bandas del fenotipo V las mejor definidas con respecto a las de los otros fenotipos (**Figura 2.7 B**). Las placas expuestas a la luz UV a 366 nm mostraron una banda única para el fenotipo V a un R_f de 0.08 (**Figura 2.7 C**).

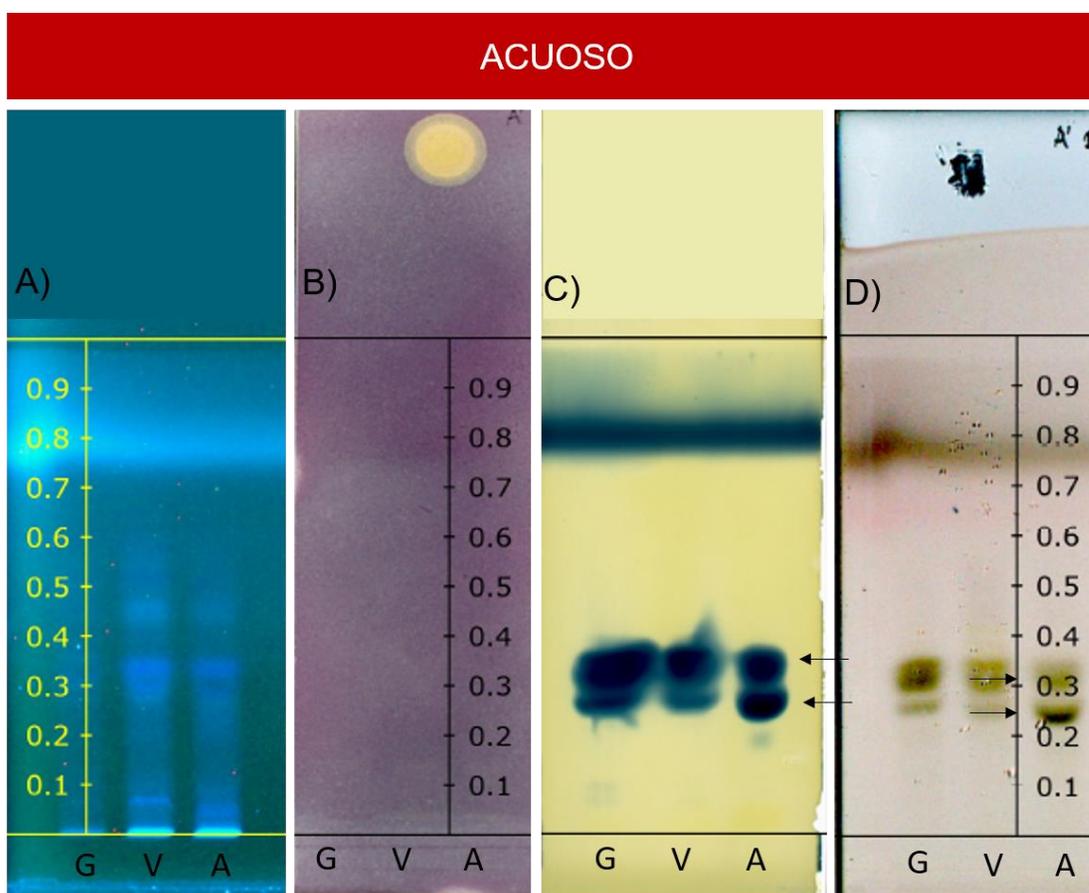


Figura 2.8 Revelados de los compuestos presentes en la partición acuosa con DPPH, ácido fosfomolibdico y anisaldehído. Actividad antioxidante y azúcares revelados con ácido fosfomolibdico y expuestas a luz UV de 366 nm en el fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). A) Placa visualizada con luz UV de 366 nm, B) placa revelada con DPPH, C) placa revelada con ácido fosfomolibdico, D) placa revelada con *p*-anisaldehído. Sistema de elución 5:3:2 n-

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

BuOH:isopropanol:H₂O.

En la prueba de actividad antioxidante de la fracción acuosa no se observó actividad en ninguno de los fenotipos (**Figura 2.8 B**). Por otra parte, con ácido fosfomolibdico se revelaron un par de bandas en cada fenotipo con Rfs de 0.25 y 0.32. La banda que se observó a un Rf de 0.25 fue más abundante en el fenotipo A y más tenue en el fenotipo V mientras que la banda a un Rf 0.32 fue más abundante en el fenotipo G (**Figura 2.8 C**). En el revelado con *p*-anisaldehído se mostraron las mismas bandas que en el ácido fosfomolibdico pero con una coloración verde, posiblemente son glucósidos (**Figura 2.8 D**).

2.4 DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos se pudo detectar actividad antioxidante en los extractos de los tres fenotipos de *A. angustifolia* (**Figuras 2.2 B, 2.4 B y 2.6 B**), la cual ya ha sido reportada que está presente en los extractos de Agave (Ahumada-Santos *et al.*, 2013). Ahumada-Santos *et al.* (2013) determinaron la presencia de esta actividad en seis especies de Agave. La actividad es menor en los extractos de *A. angustifolia* con 6.46 ± 1.24 μ M Trolox/g ms, en comparación con *A. rzedouskiana*, la cual mostró tener una actividad de 27.41 ± 3.35 μ M Trolox/g ms. Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es un análogo de la vitamina E.

Cabe destacar que el estudio de Ahumada-Santos *et al.* (2013) se realizó en plantas de campo y en el fenotipo verde de *A. angustifolia*, mientras que en la presente tesis se detectaron más bandas y con mayor intensidad de la actividad antioxidante en el fenotipo A con respecto al fenotipo G (**Figuras 2.2 B y 2.6 B**). Esto puede deberse a que las plantas albinas se ven afectadas en los mecanismos de ERO's y tienden a acumular niveles más altos de dihidroxi flavonoides (Dong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017b).

Se sabe que la acumulación de moléculas de naturaleza fenólica como los flavonoides está directamente relaciona con propiedades antioxidantes. Estudios recientes en el cultivo *in vitro* de *C. roseus*, en los que se analizaron fitoquímicos como los alcaloides y fenoles, encontraron mejor actividad antioxidante en la planta verde que en la variante somaclonal albina (Lee *et al.*, 2020). Este resultado es diferente al encontrado en la presente tesis con Agave albino, y esto puede deberse a distintos factores como son las condiciones de cultivo y los disolventes de extracción (Moon *et al.*, 2018; Pham *et al.*, 2018).

CAPÍTULO II. PERFILAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN *A. angustifolia* POR HPTLC

En la presente tesis se realizó una extracción con metanol y posterior a eso se hicieron particiones con diferentes disolventes como se muestra en los apartados 2.2.1 y 2.2.2. Se determinó que hay actividad antioxidante en las particiones con hexano, diclorometano y acetato de etilo en los tres fenotipos (**Figuras 2.2 B, 2.4 B y 2.6 B**), siendo la partición con hexano la que mostro mayor número de bandas con actividad antioxidante. Este resultado coincide con los resultados de Ahumada-Santos *et al.* (2013) quienes analizaron los extractos metanólicos y hexánicos de *A. rzedouskiana* cultivado en campo, y determinaron que el extracto hexánico tenía una mayor actividad antioxidante que el extracto metanólico, y mediante un análisis de GS-MS determinaron la presencia de α -tocoferol por lo que se asoció claramente con la actividad antioxidante del extracto de hexano.

Sin embargo, es importante mencionar que los métodos y equipos de extracción fueron distintos. Por ejemplo, Ahumada-Santos *et al.* (2013) realizaron dos extracciones del mismo material vegetal, primero con hexano y luego con metanol en un equipo Soxhlet, mientras que en la presente tesis la extracción se realizó primero con metanol y luego el extracto obtenido se particionó con hexano, esto podría indicar que la naturaleza de la mayoría de los metabolitos con actividad antioxidante en *Agave* es apolar o de baja polaridad. Se determinó que los extractos de los fenotipos de *A. angustifolia* presentan actividad antioxidante en las particiones con hexano, diclorometano y acetato de etilo (**Figuras 2.2 B, 2.4 B y 2.6 B**), esto puede deberse al contenido de compuestos fenólicos y otros como el α -tocofero que las plantas albinas acumulan como protección ante el estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2017b; Dong *et al.*, 2018).

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

3.1 INTRODUCCIÓN

La metabolómica es un área de rápido crecimiento en la ciencias ómicas, que emplea técnicas de química analítica como la cromatografía líquida (LC), la cromatografía de gases (GC), la electroforesis capilar (CE), la espectrometría de masas (MS) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), para identificar en general grandes cantidades de metabolitos con poco material biológico y poder realizar perfiles metabólicos globales (metabolómica no dirigida) o de un grupo en particular de fitoquímicos (metabolómica dirigida) en células, tejidos o biofluidos (Kioroglou *et al.*, 2020; Wishart *et al.*, 2020).

Los estudios de metabolómica dirigida son basados en preguntas de investigación o hipótesis específicas sobre alguna vía o vías metabólicas de interés, a diferencia de la metabolómica no dirigida, la cual tiene como objetivo analizar simultáneamente la mayor cantidad de metabolitos posible por lo que la técnica analítica más utilizada para este tipo de estudios es LC-MS y no se rige bajo hipótesis alguna, en principio todos los metabolitos presentes pueden ser responsables de la propiedad fisiológica de interés (Patti *et al.*, 2012).

Los avances recientes en técnicas analíticas, particularmente LC-MS, generan conjuntos de datos metabolómicos cada vez más grandes y complejos, por lo que es la técnica que ha proporcionado la mayor cantidad de resultados integrales en sistemas biológicos (Karnovsky y Li, 2020; Alseekh y Fernie, 2018). LC-MS nos permiten obtener datos los valores de relación masa/carga (m/z) de los picos de interés (Fernie y Tohge, 2017) y las herramientas de análisis de rutas como el algoritmo Mummichog para metabolómica no dirigida ayudan a ubicar las observaciones experimentales en un contexto biológico (Karnovsky y Li, 2020).

Los enfoques de metabolómica no dirigida actualmente nos permiten hacer comparaciones utilizando estadística multivariada y generar perfiles entre especies utilizando softwares de acceso libre en línea como MetaboAnalyst 4.0. (Chong *et al.*, 2019; Rocchetti *et al.*, 2020). El perfilamiento metabólico ha sido de gran utilidad dentro de los enfoques de biología de sistemas destinados a proporcionar una comprensión más integral de las respuestas de las plantas a las perturbaciones ambientales y genéticas (Saito y Matsuda, 2010).

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

Además, el perfilamiento metabólico se ha utilizado en múltiples estudios destinados a la evaluación de la seguridad de los cultivos genéticamente modificados (Christ *et al.*, 2018; Kuiper *et al.*, 2001). Por ejemplo, para demostrar la similitud sustancial entre las papas convencionales y las papas genéticamente modificadas para producir fructanos, se utilizan perfiles metabólicos (Catchpole *et al.*, 2005). Este mismo acercamiento se ha usado en la cebada transgénica cultivada en el campo en comparación con la cebada de tipo silvestre (Kogel *et al.*, 2010).

En el género *Agave* se han descrito gran variedad de metabolitos y sus distintas actividades biológicas, lo que ha permitido caracterizar las huellas digitales metabólicas de estas plantas utilizando un enfoque metabolómico mediante UPLC-MS; con esto se ha demostrado que uno de los metabolitos clave en la clasificación del género *Agave* son las saponinas esteroidales y sus sapogeninas (El-Hawary *et al.*, 2020).

Actualmente en *A. angustifolia* var. *Marginata* se ha reportado la actividad ulceroprotectora de sus extractos, lo que podría atribuirse a la gran abundancia de diversas saponinas y homoisoflavonoides (El-Hawary *et al.*, 2020). *A. angustifolia* es una especie con seis variedades (Gentry, 1982) y durante su propagación *in vitro* se generó variación somaclonal dando como resultado un fenotipo variegado y uno albino (Duarte-Aké *et al.*, 2016).

Para la mayoría de los cultivos, el fenotipo albino tiene efectos indeseables, como bajo rendimiento e infertilidad, debido al deterioro de los órganos fotosintéticos y al desequilibrio del metabolismo del carbono y del nitrógeno (Abbo *et al.*, 2003). Sin embargo, el caso de la planta albina de té es distinto, ya que este fenotipo posee características metabólicas de calidad que están relacionadas positivamente con la salud humana y la medicina (Zhang *et al.*, 2020a). Los fenotipos albinos pueden tener características metabólicas de gran importancia económica y caracterizar sus metabolomas contribuiría a conocer mejor el metabolismo de las plantas albinas, así como poder identificar marcadores químicos que los diferencien de otros fenotipos, y explorar su potencial biotecnológico y significado biológico.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal y extracción metanólica

Se utilizaron plantas de tres fenotipos de entre 2.5 y 3 cm de altura cultivadas en medio de mantenimiento MSB (**Anexo 1**). De cada fenotipo (G, V y A) se cortó la zona meristemática (M) y las hojas (H), se colocaron en tubos de plástico de 15 mL y se congelaron para su posterior liofilización. Las plantas se procesaron en una campana de flujo laminar.

Para la extracción se siguió el protocolo reportado por De Vos et al., (2007) con algunas modificaciones. El material vegetal liofilizado se trituró en morteros de porcelana y almacenado en tubos de plástico de 50 mL a -20°C. Posteriormente, se pesaron 500 mg de cada muestra y se colocaron en tubos de plástico de 15 mL. Se utilizaron dos réplicas para M y tres réplicas para H de cada fenotipo.

Para la extracción metanólica se utilizó una mezcla de metanol (99.875%) y de ácido fórmico (0.125%) ambas grado espectrómetro de masas marca Sigma Aldrich. A cada muestra se le agregaron 2 mL de metanol-ácido fórmico por cada 100 mg de tejido. Se mezcló bien el tejido con el disolvente y la muestra se colocó en un sonicador marca Branson 3800 cuatro veces por 15 min cada vez. Entre cada sonicación la mezcla se mezcló con un vórtex tres ocasiones por 15 s.

Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm a 4°C durante 10 min en una centrifuga marca eppendorf 5804 R, se tomó el sobrenadante y se descartó el precipitado. Los extractos se colocaron en viales de vidrio previamente pesados y se concentraron en un rotavapor Büchi R11 a 122 mbar y 40°C. Los extractos secos se resuspendieron con metanol-ácido fórmico a una concentración de 80 mg mL⁻¹.

Finalmente, los extractos se filtraron en viales de 1.5 mL con filtros de nylon de 3 mm x 2 µm y, posteriormente se inyectaron 5 µL en el UPLC-MS-QTOF (las muestras M se inyectaron 3 veces mientras que las de H se inyectaron dos veces, en cada uno de los modos de ionización). Se utilizaron dos modos de ionización, positivo y negativo, la ionización se realizó con electrospray (ES+ y ES-). El tiempo de corrida fue de 30 min y el flujo que se usó fue de 0.3 mL min⁻¹. El rango de masa para la búsqueda fue de 50 a 1,200 Da y el límite inferior de intensidad para los análisis fue de 1,000 cuentas.

3.2.2 Análisis de datos

Los datos obtenidos del UPLC-MS-QTOF se procesaron en el programa en línea MetaboAnalyst 4.0. Todos los análisis se realizaron de acuerdo al protocolo reportado por Chong *et al.*, (2019). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA), de componentes principales (PCA), de similitud, comparaciones por pares de cada tejido y fenotipo (M=G-A, G-V, A-V y H=G-A, G-V, A-V) con prueba t, de fold-change, diagramas de volcán y un análisis de enriquecimiento de rutas. Es importante mencionar que para este análisis es necesario tener como mínimo 100 m/z con valor de *P* (por lo que se utilizaron los datos obtenidos de las comparaciones entre fenotipos) y elegir una biblioteca de rutas, debido a que solo se encontraban a disposición las bibliotecas de *Arabidopsis thaliana* y de *Oryza sativa* cultivar japónica en la base de dato en línea KEGG, se decidió usar como base la biblioteca de rutas de *O. sativa* cultivar japónica por ser una monocotiledónea igual que *A. angustifolia*.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción metanólica y obtención de los datos metabólicos de cada fenotipo de *A. angustifolia*

Se obtuvieron en total 15 extractos metanólicos, dos extractos de M y tres de H para cada fenotipo. En la **Figura 3.1** se muestra una representación de estos extractos, los extractos de hoja se observan muy diferentes entre ellos, mientras que los de meristemo se observan muy parecidos. De esos extractos, se obtuvieron 36 réplicas que se inyectaron en el UPLC-MS-QTOF en los dos modos de ionización.

En total se generaron 36 cromatogramas (**Figura 3.2**). por cada modo de ionización y dos tablas de intensidades de picos de las muestras con sus relaciones masa carga (m/z) y su tiempo de retención una para cada modo de ionización, los cromatogramas muestran un patrón similar al que se ve en la imagen de los extractos (**Figura 3.1**) donde los cromatogramas de H en modo de ionización positiva se ven diferentes entre sí, mientras lo de M de ven muy parecidos (**Figura 3.2 A**), por otro lado, los cromatogramas en modo de ionización negativa se aprecian muy diferentes entre sí tanto en H como en M.

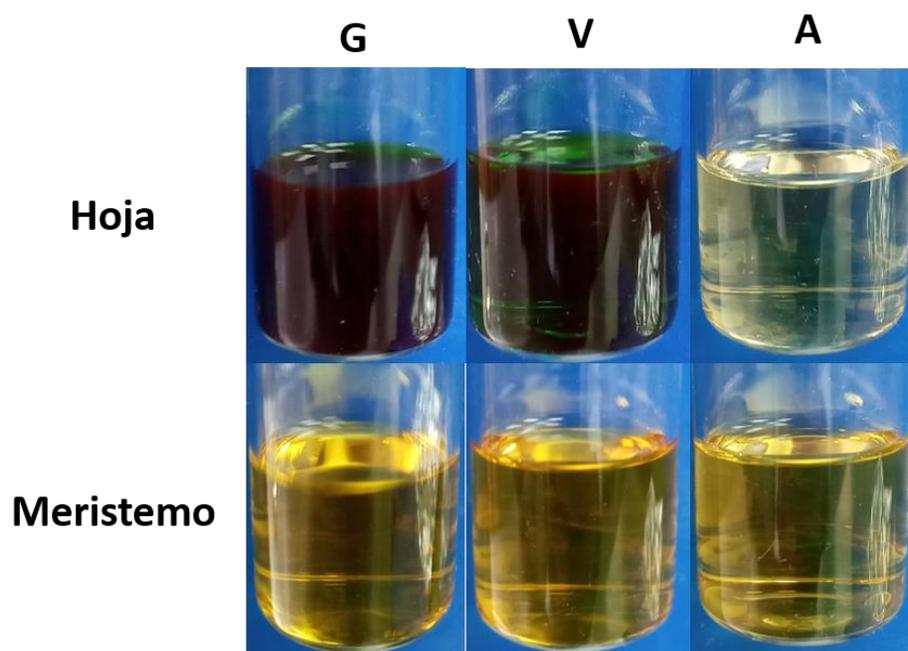


Figura 3.1 Imágenes representativas de los extractos de hoja y meristemo de cada fenotipo. Verde (G), variegado (V) y albino (A). El extracto de la hoja verde se nota con un color verde oscuro, el de hoja variegada un verde claro, mientras el extracto de hoja albina tiene un color transparente amarillento. Los extractos de los meristemos de los tres fenotipos tienen un color amarillo cristalino.

3.3.2 Análisis estadístico del metaboloma de los tres fenotipos de *A. angustifolia*

En total se detectaron 1,137 relaciones m/z en el modo de ionización positivo y 1,931 relaciones m/z en el modo de ionización negativo con sus respectivas intensidades de picos y tiempos de retención, de las cuales en total 488 son únicas del fenotipo A, 353 del fenotipo G y 253 del fenotipo V. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) (**Figura 3.4**). El análisis muestra que para el modo positivo hubo 496 relaciones m/z con diferencia significativa ($P < 0.001$) mientras que para el modo negativo se encontraron 1,194 relaciones m/z con diferencia significativa ($P < 0.05$).

