

2021 Sistema de producción de *Heliopsis longipes*, usando bioestimulantes para la producción de Ixchel Parola Contreras



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería

Sistema de producción de *Heliopsis longipes*, usando bioestimulantes para la producción de afinina

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ingeniería en Biosistemas

Presenta

M. en C. Ixchel Parola Contreras

Dirigido por

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Querétaro, Qro. a 29 de abril de 2021

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado en Ingeniería en Biosistemas

SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE *HELIOPSIS LONGIPES* EN  
INVERNADERO UTILIZANDO ELICITACIÓN CONTROLADA CON PERÓXIDO  
DE HIDRÓGENO Y ÁCIDO SALICÍLICO PARA INCREMENTAR LA  
ACUMULACIÓN DE AFININA EN RAÍCES

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Doctor en Ingeniería en Biosistemas

**Presenta:**

Ixchel Parola Contreras

**Dirigido por:**

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Presidente  
Dr. Irineo Torres Pacheco  
Secretario  
Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez  
Vocal  
Dr. Enrique García Rico  
Suplente  
Dra. Alejandra Rojas  
Suplente  
Dr. Erik Gustavo Tovar Pérez  
Sinodal invitado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Abril 2021

México

## DEDICATORIAS

A mi madre, Rayito de Luna por su paciencia, amor, sacrificio y dedicación inagotable que la hacen un ser humano ejemplar. Siempre en deuda contigo, gracias por ser mi madre, por estar a mi lado.

A mis hijos Quetzalli y Elián por haberme escogido como su madre, gracias por ayudarme a ser paciente y tolerante. Gracias por entender mi ausencia. Sé que siempre estarán conmigo, se han convertido en parte de mi transitar en este espacio y tiempo. Los amo con todo mi ser y siempre estarán en mi corazón.

A mi padre, Filiberto, gracias por ser la luz y esperanza en mis momentos de desesperación y mi coraje cuando el miedo me superaba.

A mis hermanos, Filiberto, Itzamná y Emmanuel, gracias por apoyarme de diferentes maneras. Sé que siempre estarán conmigo aun estando lejos. Los quiero mucho.

A Kokis y Karen, estoy muy agradecida por sus vidas, Dios las cuide y las proteja siempre.

A Armando, el hermanito Juan, Cristina y al Dr. Sergio López Ramos por su gran sabiduría vertida en el trabajo para los del Ahora y los no nacidos.

A la Dra. Rosario y Dra. Socorro O´Shea, por ser mis amigas con sus acciones y consejos, por su tiempo y dedicación.

A mis compañeros de Amazcala, Cristina, Aurora, Luis Manuel, Emilio, Bruno, Alexa, Lety, Josué, Toño, Nallely, Ana Laura y Luis Alfonso, les agradezco el tiempo y los momentos vividos, los chuscos, la presión compartida y el hacer un gran equipo conmigo.

A los campesinos del chilcuague de Xichú y de San Juan Buenaventura.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por abrir las puertas, a la Facultad de Ingeniería por ser la fuente de la creatividad y el ingenio; y a la Facultad de Química por posibilitarme los laboratorios y las guías en sus instalaciones.

Agradezco al Programa de Becas de Posgrado de CONACyT por la beca otorgada al programa de Doctorado de Ingeniería de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la UAQ.

Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González, por la dirección del presente estudio y confiar en la propuesta del estudio de las plantas medicinales y en mí para la realización de este proyecto.

A mis sinodales. A la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez por el trabajo en el laboratorio de Metabolitos especializados; a la Dra. Alejandra Rojas Molina por su aporte en la cuantificación de la afinina, así como de las rutas metabólicas de las plantas; al Dr. Irineo Torres Pacheco por sus conocimientos estadísticos y participación en el análisis de datos; al Dr. Enrique Rico por sus observaciones a lo largo del proceso de realización de esta tesis; y finalmente al Dr. Erik G. Tovar Pérez por su apoyo en la realización de las actividades enzimáticas de este proyecto. Muchas gracias a todos y cada uno de ustedes.

A los Dres. Rosalía V. Ocampo Velázquez, Iza Fernanda Pérez Ramírez, Francisco Javier Luna Vázquez, Medardo Naranjo, Ma. Cristina Vázquez Hernández, Aurora Alvarado, Juan Antonio Valencia Hernández y María del Socorro O'Shea Álvarez por su guía durante la realización de este proyecto. Les agradezco su tiempo, paciencia, conocimiento y guía.

A mis padres por apoyarme en este proceso de crecimiento; gracias mamá por ser apoyo con los niños; gracias papá por la guía y el aliento. Gracias a ambos por concebirme y darme lo mejor que tienen. A mis hijos, por ser la luz y el motivo de superación, del trabajo diario, que sea ejemplo para ustedes. A mis hermanos, por animarme de lejos y crecer conmigo.

A mis maestros, Armando y el hermanito Juan El Grande, por guiarme en la oscuridad.

A mis compañeros del doctorado y los de química, por estar presentes en los momentos de trabajo y en los momentos de esparcimiento.

Finalmente, a las personas en la sierra que me abrieron las puertas y me confiaron las plantas medicinales. A las plantas por ser, adaptarse y crecer.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## Contenido

INDICE DE CUADROS .....	I
INDICE DE FIGURAS .....	II
Abreviaturas y siglas .....	VI
RESUMEN .....	IX
SUMMARY .....	XI
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Generalidades de <i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake (Asteraceae).....	3
2.1.1. Taxonomía .....	3
2.1.2. Morfología .....	4
2