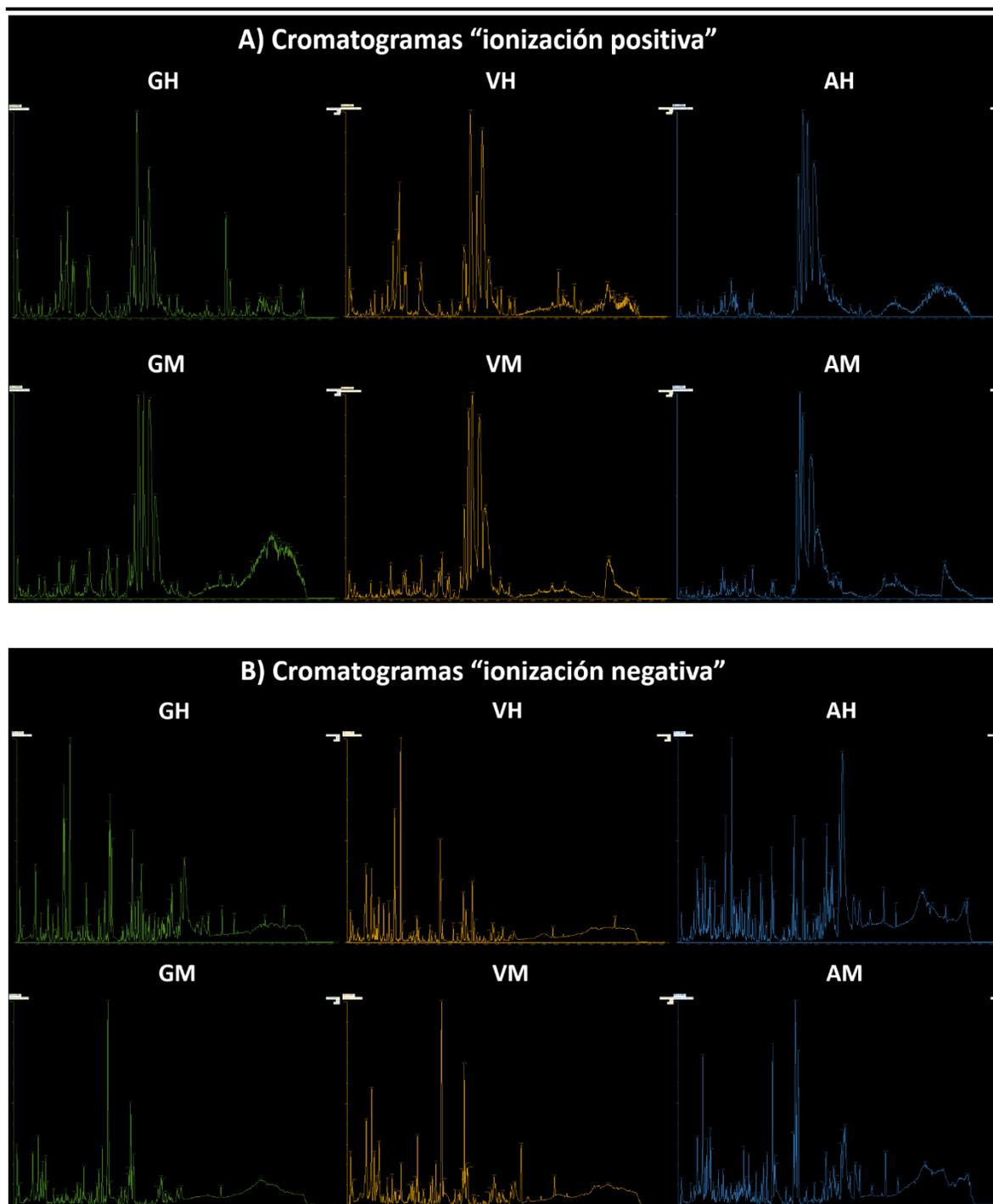


Figura 3.2 Cromatogramas representativos de los extractos de hoja y meristemo de cada fenotipo. A) Comparación de los cromatogramas obtenidos en el modo de ionización positivo de hoja (H) y meristemo (M) para el fenotipo verde (G), variegado (V) and albino (A). B) Comparación de los cromatogramas obtenidos en el modo de ionización negativo de H y M para cada fenotipo.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

Los diagramas de Venn (**Figura 3.3**) mostraron que el fenotipo A tuvo el mayor número de m/z únicos, tanto en hoja como en meristemo, mientras que el fenotipo V tuvo el menor número de m/z tanto en la H como en el M. Por otro lado, los tres fenotipos tuvieron más m/z compartidos en M que en H (**Figura 3.3**).

Las comparaciones entre fenotipos muestran que el fenotipo A tuvo más m/z compartidas con el fenotipo V en M (**Figura 3.3**). Sin embargo, en H la cantidad de m/z del fenotipo A compartidas con G y V fue muy similar teniendo solo una diferencia de dos m/z . Además, los fenotipos G y V tuvieron más m/z compartidos entre ellos que con el fenotipo A tanto en H como en M (**Figura 3.3**).

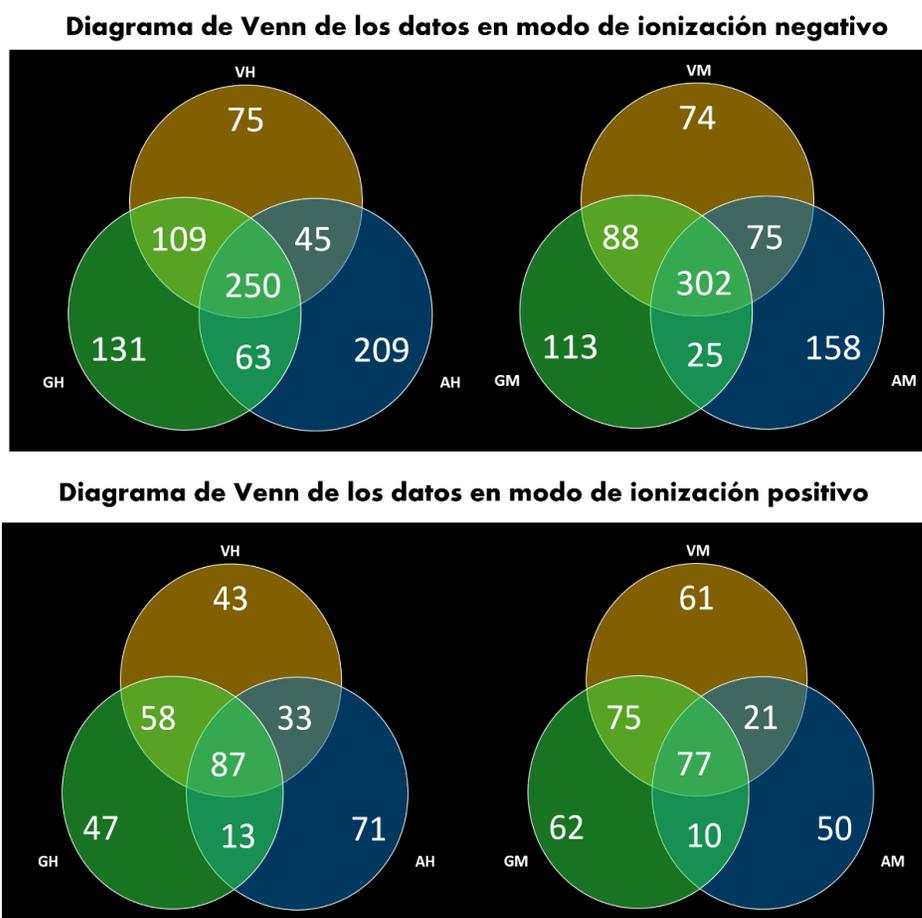


Figura 3.3 Diagramas de Venn de las relaciones m/z en hoja y meristemo de cada fenotipo. Se muestran las m/z compartidas y únicas en hoja (H) y meristemo (M) del fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A) de los datos obtenidos en los modos de ionización negativo y positivo.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

También, se realizó el análisis de componentes principales (PCA) (**Figura 3.5**) con el fin de poder visualizar las agrupaciones entre los conjuntos de datos. Se observó que las muestras se agruparon de acuerdo con el tejido (H o M) y el fenotipo (G, V o A) utilizado. De los primeros dos componentes principales se obtuvieron el mayor porcentaje de la varianza. Los grupos más parecidos fueron AH con AM, VM con GM, y GH con VH en ambos modos de ionización.

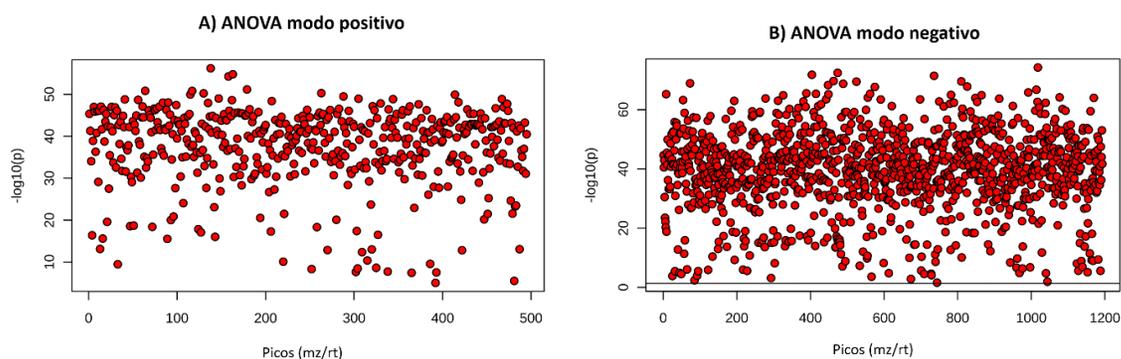


Figura 3.4 Análisis de la varianza (ANOVA) de las m/z en los modos de ionización positivo y negativo de los tres fenotipos. A) Picos importantes seleccionados por ANOVA plot con un valor de $P < 0.001$ en el modo de ionización positivo. B) Picos importantes seleccionados por ANOVA plot con valor de $P < 0.05$ en el modo de ionización negativo.

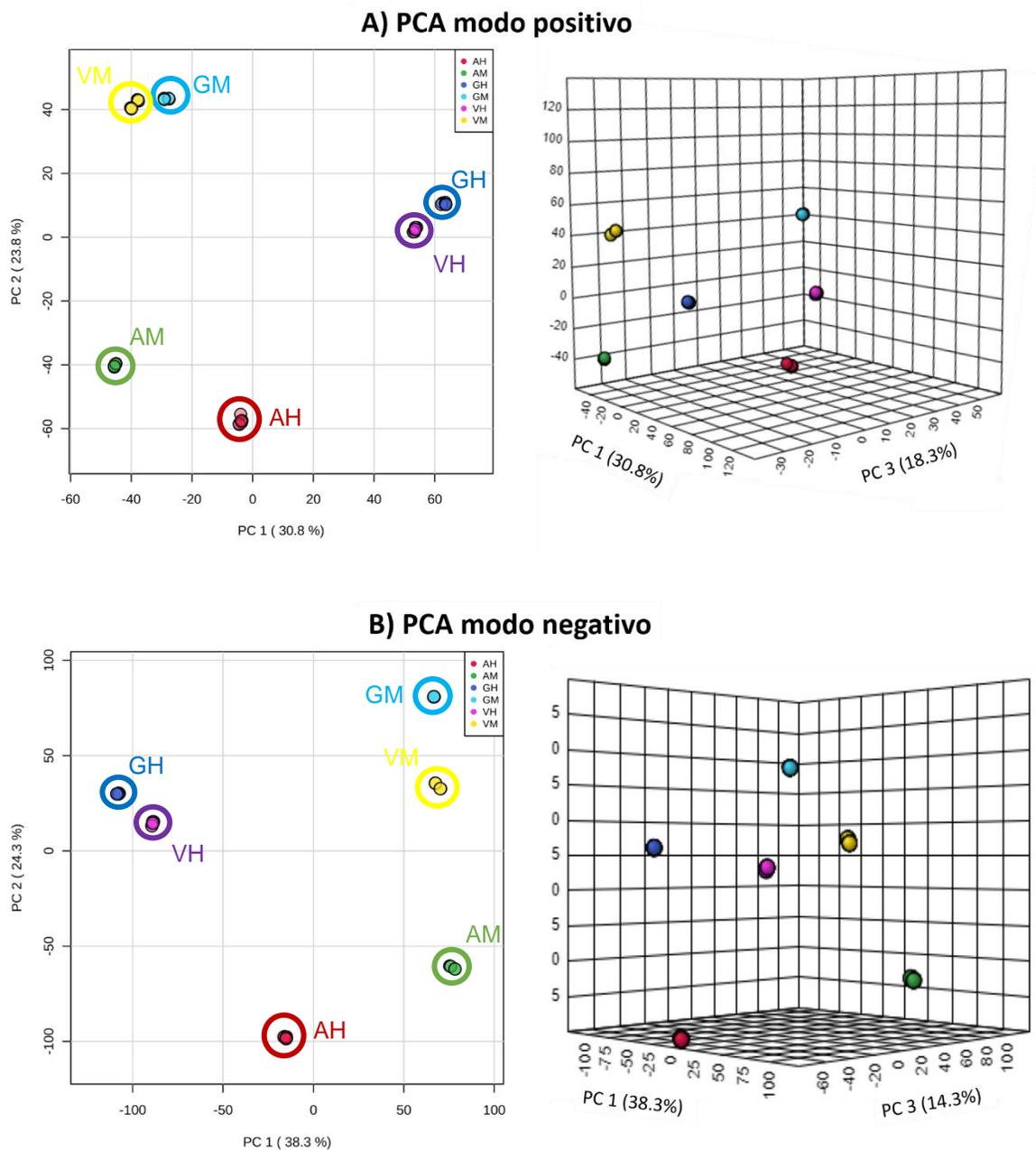


Figura 3.5 Análisis de componentes principales (PCA) de las m/z en los modos de ionización positivo y negativo de los tres fenotipos. La varianza se debe a los diferentes tejidos (H y M) y fenotipos (G, V y A). A) Gráficos de puntajes entre los PC1, PC2 y PC3 de los datos en modo positivo. B) Gráficos de puntajes entre los PC1, PC2 y PC3 de los datos en modo negativo. El porcentaje de variación se muestran entre paréntesis. GH (Azul marino), GM (azul), VH (morado), VM (amarillo), AH (rojo) y AM (verde).

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

El análisis de similitud generó seis grupos en cada uno de los modos de ionización (**Figura 3.6**). Se tomaron en cuenta dos parámetros para este análisis: la medida de similitud y los algoritmos de agrupamiento. Con esto se generó un dendograma y un mapa de calor para representar los grupos y sus similitudes (**Figura 3.6**). Los grupos más parecidos fueron AH con AM, VM con GM, y GH con VH en ambos modos de ionización.

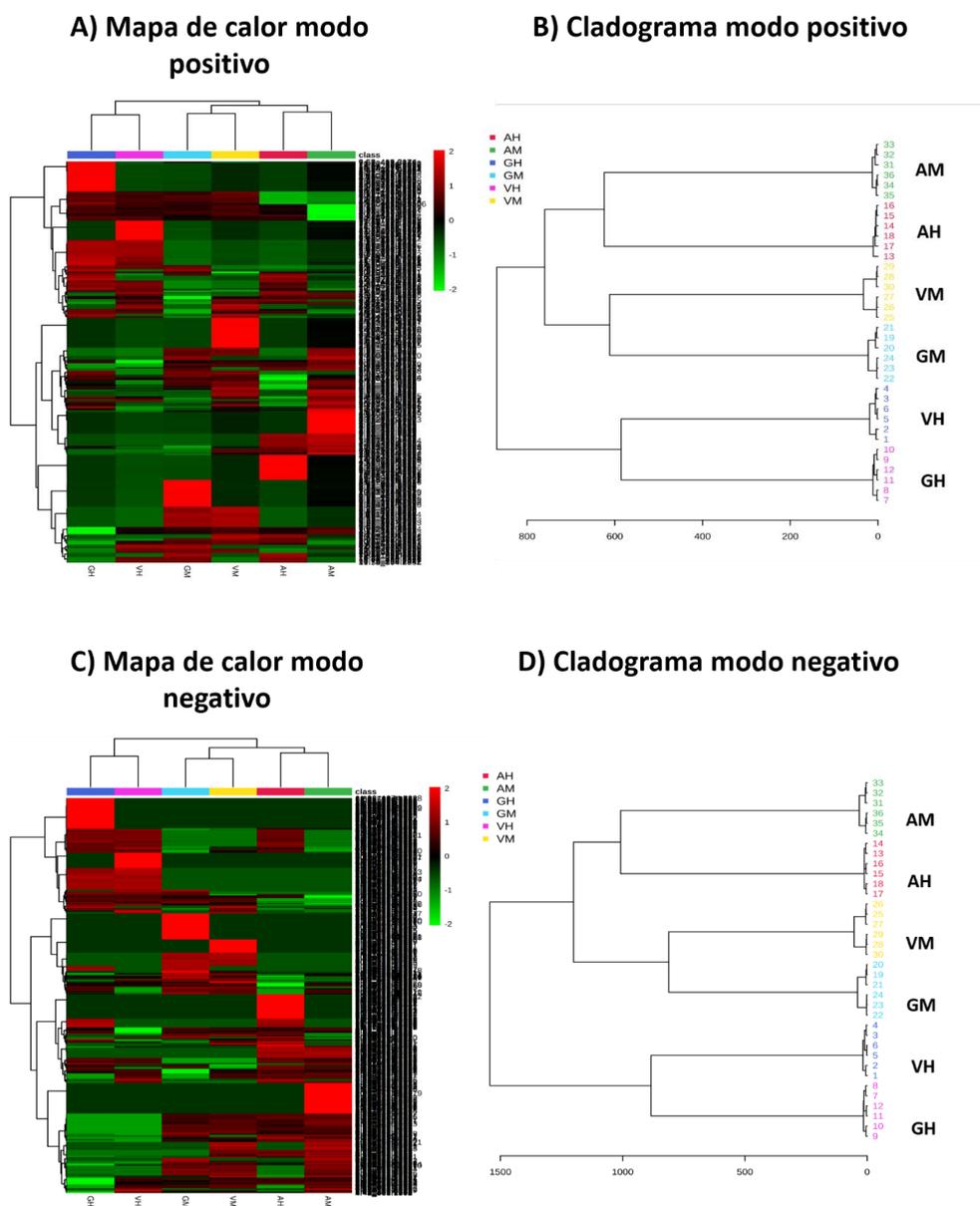


Figura 3.6 Mapas de calor y dendogramas de las m/z en los modos de ionización positivo y negativo de los tres fenotipos. Muestra el resultado del agrupamiento de las intensidades de los picos obtenidas en los dos modos de ionización como

dendogramas (B y D) y mapa de calor (A y C), que con una escala en colores rojo y verde muestra de manera semicuantitativa la concentración de cada pico, siendo el rojo lo más concentrado y el verde lo menos concentrado. La medida de similitud se calculó usando distancia euclidiana y el algoritmo de agrupamiento usando enlace ward D. GM) meristemo verde, VM) meristemo variegado, AM meristemo albino, GH) hoja verde, VH) hoja variegada y AH) hoja albina.

3.3.3 Comparaciones y análisis de enriquecimiento de rutas de los tres fenotipos de *A. angustifolia*

En las comparaciones entre fenotipos se identificaron m/z diferenciales entre cada fenotipo, las m/z obtenidas de la comparación se llevaron al análisis de enriquecimiento de rutas en el cual también se identificaron algunos compuestos de las rutas enriquecidas basados en la biblioteca de *O. sativa* de la base de datos de KEGG. El Cuadro 3.1 muestra el resumen de los datos obtenidos.

Los datos m/z en ESI negativo de la hoja del fenotipo A tuvo 27 m/z diferenciales y tres rutas metabólicas enriquecidas más en comparación con el fenotipo G; sin embargo, el fenotipo G tuvo casi el doble de compuestos que el fenotipo A. En los datos del meristemo el fenotipo A tuvo 29 m/z diferenciales y siete rutas más en comparación con el fenotipo G; sin embargo, el fenotipo G tuvo 10 compuestos más que el fenotipo A. Para la mayoría de los datos de hoja y meristemo ESI⁺ no se pudo realizar el análisis de enriquecimiento de las rutas metabólicas ya que es necesario tener al menos 100 m/z diferenciales (**Cuadro 3.1**).

Las rutas de biosíntesis de flavonoides (BF) y biosíntesis de flavonas y flavonol (BFF) (**Figuras 3.7 y 3.8**) fueron las rutas con mayor número de compuestos identificados tentativamente en los tres fenotipos (**Anexo 3-8**), por lo que a partir de aquí serán las rutas que analizaremos.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

Cuadro 3.1 Resumen de los análisis de comparación y enriquecimiento de rutas de los tres fenotipos. Se muestran los resultados de m/z diferenciales, el número de rutas enriquecidas y los compuestos tentativos basados en *O. sativa*, de cada tejido, comparación y fenotipo. Sin datos (SD), verde (G), variegado (V), albino (A).

Tejido (ESI)	Comparación	Fenotipo	m/z diferenciales	Núm. de rutas enriquecidas	Compuestos tentativos
Hoja (-)	G-A	G	249	19	43
		A	276	22	22
	G-V	G	196	14	28
		V	125	12	11
	A-V	A	289	21	22
		V	195	16	26
Meristemos (-)	G-A	G	222	16	28
		A	251	23	18
	G-V	G	148	15	17
		V	157	9	15
	A-V	A	373	27	33
		V	181	9	19
Hoja (+)	G-A	G	122	9	18
		A	95	SD	SD
	G-V	G	68	SD	SD
		V	75	SD	SD
	A-V	A	83	SD	SD
		V	97	SD	SD
Meristemos (+)	G-A	G	137	13	11
		A	72	SD	SD
	G-V	G	67	SD	SD
		V	85	SD	SD
	A-V	A	56	SD	SD
		V	146	19	17

En la ruta BF de la hoja (**Figura 3.7 H**), el fenotipo G tiene 28 compuestos entre estos podemos destacar los dihidroflavonoides precursores para la ruta de BFF en la siguiente secuencia narigenina-dihidrokaempferol-kaempferol, eriodictiol chalcona-eriodictiol-luteolina, eriodictiol-dihidroquercetina-quercetina. El fenotipo A tiene 16 compuestos, entre los que podemos observar los precursores de la ruta BFF en las siguientes secuencias narigenina-kaempferol, luteolina y dihidroquercetina. Finalmente, en el fenotipo V se

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

determinaron seis compuestos de los que solo se detectaron tres precursores de la ruta BFF los cuales son kaempferol, luteolinaa y dihidroquercetina.

Para la ruta BF en el meristemo (**Figura 3.7 M**), el fenotipo G tiene 29 compuestos, podemos resaltar los dihidroflavonoides precursores de la ruta BFF en las siguientes secuencias, narigenina-dihidrokaempferol-kaempferol, eriodictiol chalcona-eriodictiol-luteolinaa, eriodictiol-dihidroquercetina y apigenina. El fenotipo A tiene 18 compuestos entre los que se observan secuencias de metabolitos como narigenina-kaempferol, eriodictiol chalcona-eriodictiol-luteolinaa, eriodictiol-dihidroquercetina y apigenina. Por último, el fenotipo V tiene 19 compuestos entre los que se identificaron el dihidrokaempferol-kaempferol, eriodictiol chalcona-eriodictiol-luteolinaa, eriodictiol-dihidroquercetina y la apigenina.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

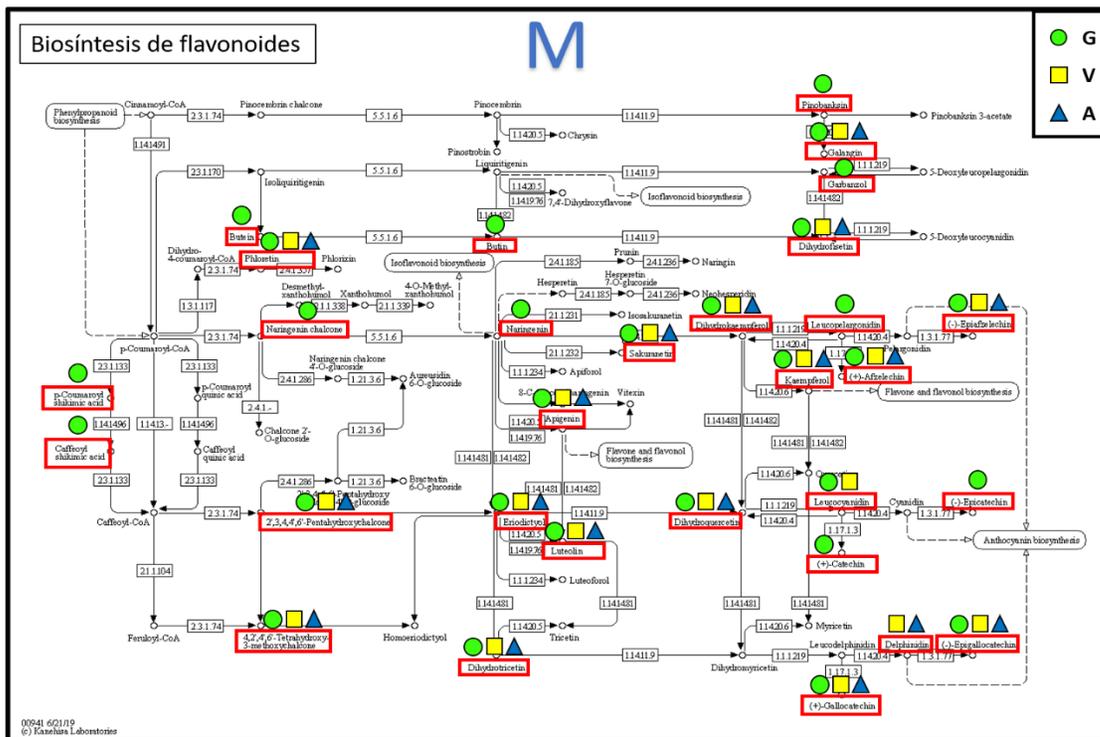
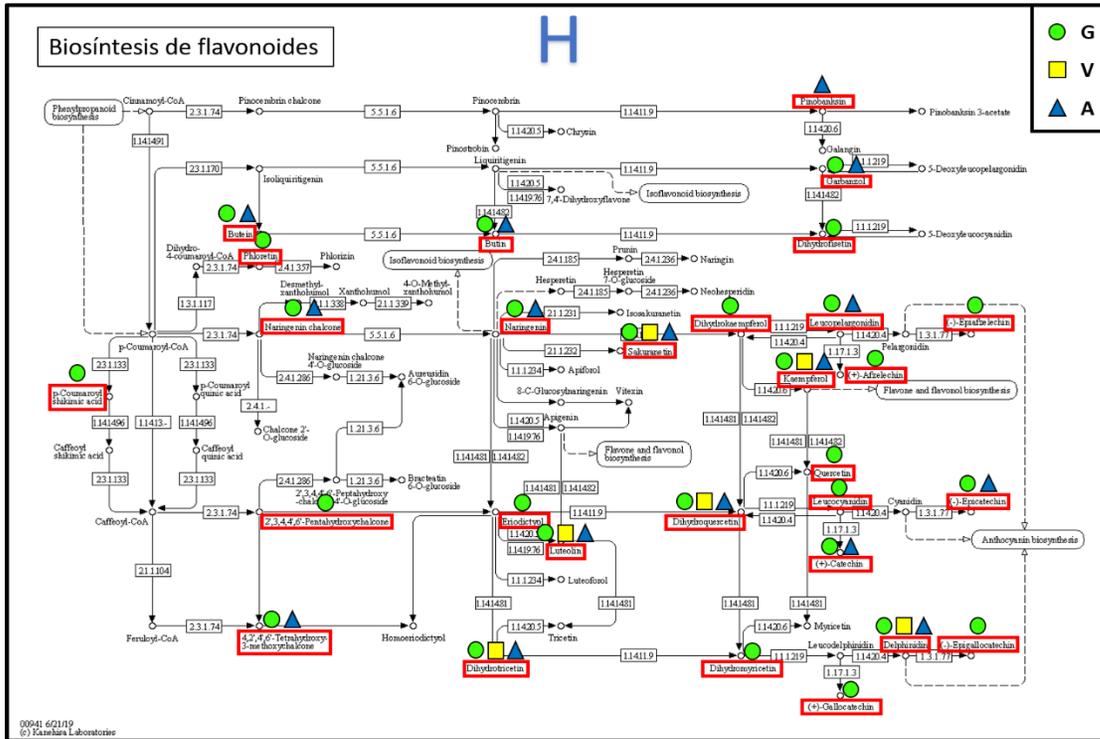


Figura 3.7 Compuestos identificados de la ruta de biosíntesis de flavonoides en hoja y meristemo de los tres fenotipos (A=triángulo, V=cuadrado, G=círculo) . En

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

los rectángulos rojos se muestran la presencia y ausencia de los compuestos identificados de los tres fenotipos en la ruta de biosíntesis de flavonoides obtenida de la base de datos en línea KEGG https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map00941&keyword=flavonoid.

Para la ruta BFF en la hoja (**Figura 3.8 H**), el fenotipo G tiene 10 compuestos, entre ellos el kaempferol que sigue dos rutas, en la primera va de kaempferol a kaempferol 3-O-ramnósil-7-O-glucósido, en la segunda pasa de kaempferol a astragalina y luego a nictoflorina, la quercetina también sigue dos rutas, en la primera va de quercetina a isoquercetina y finalmente a rutina, en la segunda ruta va de quercetina a quercitrina y finalmente a quercetina 3-O-ramnosido-7-O-glucósido y por ultimo tenemos también la presencia de luteolinaa. El fenotipo V tiene nueve compuestos que siguen diferentes rutas, el kaempferol sigue dos rutas, en la primera va de kaempferol a kaempferol 3-O-ramnosil-7-O-glucósido, en la segunda pasa de kaempferol a astragalina y luego a nictoflorina, también tiene dos rutas derivadas de la quercetina, en la primera va de isoquercetina a rutina, en la segunda ruta va de quercitrina a quercetina 3-O-ramnosido-7-O-glucósido, por último, tenemos también la presencia de luteolinaa. El fenotipo A tiene tres compuestos entre los que encontramos la ruta kaempferol-kaempferinaa y luteolinaa.

Para la ruta BFF en el meristemo (**Figura 3.8 M**), los tres fenotipos tienen 10 compuestos identificados entre ellos el kaempferol que sigue dos rutas, en la primera va de kaempferol a kaempferol 3-O-ramnosil-7-O-glucósido, en la segunda pasa de kaempferol a astragalina y luego a nictoflorina, también sigue dos rutas derivadas de la quercetina, en la primera va de isoquercetina a rutina, en la segunda ruta va de quercitrina a quercetina 3-O-ramnosil-7-O-glucósido y por último, tenemos también la presencia de luteolina y apigenina.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

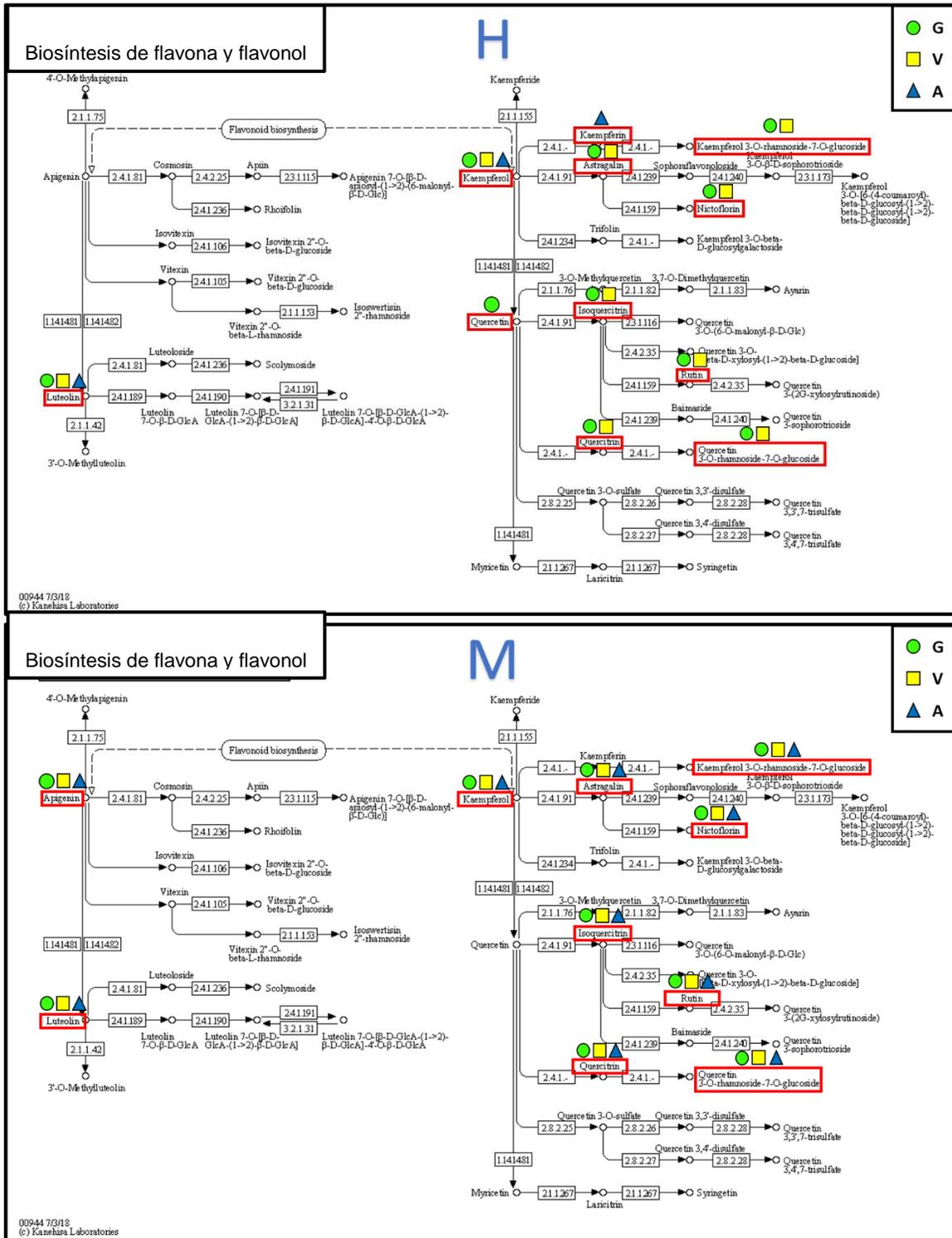


Figura 3.8 Compuestos identificados de la ruta de biosíntesis de la flavona y el flavonol en hoja y meristemo de los tres fenotipos (A=triángulo, V=cuadrado,

G=circulo). En los rectángulos rojos se muestran la presencia y ausencia de los compuestos de los tres fenotipos en la ruta de biosíntesis de flavona y flavonol obtenida de la base de datos en línea KEGG https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map00944&keyword=flavonoid.

3.4 DISCUSIÓN

En un estudio previo reportado por Duarte-Aké *et al.* (2016) se mostró que durante la micropropagación de *A. angustifolia* se generan dos fenotipos nuevos, uno variegado y uno albino, producto de la variación somaclonal. El ANOVA de los datos obtenidos por UPLC-MS-QTOF (**Figura 3.4**) indicó que existe una diferencia significativa entre la composición química de los tres fenotipos. Esta variación se ve explicada en el PCA por cada fenotipo (G, V y A) y tejido (H y M) de *A. angustifolia*, los cuales formaron grupos bien definidos (**Figura 3.5**). Estas diferencias metabólicas entre variedades de plantas pueden deberse a múltiples factores como la variación somaclonal (Azizi *et al.*, 2020). Entre los fenotipos de *A. angustifolia* se han observado cambios en los patrones de metilación, además el fenotipo albino carece de cloroplastos, por lo tanto de actividad fotosintética, también presenta un desarrollo epidérmico irregular y anomalías en el sistema estomático, lo que se ve reflejado en el intercambio de gases y la transpiración, todos estos cambios terminan afectando el metabolismo de las plantas albinas de *A. angustifolia* las cuales han mostrado bajos niveles de los transcritos implicados en las rutas de carotenoides y fotosíntesis (Duarte-Aké *et al.*, 2016; Hernandez-Castellanos *et al.*, 2020; Us-Camas *et al.*, 2017), por lo que dichos factores se ven reflejados en las diferencias metabólicas que encontramos en este estudio.

Los análisis de enriquecimiento mostraron más compuestos identificados para las rutas de biosíntesis de flavonoides, flavonas y flavonoles (**Figuras 3.7 y 3.8**). Ahumada-Santos *et al.* (2013) reportaron que estos compuestos en agaves tienen la atribución de tener actividad antioxidante y esto coincide con los datos obtenidos en el capítulo anterior de este trabajo en el que se demostró la presencia de actividad antioxidante de los tres fenotipos de *A. angustifolia*.

De manera interesante se encontraron más compuestos en las rutas de BF y BFF en el fenotipo G en comparación con los fenotipos V y A (**Figuras 3.7 y 3.8**). La planta albina tiene mayoritariamente compuestos precursores de la ruta, lo cual sugiere una alteración

en estas rutas, esto puede deberse a los múltiples factores de la VS (Azizi *et al.*, 2020) como se explicó en párrafos anteriores.

Por otro lado, algunos autores indican que en las plantas albinas se fortalece la actividad antioxidante dada por enzimas como la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa que en conjunto con compuestos como la catequina, epicatequina, quercetina y glucósidos, los cuales se han identificado en el fenotipo A de *A. angustifolia* (**Figura 3.7 y 3.8**), juegan un papel importante para la protección contra el estrés abiótico como el exceso de radiación UV-B o la radiación solar (Dong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017).

La acción conjunta de los compuestos como los flavonoides y enzimas como la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa podrían explicar la actividad antioxidante del fenotipo A (**Figuras 2.2 y 2.6**). Sin embargo, un punto importante a considerar es la concentración en la que se encuentren dichos compuestos, pues se ha reportado que algunos compuestos como el galato de catequina, el ácido gálico, la epicatequina, la epigallocatequina y la zaexantina se encuentran en mayor concentración en las plantas albinas de té (*Camelia sinensis*) con respecto a las plantas verdes (Cheng *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017a).

Finalmente, en la hoja del fenotipo A, en la ruta de la BFF, solo se determinaron los precursores kaempferol y luteolina, mientras que para el fenotipo G se pudieron determinar tanto los precursores como sus formas glucosiladas (**Figura 3.8 H**). Estos resultados fueron distintos al caso del meristemo en el cual todos los fenotipos mostraron tanto los precursores como su forma glicosilada (**Figura 3.8 M**). Esto sugiere que las rutas metabólicas se encuentran intactas en los meristemos, independientemente del fenotipo, pero en las hojas, podría existir una falla en la glucosilación de los flavonoides para la hoja del fenotipo A. El caso contrario lo podemos encontrar en el estudio de Zhang *et al.* (2017b) quienes mostraron que las hojas de té cloróticas (sensibles a la luz) acumulaban grandes cantidades de flavonoides con anillos B orto-dihidroxilados (por ejemplo, galato de catequina, quercetina y sus glicósidos, etc.), mientras que los flavonoides totales (por ejemplo, glucósido de miricetrina, galato de epigallocatequina, etc.) se encontraban considerablemente reducidos, lo que sugiere una posible función fotoprotectora de los flavonoides dihidroxilados en hojas de té sensibles a la luz. Sin embargo, es importante destacar que las condiciones de luz en las que se encuentra la planta de té son de campo lo que es completamente distinto a las condiciones de laboratorio en la que se encuentra la

CAPÍTULO III. ANÁLISIS METABOLÓMICO NO DIRIGIDO DE *A. angustifolia* BASADA EN UPLC-MS-QTOF

planta albina de *A. angustifolia*, esto es importante porque Zhang *et al.* (2017b) mencionan que la biosíntesis de flavonoides aumenta cuando incrementan la temperatura y la iluminación.

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

4.1 INTRODUCCIÓN

El grupo de los compuestos fenólicos es un grupo de metabolitos especializados muy amplio en las plantas, de los cuales se han identificado más de 8,000 estructuras químicas (Tsao, 2010). Los compuestos fenólicos son poseedores de múltiples actividades en las plantas, una de las actividades es la antioxidante (Katalinic *et al.*, 2006). Algunos compuestos fenólicos derivados de plantas presentan una mayor actividad antioxidante en condiciones *in vitro* que las vitaminas C y E (Rice-Evans *et al.*, 1997).

Los fenoles se caracterizan por la presencia en su estructura de uno o varios grupos de alcoholes aromáticos, capaces de reducir las especies reactivas de oxígeno así como diversos sustratos orgánicos y minerales, estas propiedades redox explican su papel en la prevención de varias enfermedades crónicas importantes asociadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes tipo II, las enfermedades neuro y crónico degenerativas, y la osteoporosis (Scalbert *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos se han cuantificado en diferentes especies de Agave y para diferentes aplicaciones como insecticida, abono (fibra de agave) y en el aguamiel que es la base de diversas bebidas (Hernández-Ramos *et al.*, 2020; Kyriacou *et al.*, 2020; Maazoun *et al.*, 2019). En *A. angustifolia* se han estudiado los compuestos fenólicos del bagazo que se desecha en la industria del mezcal (Ibarra-Cantún *et al.*, 2020b).

Los flavonoides son una clase de compuestos polifenólicos que se encuentran naturalmente en las plantas. Los subgrupos de flavonoides incluyen flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, flavanoles e isoflavonas. Las diversas modificaciones de las moléculas de flavonoides aumentan aún más la diversidad de flavonoides (Ku *et al.*, 2020).

La glicosilación de los flavonoides es una de las modificaciones más importantes en las vías de biosíntesis de flavonoides, lo que contribuye a su actividad bioquímica y a su solubilidad. Sin embargo, los informes sobre glicosiltransferasas que catalizan específicamente la 3-O-glicosilación de flavonoides son limitados (Lyu *et al.*, 2020).

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

La glicosilación es una modificación generalizada de los metabolitos secundarios de las plantas, está involucrada en varias funciones, incluida la regulación de la homeostasis hormonal, la desintoxicación de xenobióticos y la biosíntesis y almacenamiento de compuestos secundarios. En las plantas, estas reacciones están controladas por una subclase específica de la omnipresente familia de las glicosiltransferasas (Gachon *et al.*, 2005).

La actividad y la concentración de los metabolitos como los flavonoides se ha visto aumentada en plantas de té albinas (sensibles a la luz) (Zhang *et al.*, 2017b). Los fenotipos de *A. angustifolia*, presentan actividad antioxidante y se han podido identificar compuestos de las rutas de BF y BFP sin embargo, es importante conocer las concentraciones en las que se encuentran los compuestos de esas rutas que podrían estar involucradas en la protección contra el estrés abiótico.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal y extracción metanólica

Se utilizaron plantas de cada uno de los fenotipos (G, V y A) con una altura entre 2.5 y 3 cm cultivadas en medio de mantenimiento MSB (**Anexo 1**). Las plantas se procesaron en una campana de flujo laminar. De cada una de las plantas, se separaron la zona meristemática (M) y las hojas (H) y se colocaron en tubos de plástico de 15 mL. Posteriormente, las muestras se congelaron y se liofilizaron.

Para la extracción se siguió el protocolo reportado por De Vos *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. El material vegetal liofilizado se trituró en morteros de porcelana y se almacenó en tubos de plástico de 50 mL a -20 °C. Posteriormente se pesaron 500 mg de la muestra en tubos de plástico de 15 mL, dos réplicas para M y tres para H.

Para la extracción metanólica se utilizó una mezcla de metanol (99.9%) y de ácido fórmico (0.1%) ambas grado espectrometría de masas (marca Sigma Aldrich). A cada muestra se agregaron 2 mL de metanol/ácido fórmico por cada 100 mg de tejido. Se mezcló bien el tejido con el disolvente y la muestra se colocó en un sonicador marca Branson 3800 cuatro veces por 15 min cada vez. Entre cada sonicación, las muestras se mezclaron tres veces por 15 s con ayuda de un vórtex.

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga marca Eppendorf 5804 R, se tomó el sobrenadante y se descartó el precipitado. Los extractos se colocaron en viales de vidrio previamente pesados y se concentraron en un rotavapor Büchi R11 a 122 mbar y 40 °C. Los extractos secos se resuspendieron en la mezcla metanol-ácido fórmico a una concentración final de 80 mg mL⁻¹.

4.2.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

La identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo al protocolo de Juárez-Trujillo *et al.* (2018) y Monribot-Villanueva *et al.* (2019). Las muestras se filtraron con membranas de PTFE de 0.5 µm y se colocaron en viales de UPLC de 2 mL, posteriormente se inyectaron con las condiciones reportadas en el **Cuadro 4.1**.

Los datos se obtuvieron con un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución Agilent infinity 1290 acoplado a un espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo Agilent 6460 (UPLC-MS-QqQ). Las fases móviles fueron agua con 0.1% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (B), ambas grado espectrómetro de masas marca Sigma Aldrich.

Cuadro 4.1 Perfil del gradiente de elución para la fase móvil de las muestras de los tres fenotipos en el UPLC-MS-QqQ.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	99	1
30	50	50
35	1	99
39	1	99
40	99	1
45	99	1

El flujo fue de 0.3 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 2 µL. La temperatura de la columna (Waters, BEH, 2.1 x 50 mm, 1.7 micrones) fue de 40°C. Las condiciones del espectrómetro de masas se muestran en el **Cuadro 4.2**.

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

Cuadro 4.2 Condiciones del equipo de UPLC-MS-QqQ para la inyección de las mutras de los tres fenotipos.

Parámetro	Valor
Temperatura del gas	300 °C
Flujo de gas	5 L min ⁻¹
Nebulizador	45 psi
Sheath Gas Temp	250 °C
Sheath Gas Flow	11 L min ⁻¹
Voltaje capilar (positivo y negativo)	3500 V
Voltaje de la boquilla (positivo y negativo)	500 V

El protocolo utilizado fue un MRM dinámico (Multiple Reaction Monitoring). Las condiciones para cada compuesto se describen en el **Anexo 2**. La variación del tiempo de retención permitido para la búsqueda de los compuestos fue de 2 min en cada caso. El voltaje del acelerador de celda fue de 7 V para cada compuesto. Se realizaron diluciones si la concentración de algunos compuestos era superior al rango de linealidad.

4.2.3 Análisis de datos

Los datos obtenidos se procesaron en el programa en línea MetaboAnalyst 4.0. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA), de componentes principales, de similitud y de covarianza, todos de acuerdo al protocolo reportado por (Chong *et al.*, 2019).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos de los tres fenotipos de *A. angustifolia*

Se identificaron en total 19 compuestos fenólicos en las hojas (H) (**Cuadro 4.3**) y 18 en los meristemas (M) (**Cuadro 4.4**) de cada fenotipo (G, V y A). El *trans*-resveratrol fue el único

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN A. angustifolia POR UPLC-MS-QqQ

compuesto que no se identificó en el meristemo del fenotipo albino a diferencia de los otros dos fenotipos.

Cuadro 4.3 Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos de la hoja de los tres fenotipos. Se muestra por fenotipo y por cada compuesto los valores promedio de las cantidades en μg por gramos de biomasa seca y la desviación estándar.

Compuesto	GH		VH		AH	
	$\mu\text{g g}^{-1}$ MS	Desv. est.	$\mu\text{g/g}$ MS	Desv. est.	$\mu\text{g g}^{-1}$ MS	Desv. est.
1 L-fenilalanina	111.62	14.79	83.78	23.66	161.01	43.80
2 Ácido protocatéuico	0.60	0.39	0.15	0.06	0.58	0.12
3 Ácido 4-hidroxibenzoico	9.85	5.16	1.01	0.24	2.42	0.23
4 Ácido gentísico	4.67	0.66	0.20	0.03	0.56	0.09
5 Ácido cafeico	8.31	1.08	0.46	0.08	1.32	0.08
6 Ácido vanílico	19.10	7.20	2.77	0.65	14.29	4.76
7 Vanilina	0.49	0.10	0.39	0.05	0.88	0.19
8 Ácido 4-cumárico	7.99	2.35	5.15	1.24	4.16	0.47
9 Ácido ferúlico	14.05	4.67	5.89	0.77	25.45	3.95
10 Ácido 3-cumárico	0.21	0.08	0.27	0.07	0.94	0.08
11 Ácido sinápico	3.16	0.95	1.27	0.21	5.92	0.78
12 Ácido salicílico	0.11	0.02	0.07	0.01	0.08	0.01
13 Rutina	41.50	0.89	24.15	3.81	0.56	0.04
14 Quercetina-3-glucósido	14.56	0.52	1.22	0.13	0.14	0.02
15 Kaempferol-3-O-glucósido	55.15	5.05	21.89	2.14	9.86	1.02
16 <i>trans</i> -Resveratrol	2.10	0.49	1.00	0.15	0.00	0.00
17 Secoisolariciresinol	1.80	0.26	0.84	0.17	0.76	0.08
18 Quercetina	6.08	1.08	2.59	0.49	2.28	0.29
19 Kaempferol	0.43	0.02	0.65	0.09	0.80	0.03

**CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y
CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN A. angustifolia POR UPLC-MS-QqQ**

Cuadro 4.4 Identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos del meristemo de los tres fenotipos. Se muestra por fenotipo y por cada compuesto el promedio de las cantidades en μg por gramos de masa seca y la desviación estándar.

Compuesto	GM		VM		AM	
	$\mu\text{g g}^{-1}$ MS	Desv. est.	$\mu\text{g g}^{-1}$ MS	Desv. est.	$\mu\text{g g}^{-1}$ MS	Desv. est.
1 L-Fenilalanina	92.64	1.01	50.83	11.08	88.21	15.22
2 Ácido protocatecuico	1.01	0.53	0.30	0.04	0.28	0.10
3 Ácido 4-hidroxibenzoico	2.19	0.12	1.02	0.18	1.74	0.52
4 Ácido gentísico	0.26	0.13	0.31	0.08	0.15	0.14
5 Ácido cafeico	320.18	226.77	2.18	0.32	1.16	0.05
6 Ácido vanílico	2.10	0.30	2.56	0.30	4.29	1.12
7 Vanilina	1.22	0.25	1.70	0.54	1.91	0.19
8 Ácido 4-cumárico	0.96	0.02	1.52	0.38	1.63	0.31
9 Ácido ferúlico	3.37	0.35	2.88	0.15	8.18	1.21
10 Ácido sinápico	0.44	0.08	0.94	0.24	2.47	0.05
11 Rutina	0.91	0.21	0.91	0.60	0.09	0.01
12 Kaempferol-3-O-glucósido	10.84	0.36	17.06	2.68	20.23	1.64
13 <i>trans</i> -Resveratrol	11.33	3.19	7.53	1.17	0.33	0.04
14 Secoisolariciresinol	4.96	2.17	2.45	0.55	0.82	0.10
15 Quercetina	5.56	1.50	15.69	3.94	8.72	0.68
16 Cirsimarina	1.87	0.12	5.08	1.15	2.45	0.11
17 Naringenina	11.60	1.78	3.29	1.11	2.36	0.18
18 Kaempferol	0.81	0.54	0.61	0.23	0.36	0.01

Para el fenotipo G, el compuesto con mayor concentración en H fue la L-fenilalanina y el de menor concentración fue el ácido salicílico, mientras que para el M el compuesto de mayor concentración fue el ácido caféico y el de menor concentración fue el ácido gentísico. Para el fenotipo V, los compuestos de mayor y menor concentración en la H fueron los mismos que para el fenotipo G, mientras que para el meristemo (M) los compuestos de mayor y

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

menor concentración fueron la L-fenilalanina y el ácido protocatéuico, respectivamente. Finalmente, para el fenotipo A los compuestos con mayor y menor concentración en hoja (H) fueron los mismos que para el fenotipo G y V pero en el M los compuestos con mayor y menor concentración fueron la L-fenilalanina y la rutina, respectivamente (**Cuadros 4.3 y 4.4**).

4.3.2 Análisis estadístico de la cantidad de compuestos fenólicos cuantificados en los tres fenotipos de *A. angustifolia*

El análisis estadístico mediante ANOVA de la cantidad de compuestos fenólicos mostró diferencia significativa para los compuestos fenólicos de la H y del M de los tres fenotipos (**Figura 4.1**). En las hojas el compuesto con mayor diferencia fue el ácido 3-cumárico y el de menor diferencia fue el ácido 4-hidroxibenzoico, mientras que en el meristemo el compuesto con mayor diferencia fue el ácido caféico y el de menor diferencia fue el ácido gentísico.

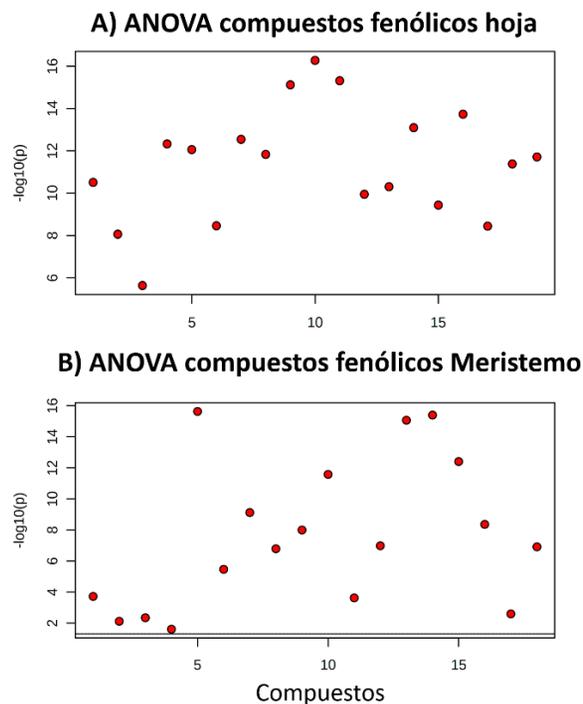


Figura 4.1 Análisis de varianza (ANOVA) de los compuestos fenólicos en hoja y meristemo de los tres fenotipos. A) Picos importantes seleccionados por ANOVA plot con un valor de $P < 0.001$ de la hoja de los tres fenotipos. B) Picos importantes

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

seleccionados por ANOVA plot con valor de $P < 0.05$ del meristemo de los tres fenotipos.

Por otro lado, los PCA para los datos de la H y el M, agruparon los compuestos fenólicos por fenotipo, lo que explica la variación encontrada en el ANOVA, en la hoja (H) se muestran grupos compactos, mientras que el meristemo (M) las muestras del fenotipo verde se ven divididas en dos grupos muy cercanos a diferencia de las muestras de los otros fenotipos las cuales se ven más compactas (**Figura 4.2**).

El mapa de calor muestra que en la H del fenotipo A existen 15 compuestos fenólicos al alza, 8 compuestos en el fenotipo V, mientras el fenotipo G tan sólo tiene 3 compuestos a la alza. El M del fenotipo V tiene 17 compuestos fenólicos al alza, el fenotipo G tiene 10 compuestos y el fenotipo A tan sólo tiene 3.

4.3.3 Análisis de los compuestos identificados en las rutas de biosíntesis de la flavona, el flavonol y los fenilpropanoides en cada fenotipo de *A. angustifolia*

En los extractos de Agave analizados mediante UPLC-MS-QqQ se identificaron y cuantificaron con éxito 19 compuestos fenólicos en H (**Cuadro 4.3**) y 18 compuestos fenólicos en M (**Cuadro 4.4**). Entre los compuestos determinados se encuentran algunos de las rutas de biosíntesis de los fenilpropanoides (BFP) (**Figura 4.5**) y de la biosíntesis de flavonas y flavonoles (BFF) (**Figura 4.6**).

En la hoja se detectaron y cuantificaron para la ruta del BFP (**Figura 4.5 y Cuadro 4.3**), el ácido sinápico, el ácido felúrico, el ácido 4-coumárico, ácido 3-coumárico, el ácido cafeico y el ácido 4-hidroxibenzoico, y para la ruta del BFF (**Figura 4.6 y Cuadro 4.3**) se identificaron la rutina, el kaempferol-3-O-glucósido, la quercetina-3-glucósido, la quercetina y el kaempferol. Para el meristemo determinamos componentes de la ruta del BFP (**Figura 4.5 y Cuadro 4.4**), como el ácido sinápico, el ácido felúrico, el ácido 4-coumárico, el ácido cafeico y el ácido 4-hidroxibenzoico, mientras que en la ruta del BFF (**Figura 4.6 y Cuadro 4.4**) se determinaron a la rutina, el kaempferol-3-O-glucósido, la quercetina y el kaempferol.

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN A. angustifolia POR UPLC-MS-QqQ

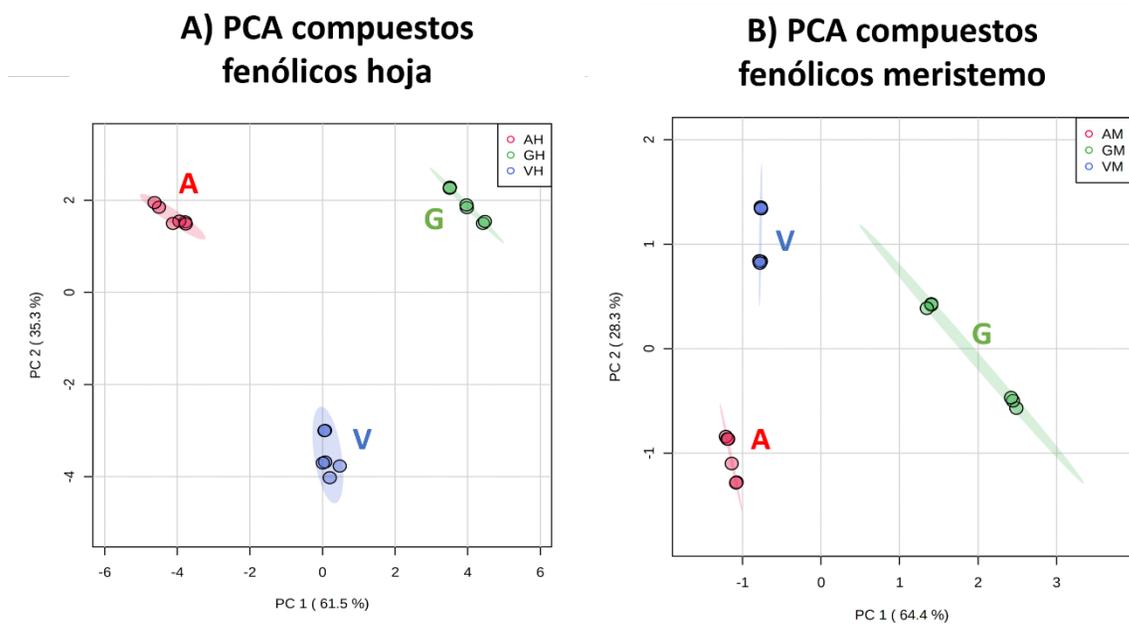


Figura 4.2 Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos fenólicos en hoja y meristemo de los tres fenotipos. A) Gráficos de puntajes entre los PC1 y PC2 de los compuestos fenólicos de la hoja. B) Gráficos de puntajes entre los PC1 y PC2 de los compuestos fenólicos del meristemo. El porcentaje de variación explicada se muestran entre paréntesis. Los grupos se muestran con colores verde (verde), azul (variegado) y rojo (albino).

El análisis de correlación en los compuestos de la ruta del BFP de la hoja (H) mostró una correlación mayormente positiva entre el ácido 3-coumárico y el ácido 4-coumárico, los cuales muestran una correlación negativa con el ácido cafeico y el ácido 4-hidroxibenzoico (**Figura 4.4**). Para la ruta del BFF en la hoja (H) se destaca que el kaempferol y la quercetina presentaron una correlación negativa con la rutina y la quercetina-3-glucósido y una correlación positiva entre el kaempferol y el kaempferol-3-O-glucósido.

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN A. angustifolia POR UPLC-MS-QqQ

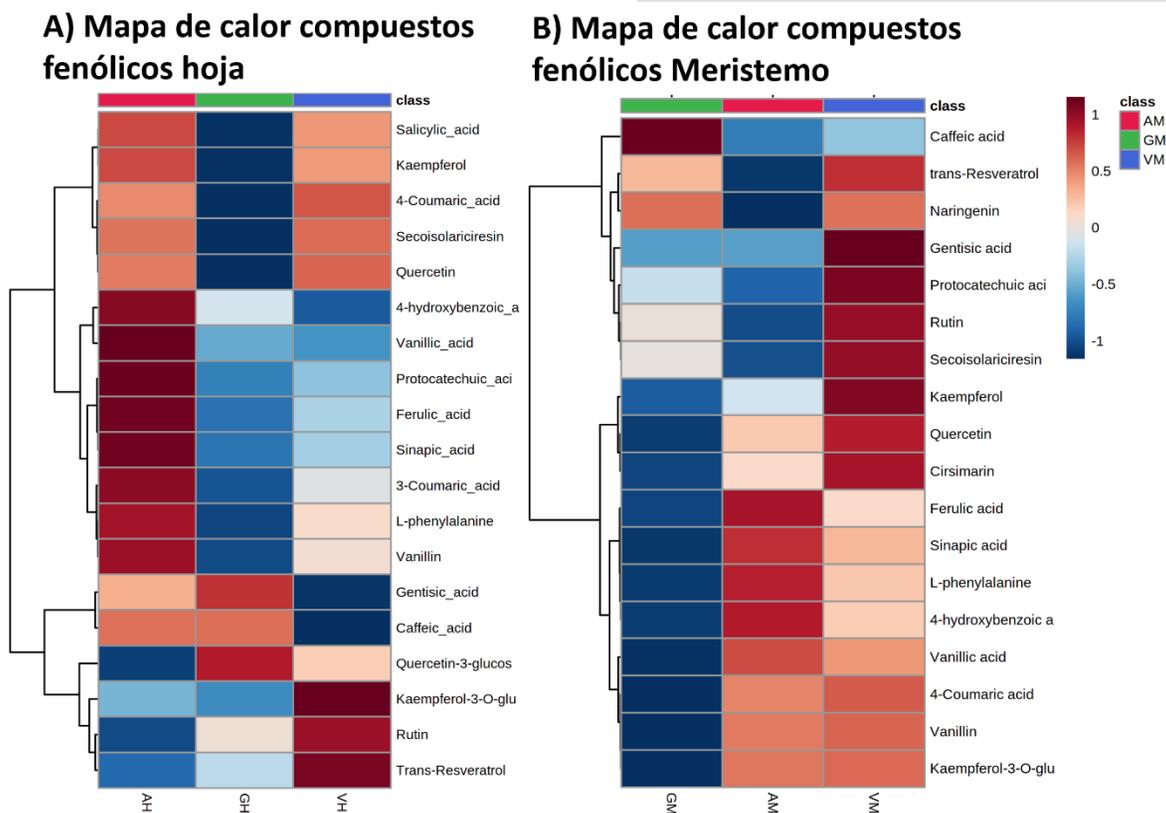


Figura 4.3 Mapas de calor de los compuestos fenólicos en hoja y meristemo de los tres fenotipos. Se muestra el resultado del agrupamiento como mapa de calor de la hoja (A) y el meristemo (B). La escala de color va del rojo al azul (mayor concentración a menor). La medida de similitud se calculó usando distancia euclidiana y el algoritmo de agrupamiento usando enlace ward D. GH: hoja fenotipo verde; GM: meristemo fenotipo verde; VH: hoja fenotipo variegado; VM: meristemo fenotipo variegado; AH: hoja fenotipo albino; AM: meristemo fenotipo albino.

El análisis de correlación permite conocer las relaciones lineales que existen entre los datos, una correlación positiva indica que cuando un compuesto aumente su concentración, el otro compuesto también lo hará, caso contrario en una correlación negativa donde cuando un compuesto aumenta el otro disminuye al cual éste se encuentra relacionado. En los compuestos del meristemo para la ruta de BFP mostró una correlación positiva entre los compuestos con la excepción del ácido cafeico, el cual presentó una correlación negativa con el resto de los compuestos de la ruta. En la ruta del BFF se muestra una correlación positiva entre todos los compuestos de la ruta (**Figura 4.4**).

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN A. angustifolia POR UPLC-MS-QqQ

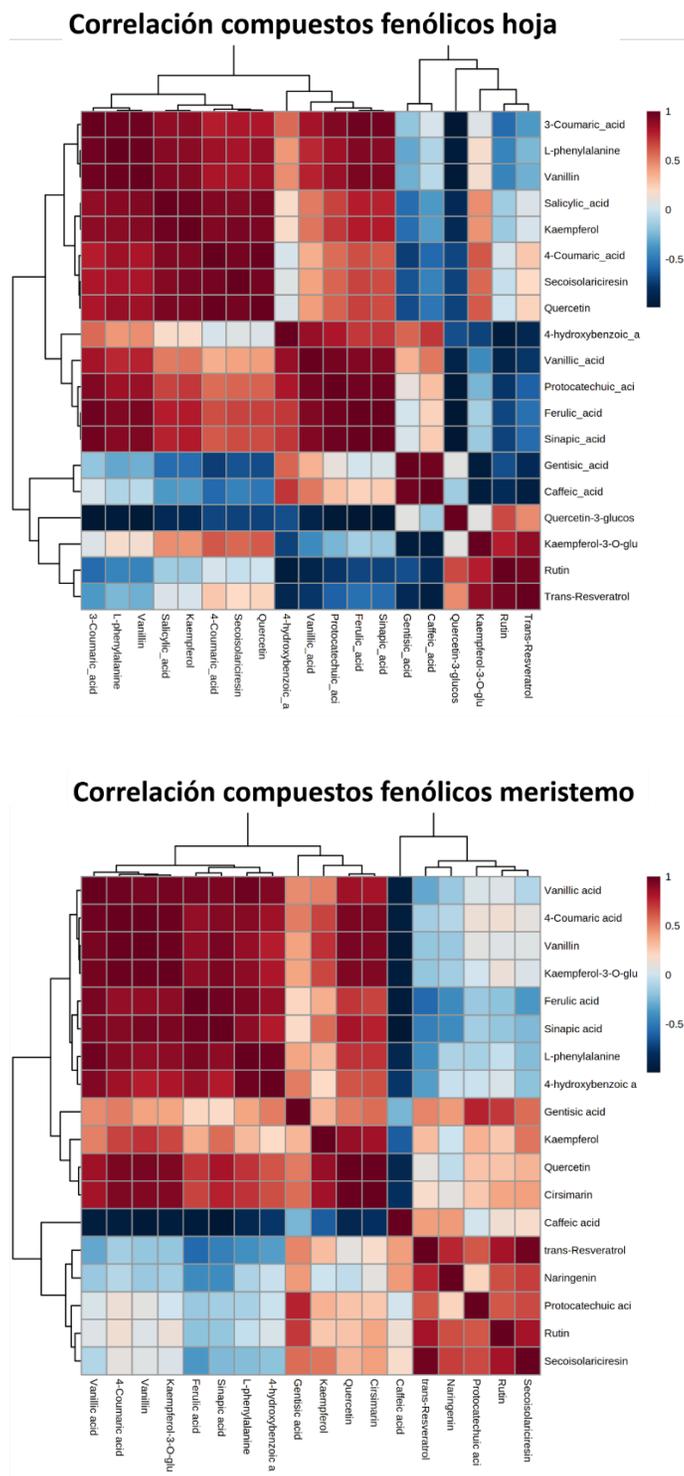


Figura 4.4 Análisis de correlación de los compuestos fenólicos en hoja y el meristemo de los tres fenotipos. Gráfico en mosaico como mapa de calor que nos indica los patrones de correlación positiva o negativa entre los compuestos de un

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

mismo tejido con una escala de color que va del rojo al azul, respectivamente.

Para los compuestos identificados en la ruta del BFP se encontró que tanto en hoja como en meristemo el fenotipo A mostró la mayor concentración de ácido felúrico (25.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en la hoja y 2.47 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en el meristemo) y ácido sinápico (5.92 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en la hoja y 8.18 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en el meristemo). Por otro lado, el fenotipo G presentó la mayor concentración de ácido cafeico (8.31 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en la hoja y 320.18 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en el meristemo). También, el fenotipo G tuvo la mayor concentración de ácido 4-cumárico (7.99 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms) y ácido 4-hidroxybenzoico (9.85 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms) en hoja, mientras que en meristemo los fenotipos A y V tuvieron la mayor concentración de ácido 4-cumárico (1.52 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en V y 1.63 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en A) y los fenotipos G y A la mayor concentración de ácido 4-hidroxybenzoico (2.19 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en G y 1.74 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en A) (**Cuadros 4.3 y 4.4**).

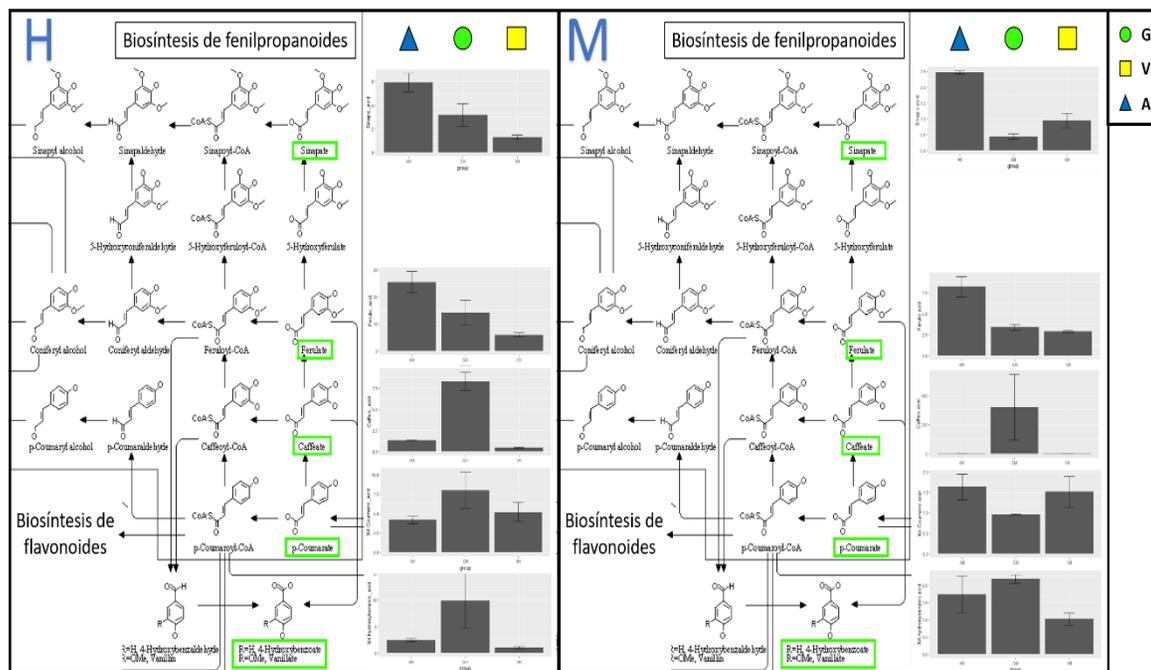


Figura 4.5 Compuestos en la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides identificados y cuantificados en hoja y meristemo de los tres fenotipos. Se muestran los compuestos identificados (rectángulo verde) y a su derecha los gráficos de la cuantificación en cada fenotipo con desviación estándar de seis réplicas, el análisis de Kruskal Wallis indicó diferencias significativas en todos los compuestos $P < 0.05$. La ruta de biosíntesis de fenilpropanoides fue obtenida de la base de datos en línea KEGG <https://www.kegg.jp/kegg->

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN A. angustifolia POR UPLC-MS-QqQ

bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map01061&keyword=flavonoid. GH: hoja fenotipo verde; GM: meristemo fenotipo verde; VH: hoja fenotipo variegado; VM: meristemo fenotipo variegado; AH: hoja fenotipo albino; AM: meristemo fenotipo albino.

En la ruta del BFF de la hoja, el fenotipo G tiene las mayores concentraciones en todos los compuestos (kaempferol 3-O-glucósido 55.15 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms, quercetina 6.08 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms, quercetina-3-glucósido 14.56 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms y rutina 41.50 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms) identificados con excepción del kaempferol, en la cual su mayor concentración la tiene el fenotipo A (kaempferol 0.80 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms). En el caso de la ruta del BFF, en el meristemo el fenotipo G tiene la mayor concentración de kaempferol (0.81 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms) mientras que el fenotipo A tiene la mayor concentración de kaempferol-3-O-glucósido (20.23 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms), por otro lado, el fenotipo V tiene la mayor concentración de quercetina (15.69 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms), así mismo los fenotipos G y V tienen la mayor concentración de rutina (0.91 $\mu\text{g g}^{-1}$ ms en ambos fenotipos).

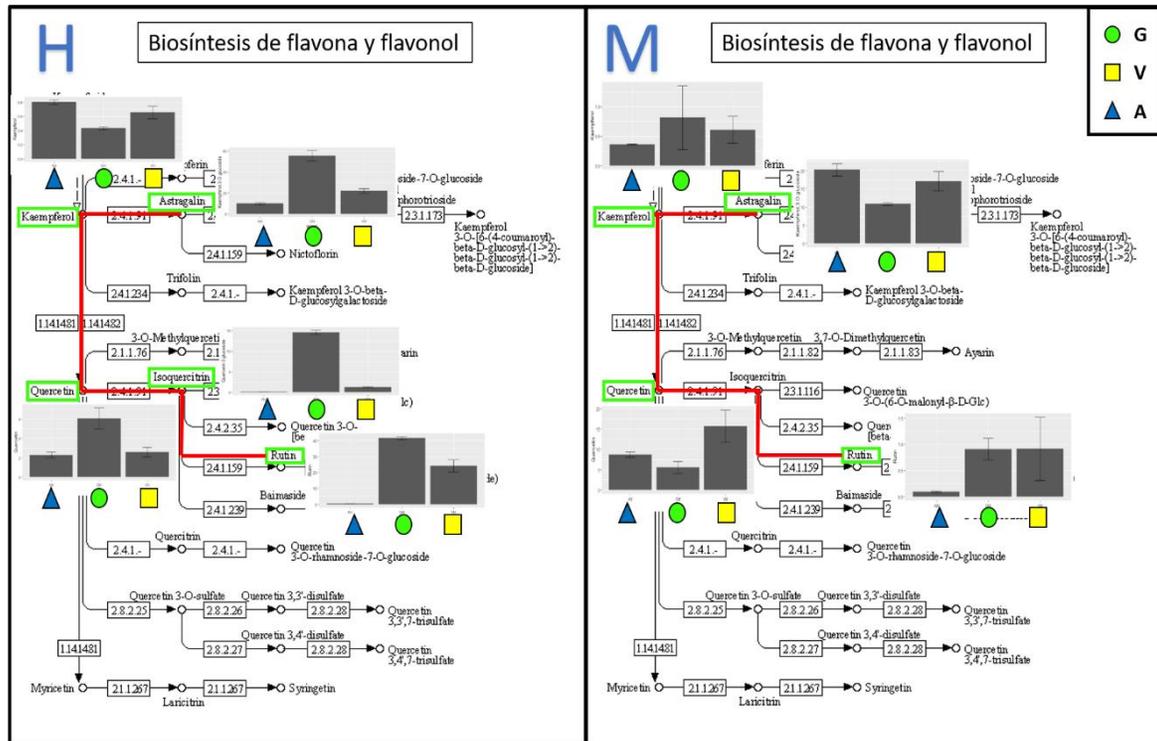


Figura 4.6 Compuestos en la ruta de biosíntesis de la flavona y el flavonol identificados y cuantificados de hoja y meristemo en los tres fenotipos. Se muestran los compuestos identificados (rectángulo verde) y a la derecha los

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

gráficos de la cuantificación en cada fenotipo con desviación estándar de 6 réplicas, el análisis de Kruskal Wallis indico diferencia significativa en todos los compuestos $P < 0.05$. La ruta de biosíntesis de la flavona y el flavonol fue obtenida de la base de datos en línea Kegg https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map00944&keyword=flavonoid.

4.4 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se identificaron compuestos de la ruta del BFF (cinco en hoja y cuatro en meristemo, **Figura 4.6**). Estos compuestos ya han sido reportados ampliamente por su actividad antioxidante y sus posibles acciones de señalización a través de la vía redox o al afectar las señales del H_2O_2 entre el cloroplasto y el núcleo (Brunetti *et al.*, 2019; Davies *et al.*, 2020). El análisis cuantitativo (**Figura 4.6**) mostró que el fenotipo G tuvo la mayor concentración de los compuestos identificados en la ruta de BFF en la H con respecto a los otros dos fenotipos. Este resultado coincide con los encontrados por Lee *et al.* (2020) quienes determinaron que los brotes verdes de *C. roseus* tienen una mayor concentración de fenoles totales y de flavonoides que los brotes albinos. Esta diferencia de concentración en la H entre el fenotipo G y A se encuentra muy marcada en los compuestos glicosilados de la ruta del BFF, en la cual el fenotipo G tiene concentraciones de rutina de más de 40 veces a la encontrada en el fenotipo A y cinco veces más en el kaempferol-3-O-glucósido (**Cuadro 4.3**). Sin embargo, en el meristemo se determinó que el fenotipo A tiene una concentración de kaempferol-3-O-glucósido del doble en comparación con el fenotipo G (**Cuadro 4.4**).

En los flavonoides es muy importante la glicosilación ya que esto le brinda estabilidad a la molécula, lo que contribuye a su actividad bioquímica y a su solubilidad (Zhang *et al.*, 2017b). En *Epimedium koreanum* se ha demostrado que las enzimas 3-O-glucosiltransferasas (3GT) catalizan la glicosilación, la galactosilación y la ramnosilación de varios flavonoides específicamente en la posición 3-OH (Lyu *et al.*, 2020). En la hoja del fenotipo A, la glicosilación de este tipo en moléculas como kaempferol y quercetina disminuye en comparación con el fenotipo G (**Cuadro 4.3 y Figura 4.6**), esto puede deberse a una baja actividad de las 3GT encargadas de la glicosilación. En este sentido, es interesante mencionar que con la disminución de la actividad de la dihidroflavonol-4-reductasa y la antocianidina sintasa también mostraron una disminución de la actividad de las 3GT, lo que sugiere que algunos genes que codifican para enzimas de la parte final de

CAPITULO IV. ANÁLISIS METABOLÓMICO DIRIGIDA: IDENTIFICACIÓN y CUANTIFICACIÓN DE FENOLES EN *A. angustifolia* POR UPLC-MS-QqQ

la vía de las antocianinas están co-regulados o pueden existir como un complejo funcional (Schijlen *et al.*, 2004).

Es importante mencionar que Us-Camas *et al.* (2017) reportaron que el ADN del fenotipo A de *A. angustifolia* se encontraba hipometilado, lo que puede causar la expresión de genes que estén interfiriendo con la actividad enzimática de la 3GT y podría explicar la baja concentración de kaempferol-3-O-glucósido, quercetina-3-glucósido y rutina en la ruta del BFF en la hoja de la planta albina (**Figura 4.6 y Cuadro 4.3**). Estos resultados refuerzan los resultados encontrados en los análisis de metabolómica no dirigida (Capítulo III) de este trabajo en el que se menciona que la ruta del BFF se encuentra intacta en el meristemo, sin embargo, en la hoja se determinó que existe una disminución de los compuestos glicosilados del fenotipo A en comparación con los de los fenotipos G y V. Es importante mencionar que estos resultados son diferentes a los encontrados en plantas albinas de té, ya que Zhang *et al.*, (2017b) reportaron que la acumulación de flavonoides glicosilados se vio beneficiada en comparación con su fenotipo verde. Sin embargo, las plantas de té se cultivaron en condiciones de campo, con luz y temperatura diferentes a las condiciones de laboratorio en las que se encuentra el fenotipo A de *A. angustifolia*, y por lo tanto la luz y la temperatura podrían ser otro factor que esté participando en la disminución de los compuestos glicosilados del fenotipo albino de *A. angustifolia*.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Tras el análisis de los extractos metanólicos de los fenotipos de *A. angustifolia* se concluye que:

Los extractos metanólicos particionados con hexano, diclorometano y acetato de etilo poseen actividad antioxidante.

Las rutas de BFP, BF y BFF se encuentran activas en los tres fenotipos, tanto en la hoja como en el meristemo.

El fenotipo verde tiene una mayor concentración en la mayoría de los compuestos de la ruta BFP en hoja, mientras que, el fenotipo albino tiene una mayor concentración en la mayoría de los compuestos de la ruta BFP en el meristemo.

La ruta BFF se encuentra intacta en los meristemos de los tres fenotipos.

La ruta del BFF del fenotipo albino en las hojas tiene una disminución en los compuestos glucosilados como kaempferol y quercetina.

Dado que se encontraron bajas cantidades de flavonoides glucosilados en el fenotipo albino, es necesario evaluar diferentes factores como: la actividad enzimática de las 3GT y las condiciones de temperatura y luz del cultivo.

Se necesita profundizar más en estudio de las rutas de BFP, BFF y BF con un enfoque “multi-ómico” basados en datos transcriptómicos y proteómicos de los tres fenotipos.

Se requiere profundizar en el análisis del metaboloma de los tres fenotipos con la identificación de las m/z obtenidas en la metabolómica no dirigida y apoyándose de las bases de datos disponibles.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbo, S., J. Berger y N. C. Turner (2003). Evolution of cultivated chickpea: Four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*, *30*, 1081–1087.
- Abdelhafez, O. H., E. M. Othman, J. R. Fahim , S. Y. Desoukey, S. M. Pimentel-Elardo, J. R. Nodwell, T. Schirmeister, A. Tawfike y U. R. Abdelmohsen (2020). Metabolomics analysis and biological investigation of three *Malvaceae* plants. *Phytochemical Analysis*, *31*, 204–214.
- Ahumada-Santos, Y. P., J. Montes-Avila, M. de J. Uribe-Beltrán, S. P. Díaz-Camacho, G. López-Angulo, R. Vega-Aviña, J. Á. López-Valenzuela, J. B. Heredia y F. Delgado-Vargas (2013). Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six *Agave* species from Sinaloa, Mexico. *Industrial Crops and Products*, *49*, 143–149.
- Almaraz-Abarca, N., E. A. Delgado-Alvarado, V. Hernández-Vargas, M. Ortega-Chávez, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, J. A. Ávila-Reyes y R. Muñiz-Martínez (2009). Profiling of Phenolic Compounds of Somatic and Reproductive Tissues of *Agave Durangensis* Gentry (*Agavaceae*). *American Journal of Applied Sciences*, *6*, 1076–1085.
- Alseekh, S., y A. R. Fernie (2018). Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain?. *Plant Journal*, *94*, 933–942.
- Arkorful, E., Y. Yu, C. Chen, L. Lu, S. Hu, H. Yu, Q. Ma, K. Thangaraj, R. Periakaruppan, A. Jeyaraj, X. Chen y X. Li (2020). Untargeted metabolomic analysis using UPLC-MS/MS identifies metabolites involved in shoot growth and development in pruned tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz). *Scientia Horticulturae*, *264*, 109-164.
- Armstrong, G. A., S. Runge, G. Frick, U. Sperling y K. Apel (1995). Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: A branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *108*, 1505–1517.
- Arup, U., S. Ekman, L. Lindblom y J. E. Mattsson (1993). High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), an improved technique for screening lichen substances. *The Lichenologist*, *25*, 61–71.

-
- Arzate-Fernández, A. M., J. L. Piña-Escutia, T. H. Norman-Mondragón, J. I. Reyes-Díaz, K. L. Guevara-Suárez y L. M. Vázquez-García (2016). Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *39*, 359–366.
- Azizi, P., M. M. Hanafi, M. Sahebi, J. A. Harikrishna, S. Taheri, A. Yassoralipour y A. Nasehi (2020). Epigenetic changes and their relationship to somaclonal variation: A need to monitor the micropropagation of plantation crops. *Functional Plant Biology*, *47*, 508–523.
- Bajaj, S., S. Wakode, W. Khan, S. Manchanda y S. Kumar (2018). Simultaneous HPTLC analysis and *in vitro* antileishmanic activity of various secondary metabolites in extract of the traditional medicinal herb *Artabotrys hexapetalus* (L.f.). *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda*, *39*, 92-100.
- Barreto, G. S. M. A., C. O. M. Cadavid, R. A. de O. Moura, G. M. M. Silva, S. V. F. d. Araújo, J. A. A. da S. Filho, H. A. O. Rocha, R. de P. Oliveira, R. B. Giordani y M. Ferrari (2020). *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Agave sisalana* agro-industrial residue. *Biomolecules*, *10*, 1435,
- Blomqvist, L. A., M. Ryberg y C. Sundqvist (2008). Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development. *Photosynthesis Research*, *96*, 37–50.
- Boonchaisri, S., T. Stevenson y D. A. Dias (2020). Utilization of GC–MS untargeted metabolomics to assess the delayed response of glufosinate treatment of transgenic herbicide resistant (HR) buffalo grasses (*Stenotaphrum secundatum* L.). *Metabolomics*, *16*, 1–25.
- Brunetti, C., F. Sebastiani y M. Tattini (2019). Review: ABA, flavonols, and the evolvability of land plants. *Plant Science*, *280*, 448–454.
- Cai, Z., P. Jia, J. Zhang, P. Gan, Q. Shao, G. Jin, L. Wang, J. Jin, J. Yang y J. Luo (2019). Genetic analysis and fine mapping of a qualitative trait locus *wpb1* for albino panicle branches in rice. *PloS One*, *14*, e0223228.
- Cancino-García, V. J., J. H. Ramírez-Prado y C. De-la-Peña (2020). Auxin perception in

- Agave* is dependent on the species' Auxin Response Factors. *Scientific Reports*, *10*, 3860.
- Cánovas, F. M., E. Dumas-Gaudot, G. Recorbet, J. Jorin, H. P. Mock y M. Rossignol (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, *4*, 285–298.
- Catchpole, G. S., M. Beckmann, D. P. Enot, M. Mondhe, B. Zywicki, J. Taylor, N. Hardy, A. Smith, R. D. King, D. B. Kell, O. Fiehn y J. Draper (2005). Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*, 14458-14462.
- Cerda, K. (2011). Evaluación del contenido de fenólicos, actividad antioxidante y efectos antidiabéticos de extractos de jarabes de agave (*A. atrovirens* Karw). Tesis de doctorado Instituto tecnológico y de estudios superiores de monterrey. pp. 42
- Chen, H., Z. Cheng, X. Ma, H. Wu, Y. Liu, K. Zhou, Y. Chen, W. Ma, J. Bi, X. Zhang, X. Guo, J. Wang, C. Lei, F. Wu, Q. Lin, Y. Liu, L. Liu y L. Jiang (2013). A knockdown mutation of yellow-green *LEAF2* blocks chlorophyll biosynthesis in rice. *Plant Cell Reports*, *32*, 1855–1867.
- Cheng, S., X. Fu, Y. Liao, X. Xu, L. Zeng, J. Tang, J. Li, J. Lai y Z. Yang (2019). Differential accumulation of specialized metabolite L-theanine in green and albino-induced yellow tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Chemistry*, *276*, 93–100.
- Chong, J., D. S. Wishart y J. Xia (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, *68*, e86.
- Christ, B., T. Pluskal, S. Aubry y J. K. Weng (2018). Contribution of untargeted metabolomics for future assessment of biotech crops. *Trends in Plant Science*, *23*, 1047-1056.
- De Klerk, G. J., J. Ter Brugge y S. Marinova (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in Malus "Jork 9". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *49*, 39–44.
- De Vos, R. C. H., S. Moco, A. Lommen, J. J. B. Keurentjes, R. J. Bino y R. D. Hall (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to

mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2, 778–791.

Dong, F., Y. Shi, M. Liu, K. Fan, Q. Zhang y J. Ruan (2018). iTRAQ-based quantitative proteomics analysis reveals the mechanism underlying the weakening of carbon metabolism in chlorotic tea leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3943.

Du, Y. Y., S. Shin, K. R. Wang, J. L. Lu y Y. R. Liang (2009). Effect of temperature on the expression of genes related to the accumulation of chlorophylls and carotenoids in albino tea. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84, 365–369.

Duarte-Aké, F., E. Castillo-Castro, F. B. Pool, F. Espadas, J. M. Santamaría, M. L. Robert y C. De-la-Peña (2016). Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia* Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process. *Plant Cell Reports*, 35, 1–14.

Duncan, A. C., A. K. Jäger y J. V. Staden (1999). Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 63–70.

El-Hawary, S. S., H. A. El-Kammar, M. A. Farag, D. O. Saleh y R. S. El Dine (2020). Metabolomic profiling of five *Agave* leaf taxa via UHPLC/PDA/ESI-MS in relation to their anti-inflammatory, immunomodulatory and ulceroprotective activities. *Steroids*, 160, 108-648.

Feng, L., M.-J. Gao, R.-Y. Hou, X.-Y. Hu, L. Zhang, X.-C. Wan y S. Wei (2014). Determination of quality constituents in the young leaves of albino tea cultivars. *Food Chemistry*, 155, 98–104.

Feng, Z., C. Ding, W. Li, D. Wang y D. Cui (2020). Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. *Food Chemistry*, 310, 125-914.

Ferdausi A., X. Chang, A. Hall y M. Jones (2020). Galanthamine production in tissue culture and metabolomic study on Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. *Industrial Crops and Products*, 144, 112058.

Fernie A. R. y T. Tohge (2017). The genetics of plant metabolism. *Annual Review of*

Genetics, 51, 287–310.

Fromme, P., A. Melkozernov, P. Jordan y N. Krauss (2003). Structure and function of photosystem I: Interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Letters*, 555, 40–44.

Frukh, A., A. Ahmad y T. O. Siddiqi (2019). Proteomics insights into salt stress signaling in plants. *Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments*. M. Iqbal R. Khan, Palakolanu Sudhakar Reddy, Antonio Ferrante y Nafees A. Khan (ed). Elsevier. pp. 479–497

Fukushima, A., M. Kusano, H. Redestig M. Arita y K. Saito (2009). Integrated omics approaches in plant systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, 532–538.

Gachon, C. M. M., M. Langlois-Meurinne y P. Saindrenan (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: The emerging functional analysis. *Trends in Plant Science*, 10, 542–549.

García-Curbelo, Y., Y. García-Curbelo, M. G. López, R. Bocourt, E. Collado, N. Albelo y O. Nuñez (2016). Structural characterization of fructans from *Agave fourcroydes* (Lem.) with potential as prebiotic. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49, 75-80.

Gentry, H. S. (1982). *Agaves of continental North America*. The University of Arizona. Tucson, AZ. pp. 564.

George E.F. y P.C. Debergh (2008). Micropropagation: Uses and Methods. En: *Plant propagation by tissue culture*, George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. (ed). Springer, Netherlands. pp. 29-64.

Griffiths, W. T. (1978). Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochemical Journal*, 174, 681–692.

Guclu-Ustundag, Ö., y G. Mazza (2007). Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231–258.

Gutiérrez Nava, Z., A. Jiménez-Aparicio, M. Herrera-Ruiz y E. Jiménez-Ferrer (2017). Immunomodulatory effect of *Agave tequilana* evaluated on an autoimmunity like-SLE

model induced in Balb/c mice with pristane. *Molecules*, *22*, 848.

Hernández-Bolio, G. I., E. Kutzner, W. Eisenreich, J. F. D. J. Torres-Acosta y L. M. Peña-Rodríguez (2018). The use of ¹H-NMR metabolomics to optimise the extraction and preliminary identification of anthelmintic products from the leaves of *Lysiloma latisiliquum*. *Phytochemical Analysis*, *29*, 413–420.

Hernández-Ramos L., R. García-Mateos, M. C. Ybarra-Moncada y M. T. Colinas-León (2020). Nutritional value and antioxidant activity of the maguey syrup (*Agave salmiana* and *A. mapisaga*) obtained through three treatments. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici cluj-Napoca*, *48*, 1306-1316.

Hernández-Valle, E., M. Herrera-Ruiz, G. R. Salgado, A. Zamilpa, M. L. A. Ocampo, A. J. Aparicio, J. Tortoriello y E. Jiménez-Ferrer (2014). Anti-inflammatory effect of 3-O-[(6'-O-palmitoyl)-β-D-glucopyranosyl sitosterol] from *Agave angustifolia* on ear edema in mice. *Molecules*, *19*, 15624–15637.

Ibarra-Cantún, D., M. E. Ramos-Cassellis, M. A. Marín-Castro, y R. D. C. Castelán-Vega, (2020). Secondary metabolites and antioxidant activity of the solid-state fermentation in apple (*Pirus malus* L.) and agave mezcalero (*Agave angustifolia* H.) Bagasse. *Journal of Fungi*, *6*, 137.

Juárez-Trujillo, N., J. L. Monribot-Villanueva, M. Alvarado-Olivarez, G. Luna-Solano, J.A. Guerrero-Analco y M. Jiménez-Fernández (2018). Phenolic profile and antioxidative properties of pulp and seeds of *Randia monantha* Benth. *Industrial Crops and Products*, *124*, 53–58.

Karnovsky, A. y S. Li (2020). Pathway analysis for targeted and untargeted metabolomics. *Methods in Molecular Biology*, *2104*, 387–400.

Karp, A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, *85*, 295–302.

Katalinic, V., M. Milos, T. Kulisic y M. Jukic (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, *94*, 550–557.

Kioroglou, D., A. Mas y M. C. Portillo (2020). Qualitative factor-based comparison of NMR,

- targeted and untargeted GC-MS and LC-MS on the metabolomic profiles of rioja and priorat red wines. *Foods*, *9*, 1381.
- Kogel, K. H., L. M. Voll, P. Schäfer, C. Jansen, Y. Wu, G. Langen, J. Imani, J. Hofmann, A. Schmiedl, S. Sonnewald, D. Von Wettstein, R. J. Cook y U. Sonnewald (2010). Transcriptome and metabolome profiling of field-grown transgenic barley lack induced differences but show cultivar-specific variances. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*, 6198–6203.
- Ku, Y.S., M.S. Ng, S.S. Cheng, A. W.Y. Lo, Z. Xiao, T.S. Shin, G. Chung y H.M. Lam (2020). Understanding the composition, biosynthesis, accumulation and transport of flavonoids in crops for the promotion of crops as healthy sources of flavonoids for human consumption. *Nutrients*, *12*, 1717.
- Kuiper, H. A., G. A. Kleter, H. P. J. M. Noteborn y E. J. Kok (2001). Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant Journal*, *27*, 503–528.
- Kyriacou, M. C., C. El-Nakhel, A. Pannico, G. Graziani, G. A. Soteriou, M. Giordano, M. Palladino, A. Ritieni, S. De Pascale y Y. Rouphael (2020). Phenolic constitution, phytochemical and macronutrient content in three species of microgreens as modulated by natural fiber and synthetic substrates. *Antioxidants*, *9*, 252.
- Larkin, P. J. y W. R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, *60*, 197–214.
- Lee, O. N., G. Ak, G. Zengin, Z. Cziáky, J. Jekő, K. R. R. Rengasamy, H. Y. Park, D. H. Kim y I. Sivanesan (2020). Phytochemical composition, antioxidant capacity, and enzyme inhibitory activity in callus, somaclonal variant, and normal green shoot tissues of *Catharanthus roseus* (L) G. Don. *Molecules*, *25*, 4945.
- Li, Y., W. Li, D. Hu, P. Shen, G. Zhang y Y. Zhu (2020). Comparative analysis of the metabolome and transcriptome between green and albino zones of variegated leaves from *Hydrangea macrophylla* 'Maculata' infected by *Hydrangea ringspot* virus. *Plant Physiology and Biochemistry*, *157*, 195–210.
- López-Salazar, H., B. H. Camacho-Díaz, S. V. Ávila-Reyes, M. D. Pérez-García, M.

- González-Cortazar, M. L. Arenas Ocampo y A. R. Jiménez-Aparicio (2019). Identification and quantification of β -sitosterol β -d-glucoside of an ethanolic extract obtained by microwave-assisted extraction from *Agave angustifolia* Haw. *Molecules*, *24*, 3926.
- Loyola-Vargas, V. M., C. De-La-Peña, R. M. Galaz-Ávalos y F. R. Quiroz-Figueroa (2008). Plant tissue culture, en: *Molecular Biomethods Handbook: Second Edition*, Walker, J.M y Rapley, R. (eds). Humana Press, 875–904.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo (2012). An introduction to plant cell culture: The future ahead, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V.M. y Ochoa-Alejo, N. (eds). Humana Press, 877, 1–8.
- Loyola-Vargas, V.M. y N. Ochoa-Alejo (2016). Somatic embryogenesis. An overview, en: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V.M. y Ochoa-Alejo, N. (eds). Springer International Publishing. Switzerland. pp. 1–8.
- Lyu, Y., S. Liu, S. Gao y J. Zhou (2020). Identification and characterization of three flavonoid 3-O-glycosyltransferases from *Epimedium koreanum* Nakai. *Biochemical Engineering Journal*, *163*, 107759.
- Maazoun, A. M., S. H. Hamdi, F. Belhadj, J. M. Ben Jemâa, C. Messaoud y M. N. Marzouki (2019). Phytochemical profile and insecticidal activity of *Agave americana* leaf extract towards *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: *Curculionidae*). *Environmental Science and Pollution Research*, *26*, 19468–19480.
- Matsuda, F., M. Y. Hirai, E. Sasaki, K. Akiyama, K. Yonekura-Sakakibara, N. J. Provart, T. Sakurai, Y. Shimada y K. Saito (2010). AtMetExpress development: A phytochemical atlas of *Arabidopsis* development. *Plant Physiology*, *152*, 566–578.
- McCauley, C. L., S. A. M. McAdam, K. Bhide, J. Thimmapuram, J. A. Banks y B. G. Young (2020). Transcriptomics in *Erigeron canadensis* reveals rapid photosynthetic and hormonal responses to auxin-herbicide application. *Journal of Experimental Botany*, *71*, 3701-3709.
- Mellado-Mojica, E. y López, M. G. (2012). Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 60, 11704–11713.

Monja-Mio, K. M. (2013). Embriogénesis somática de Agave en bioreactores de inmersión temporal. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.

Monribot-Villanueva, J. L., J. M. Elizalde-Contreras, M. Aluja, A. Segura-Cabrera, A. Birke, J. A. Guerrero-Analco y E. Ruiz-May (2019). Endorsing and extending the repertory of nutraceutical and antioxidant sources in mangoes during postharvest shelf life. Food Chemistry, 285, 119–129.

Monterrosas-Brisson, N., M. Ocampo, E. Jiménez-Ferrer, A. Jiménez-Aparicio, A. Zamilpa, M. Gonzalez-Cortazar, J. Tortoriello y M. Herrera-Ruiz (2013). Anti-inflammatory activity of different Agave plants and the compound cantalasonin-1. Molecules, 18, 8136–8146.

Moon, S. H., M. Pandurangan, D. H. Kim, J. Venkatesh, R. V. Patel y B. M. Mistry (2018). A rich source of potential bioactive compounds with anticancer activities by *Catharanthus roseus* cambium meristematic stem cell cultures. Journal of Ethnopharmacology, 217, 107–117.

Nadel, B. L., A. Altman y M. Ziv (1990). Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. Early detection of embryogenic potential and the induction of synchronized cell cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20, 119–124.

Nic-Can, G. I., R. M. Galaz-Ávalos, C. De-la-Peña, A. Alcazar-Magaña, K. Wrobel y V. M. Loyola-Vargas (2015). Somatic embryogenesis: identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. PLOS ONE, 10, 1-21.

Noormohammadi, Z., H. Habibollahi, F. Farahani y M. Sheidai (2020). Molecular analysis of somaclonal variation in *Linum usitatissimum* and *L. album*. Plant Gene, 24, 100261.

Ogegbo, O. L., S. Eyob, S. Parmar, Z.T Wang y S. W. Annie Bligh (2012). Metabolomics of four TCM herbal products: application of HPTLC analysis. Analytical Methods, 4, 2522–2527.

Olvera-García, V., S. T. Martín del Campo, J. A. Gutiérrez-Urbe y A. Cardador-Martínez (2015). GC-MS and HPLC-MS-TOF characterization of *Agave atrovirens* extracts. A

preliminary study. *Industrial Crops and Products*, 78, 39–47.

Oosawa, N., T. Masuda, K. Awai, N. Fusada, H. Shimada, H. Ohta y K. Takamiya, (2000). Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 474, 133–136.

Pan, Q., N. R. Mustafa, R. Verpoorte y K. Tang (2016). ¹³C-Isotope-labeling experiments to study metabolism in *Catharanthus roseus*. *Metabolomics - Fundamentals and Applications*, 5, 97-117

Patti, G. J., O. Yanes y G. Siuzdak (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 263–269.

Peer, W. A. y A. S. Murphy (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*, 12, 556–563.

Pereira, G. M., M. G. Ribeiro, B. P. da Silva y J. P. Parente (2017). Structural characterization of a new steroidal saponin from *Agave angustifolia* var. *marginata* and a preliminary investigation of its in vivo antiulcerogenic activity and in vitro membrane permeability property. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27, 4345–4349.

Pham, H. N. T., J. A. Sakoff, Q. Van Vuong, M. C. Bowyer y C. J. Scarlett (2018). Screening phytochemical content, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don stem extract and its fractions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 405–411.

Potrykus, I. (2015). From the concept of totipotency to biofortified cereals. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 1–22.

Puente-Garza, C. A., C. A. Espinosa-Leal y S. García-Lara (2018). Steroidal saponin and flavonol content and antioxidant activity during sporophyte development of maguey (*Agave salmiana*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 73, 287–294.

Raji, P., A. V. Samrot, D. B. Rohan, P. D. Kumar, R. Geetika, V. K. Sharma y D. Keerthana (2019). Extraction, characterization and *in vitro* bioactivity evaluation of alkaloids, flavonoids, saponins and tannins of *Cassia alata*, *Thespesia populnea*, *Euphorbia hirta*

-
- and *Wrightia tinctoria*. *Rasayan Journal of Chemistry*, 12, 123–137.
- Reinbothe, S., C. Reinbothe, H. Holtorf y K. Apel (1995). Two NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases in barley: Evidence for the selective disappearance of PORA during the light-induced greening of etiolated seedlings. *Plant Cell*, 7, 1933–1940.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller y G. Paganga (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152–159.
- Ristivojević, P., F. L. Andrić, J. D. Trifković, I. Vovk, L. Z. Stanisavljević, Ž. L. Tešić y D. M. Milojković-Opsenica (2014). Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts. *Journal of Chemometrics*, 28, 301–310.
- Rizwan, K., M. Zubair, N. Rasool, M. Riaz, M. Zia-Ul-Haq y V. de Feo (2012). Phytochemical and Biological Studies of *Agave attenuata*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 6440–6451.
- Robert M.L., J.L. Herrera, J.L. Chan y F. Contreras (1992) Micropropagation of *Agave* spp.. En: High-Tech and Micropropagation III, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Y.P.S. Bajaj (ed). Springer. Berlin. pp. 306-329
- Robert, M.L., J. L. Herrera, F. Contreras y K. N. Scorer (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8, 37–48.
- Rocchetti, G., B. Senizza, G. Zengin, M. F. Mahomodally, I. Senkardes, D. Lobine y L. Lucini (2020). Untargeted metabolomic profiling of three *Crataegus* species (hawthorn) and their *in vitro* biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 1998–2006.
- Ruf, S., J. Forner, C. Hasse, X. Kroop, S. Seeger, L. Schollbach, A. Schadach y R. Bock, (2019). High-efficiency generation of fertile transplastomic *Arabidopsis* plants. *Nature Plants*, 5, 282–289.
- Saito, K. y F. Matsuda (2010). Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 463–489.
- Sakuraba, Y., M. L. Rahman, S.H. Cho, Y.S. Kim, H.J. Koh, S.C. Yoo y N.C. Paek (2013).

The rice *faded green leaf* locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions. *The Plant Journal*, *74*, 122–133.

Santacruz-Ruvalcaba, F. y L. Portillo (2009). Thin cell suspension layer as a new methodology for somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Industrial Crops and Products*, *29*, 609–614.

Santos-Zea, L., A. Leal-Díaz, E. Cortes-Ceballos y J. Gutiérrez-Urbe (2012). *Agave* (*Agave spp.*) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Current Bioactive Compounds*, *8*, 218–231.

Santos, J. D. G., A. Branco, A. F. Silva, C. S. R. Pinheiro, A. Góes Neto, A. P. T. Uetanabaro, S. R. O. D. Queiroz y J. T. A. Osuna (2009). Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. *African Journal of Biotechnology*, *8*, 6181–6184.

Scalbert, A., C. Manach, C. Morand, C. Rémésy y L. Jiménez (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*, 287–306.

Schijlen, E. G. W. M., C. H. Ric De Vos, A. J. Van Tunen y A. G. Bovy (2004). Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, *65*, 2631–2648.

Shewiyo, D. H., E. Kaale, P. G. Risha, B. Dejaegher, J. Smeyers-Verbeke y Y. Heyden (2012). HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: A review of the method development and validation steps. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *66*, 11–23.

Shimamoto, K. y J. Kozuka (2002). Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology*, *53*, 399–419.

Skirvin, R. M., K. D. McPheeters y M. Norton (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *Hort Science*, *29*, 1232–1237.

Solano-De La Cruz, M. T., J. Adame-García, J. Gregorio-Jorge, V. Jiménez-Jacinto, L. Vega-Alvarado, L. G. Iglesias-Andreu, E. E. Escobar-Hernández y M. Luna-Rodríguez (2019). Functional categorization of *de novo* transcriptome assembly of *Vanilla*

- planifolia* Jacks. potentially points to a translational regulation during early stages of infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *BMC Genomics*, 20, 1–15.
- Tewari, D., Y. C. Tripathi y N. Anjum (2014). *Agave sisalana*: a plant with high chemical diversity and medicinal importance. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 3, 238–249
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231–1246.
- Us-Camas, R., E. Castillo-Castro, M. Aguilar-Espinosa, V. Limones-Briones, R. Rivera-Madrid, M. L. Robert-Díaz y C. De-la-Peña (2017). Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science*, 263, 156–167.
- Veilleux, R. E. y A. A. T. Johnson (1998). Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breeding Reviews*, 16, 229–266.
- Vincken, J. P., L. Heng, A. de Groot y H. Gruppen, (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275–297.
- Wang, L., H. Cao, C. Chen, C. Yue, X. Hao, Y. Yang y X. Wang (2016). Complementary transcriptomic and proteomic analyses of a chlorophyll-deficient tea plant cultivar reveal multiple metabolic pathway changes. *Journal of Proteomics*, 130, 160–169.
- Wang, P., Y. Zheng, Y. Guo, B. Liu, S. Jin, S. Liu, F. Zhao, X. Chen, Y. Sun, J. Yang y N. Ye, (2020). Widely targeted metabolomic and transcriptomic analyses of a novel albino tea mutant of “rougui.” *Forests*, 11, 229.
- Wang, Y., X. Li, H. Sun, K. Yi, J. Zheng, J. Zhang y Z. Hao (2014). Biotransformation of steroidal saponins in sisal (*Agave sisalana* Perrine) to tigogenin by a newly isolated strain from a karst area of Guilin, China. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28, 1024–1033.
- Weckwerth, W. (2003). Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 669–689.
- Wishart, D. S., J. Godzien, A. Gil-De-La-Fuente, R. Mandal, R. Rajabzadeh, H.

- Pirimoghadam, C. Ladner-Keay, A. Otero, y C. Barbas (2020). Metabolomics. En: Processing Metabolomics and Proteomics Data with Open Software. Winkler R. (ed). Royal society of chemistry. pp 26–40.
- Wu, C., F. Zhou, J. Ren, X. Li, Y. Jiang y S. Ma (2019). A selective review of multi-level omics data integration using variable selection. *High-Throughput*, 8, 1–25.
- Wu, L. Y., Z. T. Fang, J. K. Lin, Y. Sun, Z. Z. Du, Y. L. Guo, J. H. Liu, Y. R. Liang y J. H. Ye, (2019). Complementary iTRAQ proteomic and transcriptomic analyses of leaves in tea plant (*Camellia sinensis* L.) with different maturity and regulatory network of flavonoid biosynthesis. *Journal of Proteome Research*, 18, 252–264.
- Xiong, Q., C. Cao, T. Shen, L. Zhong, H.H. He y X. Chen (2019). Comprehensive metabolomic and proteomic analysis in biochemical metabolic pathways of rice spikes under drought and submergence stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1867, 237–247.
- Yuan, N., J. Wang, Y. Zhou, D. An, Q. Xiao, W. Wang y Y. Wu (2019). EMB-7L is required for embryogenesis and plant development in maize involved in RNA splicing of multiple chloroplast genes. *Plant Science*, 287, 110203.
- Zhang, A., H. Sun, P. Wang, Y. Han, y X. Wang (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst*, 137, 293–300.
- Zhang, C., M. Wang, X. Gao, F. Zhou, C. Shen y Z. Liu (2020). Multi-omics research in albino tea plants: Past, present, and future. *Scientia Horticulturae*, 261, 108943.
- Zhang, Q., M. Liu y J. Ruan (2017a). Integrated transcriptome and metabolic analyses reveals novel insights into free amino acid metabolism in huangjinya tea cultivar. *Frontiers in Plant Science*, 8, 291.
- Zhang, Q., M. Liu y J. Ruan (2017b). Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. *BMC Plant Biology*, 17, 1–10.
- Zhang, Q., D. Tang, M. Liu y J. Ruan (2018). Integrated analyses of the transcriptome and metabolome of the leaves of albino tea cultivars reveal coordinated regulation of the

carbon and nitrogen metabolism. *Scientia Horticulturae*, 231, 272–281.

Anexo

Anexo 1 Concentraciones de los compuestos del medio de cultivo MSB

Stock	Reactivo	Concentración en 1L de stock	Concentración en 1L de medio
1	Glicina	2.6 mM	26.42 μ M
1	Ácido nicotínico	406.14 μ M	4.06 μ M
1	Pindoxina	295.54 μ M	2.95 μ M
1	Tiamina	37.68 μ M	376.85 nM
1	Inositol	55.5 mM	555.06 μ M
2	KI	499.99 μ M	4.9 μ M
2	MnSO ₄ ·H ₂ O	9.9 mM	99.9 μ M
2	H ₃ BO ₃	10.02 mM	100.27 μ M
2	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.99 mM	29.9 μ M
2	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	103.32 μ M	1.03 μ M
2	CuSO ₄ ·5H ₂ O	10.01 μ M	100.12 nM
2	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.5 μ M	105.07 nM
3	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	150.11 mM	1.5 mM
3	KH ₂ PO ₄	124.92 mM	1.24 mM
4	KNO ₃	1.8 M	18 mM
4	NH ₄ NO ₃	499.72 mM	4.99 mM
5	CaCl ₂ ·2H ₂ O	299.28 mM	2.99 mM
6	ácido etilendiaminotetracético sal de hierro-sodio (EDFS)	8.72 mM	87.22 μ M

Anexo 2 Condiciones para cada compuesto fenólico en el UPLC-MS-QqQ.

Compuesto	transición dMRM		Condiciones de espectrometría de masas				Condiciones de cuantificación		R ²
	Ion precursor	Ion de producto	Tiempo de retención	Energía de colisión	Fragmentador	Polaridad	Rango de cuantificación (μ M)	Tipo de regresión	
Ácido shikímico	173.1	111.1	0.48	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido gálico	169.0	125.2	1.17	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
L-fenilalanina	166.1	131.0	1.85	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99

Ácido protocatechico	153.0	109.1	2.23	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido 4-hidroxibenzoico	137.1	92.8	3.43	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido gentísico	153.0	109.0	3.43	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
(-) - Epigallocatequina	305.1	125.0	4.27	20	140	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido 4-hidroxifenilacético	107.1	77.0	4.5	20	140	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
(+)-Catequina	291.0	138.9	4.58	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido vainílico	169.0	93.0	4.75	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Escopolina	355.1	193.0	4.83	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido cafeico	181.0	163.0	4.90	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido clorogénico	355.1	163.0	4.90	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Malvina	655.1	331.1	5.22	40	100	Positive	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Kuromanina	449.0	286.9	5.6	30	100	Positive	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Procianidina B2	577.1	425.1	5.89	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Vanillina	153.0	124.9	6.16	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Keracianina	595.2	287.1	6.18	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99

(-)-Epicatequina	291.0	138.8	6.44	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Mangiferina	423.0	302.0	6.64	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido 4-cumárico	165.0	147.0	6.69	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Umbeliferona	163.0	107.0	7.16	30	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
(-) - Galato de galocatequina	458.9	139.0	7.29	20	80	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Escopoletina	193.0	133.0	7.86	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido ferúlico	195.1	145.0	8.1	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Quercetina 3,4-di-O-glucósido	627.0	302.9	8.18	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido 3-cumárico	165.0	147.0	8.49	10	100	Positive	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido sinápico	225.1	207.1	8.58	10	100	Positive	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido salicílico	137.0	93	8.97	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido elágico	300.5	145.0	9.0	30	170	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Galato de epicatequina	443.1	123.0	9.36	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Miricitrina	465.0	318.9	9.38	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Quercetina 3-D-galactósido	465.0	302.9	9.58	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Rutina	611.0	302.9	9.74	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99

Quercetina 3-glucósido	465.0	303.0	9.91	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Luteolina 7-O-glucósido	449.0	287.0	10.24	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido p-anísico	153.1	109.0	10.26	5	120	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido 2,4-dimetoxi-6-metilbenzoico	197.0	179.0	11.11	5	80	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Penta-O-galloil-B-D-glucosa	771.1	153.0	11.23	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Kaemperol 3-O-glucósido	449.0	286.9	11.27	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Quercitrina	449.1	303.1	11.34	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Miricetina	317.0	179.0	11.49	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Naringina	273.0	153.0	11.89	10	120	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
trans-Resveratrol	229.1	135.1	11.94	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido rosmarínico	361.1	163.0	12.35	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Hesperidina	609.1	301.1	12.48	20	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Secoisolariciresinol	363.2	137.1	12.58	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Floridzina	435.0	272.9	12.81	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido trans-cinámico	149.1	131.0	13.93	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Psoralen	187.0	131.1	14.24	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99

Quercetina	302.9	153.1	14.47	35	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Luteolina	287.1	153.0	14.56	30	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Cirsimarina	477.0	314.9	14.93	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Angelicina	187.0	131.1	15.03	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Naringenina	271.0	151	16.2	10	100	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Apigenina	271.0	153.0	16.72	30	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Citropten	207.0	192.0	16.92	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Matairesinol	359.2	137.1	17.02	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Kaempferol	287.1	153.0	17.09	30	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Hesperetina	303.1	177.1	17.5	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Podofilotoxina	415.1	397.1	18.68	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Cinamato de metilo	163.1	131.0	20.92	6	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Crisina	255.1	153.0	22.53	40	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Ácido nordihidroguaiarético	303.0	193.1	22.91	10	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Kaempferido	301.0	258.2	24.05	20	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99
Emodina	269.0	225.0	27.29	20	150	Negativo	0.25 - 18	Cuadrática	0.99

Crisofanol	255.1	153.0	30.89	40	100	Positivo	0.25 - 18	Cuadráti ca	0.9 9
-------------------	-------	-------	-------	----	-----	----------	-----------	----------------	----------

Anexo 3. Compuestos de las rutas BFP, BF y BFF en la hoja del fenotipo verde.

Hoja verde					
Compuesto	m/z	Clave de KEEG	Ion	Tiempo de retención	Diferencia de masa
(-)-Epiafzelequina	273.0762	C12128	[M-H] ⁻	3.56	0.0006471
(-)-Epicatequina	271.0603	C09727	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.09	0.0008617
(-)-Epigallocatequina	287.0555	C12136	[M- H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.0005763
(+)-Catequina	271.0603	C06562	[M- H ₂ O-H] ⁻	7.09	0.0008617
(+)-Galocatequina	287.0555	C12127	[M- H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.0005763
4-Coumaroilshikimato	301.0708	C02947	[M- H ₂ O-H] ⁻	6.29	0.0009235
Afzelequina	273.076	C09320	[M-H] ⁻	4.65	0.0008471
Buteinaa	271.0603	C08578	[M-H] ⁻	7.09	0.0008935
Butinaa	271.0603	C09614	[M-H] ⁻	7.09	0.0008935
cis-3,4-Leucopelargonidinaa	271.0603	C03648	[M- H ₂ O-H] ⁻	7.09	0.0008617
Delfinidina	284.0318	C05908	[M- H ₂ O-H] ⁻	3.72	0.0002535
Dihidrokaempferol	287.0555	C00974	[M-H] ⁻	5.09	0.0006116
Dihidromyricetina	303.0495	C02906	[M- [H ₂ O+H] ¹⁺	4.25	0.0003965
Dihidrotricetina	287.0552	C05911	[M- H ₂ O+H] ¹⁺	3.71	0.0002235
Eriodictiol	287.0555	C05631	[M-H] ⁻	5.09	0.0006116
Eriodictiol chalcona	287.0555	C15525	[M-H] ⁻	5.09	0.0006116
Fustina (dihidrofisetina)	287.0555	C01378	[M-H] ⁻	5.09	0.0006135
Garbanzol	271.0603	C09751	[M-H] ⁻	7.09	0.000897
Homoeriodictiol chalcona	301.0708	C16405	[M-H] ⁻	6.29	0.0009635
Kaempferol	287.0552	C05903	[M+H] ¹⁺	3.71	0.0001855
Kaempferol 3-O-glucósido (Astragalina)	447.0936	C12249	[M-H] ⁻	4.91	0.000315
Kaempferol 3-O-ramnósido-7-O-glucoside	609.1457	C21854	[M-H+O] ⁻	3.78	0.0004335
Kaempferol-3-O-rutinosido (nictoflorina)	593.1509	C21833	[M-H] ⁻	3.72	0.0003235
Leucocianidina	287.0555	C05906	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.0005735
Luteolinaa	287.0552	C01514	[M+H] ¹⁺	3.71	0.0001855
Naringenina	271.0603	C00509	[M-H] ⁻	7.09	0.000897
Naringenina chalcona	271.0603	C06561	[M-H] ⁻	7.09	0.000897

Floretina	273.076	C00774	[M-H] ⁻	2.46	0.0008471
Quercetina	303.0495	C00389	[M+H] ¹⁺	4.25	0.0004291
Quercetina 3-O-glucósido (Isoquercitrina)	463.0882	C05623	[M-H] ⁻	4.45	3.63E-07
Quercetina 3-O-ramnósido 7-O-glucósido	609.1463	C19796	[M-H] ⁻	4.3	0.0001765
Quercitrina	447.0936	C01750	[M-H] ⁻	4.91	0.000315
Rutina	625.1405	C05625	[M-H+O] ⁻	4.3	0.0005184
Sakuranetina	285.0761	C09833	[M-H] ⁻	3.8	0.0007471
Taxifolina (dihidroquercetina)	287.0552	C01617	[M] ⁻ [H ₂ O+H] ¹⁺	3.71	0.0002235

Anexo 4. Compuestos de las rutas BFP, BF y BFF en la hoja del fenotipo variegado.

Hoja variegada					
Compuesto	m/z	Clave de KEEG	Ion	Tiempo de retención	Diferencia de masa
Delfinidina	284.0318	C05908	[M-H ₂ O-H] ⁻	3.72	0.00025353
Kaempferol	285.0396	C05903	[M-H] ⁻	5.49	0.00086159
Kaempferol 3-O-glucósido (astragalina)	447.0936	C12249	[M-H] ⁻	4.91	0.00031499
Kaempferol 3-O-rhamnósido-7-O-glucósido	609.1457	C21854	[M-H+O] ⁻	3.78	0.00043353
Kaempferol-3-O-rutinósido (nictoflorina)	593.1509	C21833	[M-H] ⁻	3.72	0.00032353
Luteolina	285.0396	C01514	[M-H] ⁻	5.49	0.00086159
Pentahydroxiflavanona (dihidrotricetina)	285.0396	C05911	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.49	0.00082353
Quercetina 3-O-glucósido (isoquercitrina)	463.0882	C05623	[M-H] ⁻	4.45	3.63E-07
Quercetina 3-O-ramnósido 7-O-glucósido	609.1463	C19796	[M-H] ⁻	4.3	0.00017647
Quercitrina	447.0929	C01750	[M-H] ⁻	3.73	0.00038502
Rutina	609.1455	C05625	[M-H] ⁻	3.26	0.00060845
Sakuranetina	285.0761	C09833	[M-H] ⁻	3.8	0.00074709
Taxifolina	285.0396	C01617	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.49	0.00082353

Anexo 5. Compuestos de las rutas BFP, BF y BFF en la hoja del fenotipo albino.

HOJA ALBINA					
compuesto	m/z	Clave de KEEG	Ion	Tiempo de retención	Diferencia de masa
(+)-Catequina	271.0604	C06562	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.08	0.0007617
(-)-Epicatequina	271.0604	C09727	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.08	0.0007617
Buteina	271.0604	C08578	[M-H] ⁻	5.08	0.0007935
Butina	271.0604	C09614	[M-H] ⁻	5.08	0.0007935
cis-3,4-Leucopelargonidina	271.0604	C03648	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.08	0.0007617
Garbanzol	271.0604	C09751	[M-H] ⁻	5.08	0.000797
Delfinidina	284.0317	C05908	[M-H ₂ O-H] ⁻	3.29	0.0003535
Homoeriodictiol chalcona (4,2,4,6 tetrahidroxi-3-methoxichalcona)	283.0605	C16405	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.85	0.0006635
Kaempferina	431.098	C16911	[M-H] ⁻	4.85	0.0003735
Kaempferol	285.0396	C05903	[M-H] ⁻	5.49	0.0008616
Luteolina	285.0396	C01514	[M-H] ⁻	5.49	0.0008616
Naringenina	271.0604	C00509	[M-H] ⁻	5.08	0.000797
Naringenina chalcona	271.0604	C06561	[M-H] ⁻	5.08	0.000797
Pentahydroxiflavona	285.0396	C05911	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.49	0.0008235
Pinobanksina	595.166	C09826	[M-H] ⁻	4.41	0.0008439
Sakuranetina	285.0761	C09833	[M-H] ⁻	7.72	0.0007471
Taxifolina	285.0396	C01617	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.49	0.0008235

Anexo 6. Compuestos de las rutas BFP, BF y BFF en el meristemo del fenotipo verde.

Meristemo verde					
compuesto	m/z	Clave de KEEG	Ion	Tiempo de retención	Diferencia de masa
(-)-Epiarzelequina	273.0756	C12128	[M-H] ⁻	6.25	0.0012471
(-)-Epicatequina	271.0603	C09727	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.09	0.0008617
(-)-Epigallocatequina	287.0555	C12136	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.0005763

(+)-Catequina	271.0603	C06562	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.09	0.00086 17
(+)-Galocatequina	287.0555	C12127	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.00057 63
4-Cumaroilshikimato	301.0708	C02947	[M-H ₂ O-H] ⁻	6.29	0.00092 35
Ácido 5-O-Cafeoilshikímico	317.0657	C10434	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.57	0.00094 1
Afzelequina	273.0756	C09320	[M-H] ⁻	6.25	0.00124 71
Apigenina	269.0446	C01477	[M-H] ⁻	7.58	0.00094 7
Buteina	271.0603	C08578	[M-H] ⁻	7.09	0.00089 35
Butina	331.0815	C09614	[M+CH ₃ COO] ⁻	6.86	0.00026 5
cis-3,4-Leucopelargonidina	271.0603	C03648	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.09	0.00086 17
Dihidrokaempferol	287.0555	C00974	[M-H] ⁻	5.09	0.00061 16
Eriodictiol	269.0446	C05631	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.58	0.00091 16
Eriodictiol chalcone	269.0446	C15525	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.58	0.00091 16
Fustina	269.0446	C01378	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.58	0.00091 35
Galangina	285.0397	C10044	[M-H+O] ⁻	7.29	0.00075 7
Garbanzol	331.0815	C09751	[M+CH ₃ COO] ⁻	6.86	0.00026 85
Homoeriodictiol chalcona	301.0708	C16405	[M-H] ⁻	6.29	0.00096 35
Kaempferol	285.0397	C05903	[M-H] ⁻	7.29	0.00076 16
Kaempferol 3-O-glucósido (astragalina)	447.0936	C12249	[M-H] ⁻	4.91	0.00031 5
Kaempferol 3-O-ramnósido-7-O-glucósido	609.1457	C21854	[M-H+O] ⁻	3.78	0.00043 35
Kaempferol-3-O-rutinaósido	593.1509	C21833	[M-H] ⁻	3.72	0.00032 35
Leucocianidina	287.0555	C05906	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.00057 35
Luteolina	285.0397	C01514	[M-H] ⁻	7.29	0.00076 16
Naringenina	271.0603	C00509	[M-H] ⁻	7.09	0.00089 7
Naringenina chalcona	331.0815	C06561	[M+CH ₃ COO] ⁻	6.86	0.00026 85
Pentahidroxi flavanona (dihidrotricetina)	285.0397	C05911	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.29	0.00072 35

Floretina	273.0756	C00774	[M-H] ⁻	6.25	0.00124 71
Pinobanksina	577.1555	C09826	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.29	0.00074 39
Quercetina 3-O-glucósido (isoquercitrina)	463.0882	C05623	[M-H] ⁻	4.45	3.63E-07
Quercetina 3-O-ramnósido 7-O-glucósido	609.1463	C19796	[M-H] ⁻	4.3	0.00017 65
Quercitrina	447.0936	C01750	[M-H] ⁻	4.91	0.00031 5
Rutina	609.1457	C05625	[M-H] ⁻	3.78	0.00040 84
Sakuranetina	285.0755	C09833	[M-H] ⁻	9.41	0.00134 71
Taxifolina (dihidroquercetina)	285.0397	C01617	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.29	0.00072 35

Anexo 7. Compuestos de las rutas BFP, BF y BFF en el meristemo del fenotipo variegada.

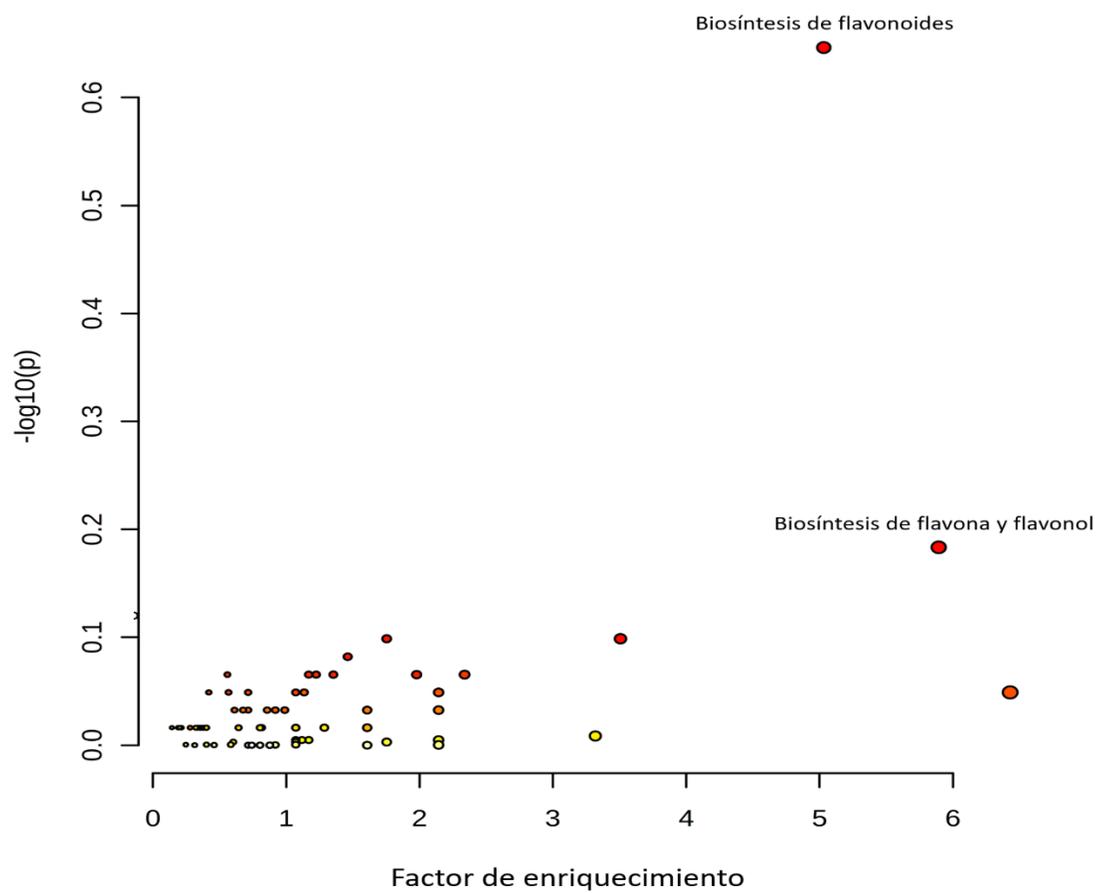
Meristemo variegado					
Compuesto	m/z	Clave de KEEG	Ion	Tiempo de retención	Diferencia de masa
(-)-Epiarfelequina	273.076	C12128	[M-H] ⁻	2.46	0.000847
(-)-Epigallocatequina	287.0555	C12136	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.000576
(+)-Galocatequina	287.0555	C12127	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.000576
Afzelequina	273.076	C12128	[M-H] ⁻	2.46	0.000847
Apigenina	269.0446	C01477	[M-H] ⁻	7.58	0.000947
Delfinidina	284.0321	C05908	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.77	4.65E-05
Dihidrokaempferol	287.0555	C00974	[M-H] ⁻	5.09	0.000612
Eriodictiol	269.0446	C05631	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.58	0.000912
Eriodictiol chalcona	269.0446	C15525	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.58	0.000912
Fustina	287.0555	C01378	[M-H] ⁻	5.09	0.000614
Galangina	269.0446	C10044	[M-H] ⁻	7.58	0.000947
Kaempferol	285.0398	C05903	[M-H] ⁻	4.75	0.000662
Kaempferol 3-O-glucósido	447.0936	C12249	[M-H] ⁻	4.91	0.000315
Kaempferol 3-O-ramnósido-7-O-glucósido	593.1517	C21854	[M-H] ⁻	4.76	0.000476
Kaempferol-3-O-rutinaósido (nictoflorina)	593.1517	C21833	[M-H] ⁻	4.76	0.000476

Leucocianidina	287.0555	C05906	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.000574
Luteolina	285.0398	C01514	[M-H] ⁻	4.75	0.000662
Pentahydroxyflavona (dihidrotricitina)	285.0398	C05911	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.75	0.000624
Floretina	273.076	C00774	[M-H] ⁻	2.46	0.000847
Quercetina 3-O-glucósido (isoquercitrina)	463.0882	C05623	[M-H] ⁻	4.45	3.63E-07
Quercetina 3-O-rhamnósido 7-O-glucósido	609.1457	C19796	[M-H] ⁻	4.77	0.000424
Quercitrina	447.0936	C01750	[M-H] ⁻	4.91	0.000315
Rutina	609.1457	C05625	[M-H] ⁻	4.77	0.000408
Sakuranetina	285.0761	C09833	[M-H] ⁻	3.19	0.000747
Taxifolina (dihidroquercetina)	285.0398	C01617	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.75	0.000624
Homoeriodictiol chalcona	283.0603	C16405	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.28	0.000864

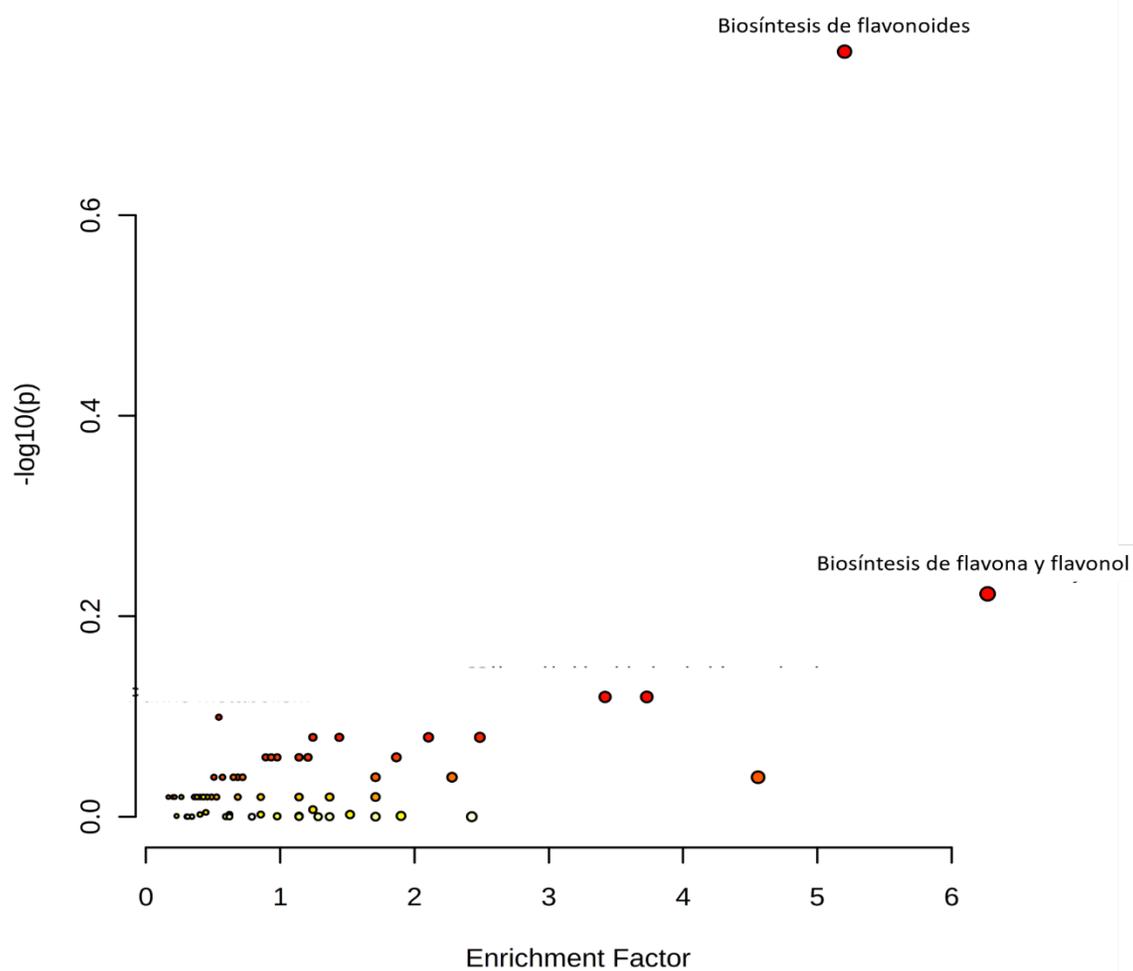
Anexo 8. Compuestos de las rutas BFP, BF y BFF en el meristemo del fenotipo albino.

Meristemo albino					
Compuesto	m/z	Clave de KEEG	Ion	Tiempo de retención	Diferencia de masa
(-)-Epiarfelequina	273.076	C12128	[M-H] ⁻	2.46	0.00084709
(-)-Epigallocatequina	287.0555	C12136	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.00057634
(+)-Galocatequina	287.0555	C12127	[M-H ₂ O-H] ⁻	5.09	0.00057632
Afzelequina	273.076	C09320	[M-H] ⁻	2.46	0.00084709
Apigenina	269.0446	C01477	[M-H] ⁻	7.58	0.00094696
Delfinidina	284.0321	C05908	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.77	4.65E-05
Dihidrokaempferol	287.0555	C00974	[M-H] ⁻	5.09	0.00061165
Eriodictiol	269.0446	C05631	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.58	0.00091165
Eriodictiol chalcona	269.0446	C15525	[M-H ₂ O-H] ⁻	7.58	0.00091164
Fustina	287.0555	C01378	[M-H] ⁻	5.09	0.00061353
Galangina	269.0446	C10044	[M-H] ⁻	7.58	0.00094696
Homoeriodictyol chalcona	283.0603	C16405	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.28	0.00086353
Kaempferol	285.0398	C05903	[M-H] ⁻	4.75	0.00066159
Kaempferol 3-O-glucósido	447.0936	C12249	[M-H] ⁻	4.91	0.00031499
Kaempferol 3-O-ramnósido-7-O-glucósido	593.1509	C21854	[M-H] ⁻	3.72	0.00032353

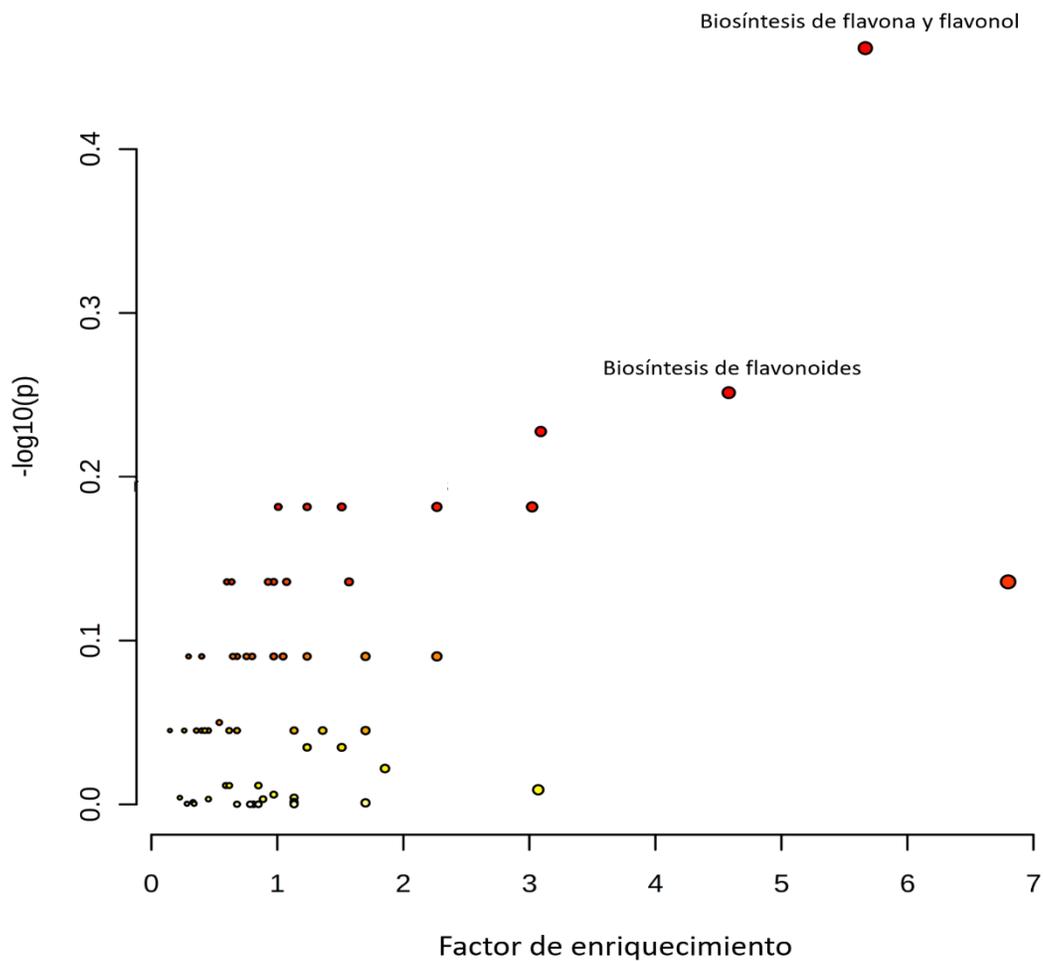
Kaempferol-3-O-rutinaósido (nictoflorina)	593.1509	C21833	[M-H] ⁻	3.72	0.00032353
Luteolina	285.0398	C01514	[M-H] ⁻	4.75	0.00066159
Pentahidroxi flavanona (dihidrotricetina)	285.0398	C05911	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.75	0.00062353
Floretina	273.076	C00774	[M-H] ⁻	2.46	0.00084709
Quercetina 3-O-glucósido (isoquercitrina)	463.0882	C05623	[M-H] ⁻	4.45	3.63E-07
Quercetina 3-O-ramnoósido 7-O-glucósido	609.1457	C19796	[M-H] ⁻	4.77	0.00042353
Quercitrina	447.0936	C01750	[M-H] ⁻	4.91	0.00031499
Rutina	609.1457	C05625	[M-H] ⁻	4.77	0.00040845
Sakuranetina	267.0651	C09833	[M-H ₂ O-H] ⁻	8.39	0.00114709
Taxifolina (dihidroquercetina)	285.0398	C01617	[M-H ₂ O-H] ⁻	4.75	0.00062353



Anexo 9. Factor de enriquecimiento de las rutas BF y BFF en la planta albina.



Anexo 10. Factor de enriquecimiento de las rutas BF y BFF en la planta variegada.



Anexo 11. Factor de enriquecimiento de las rutas BF y BFF en la planta verde.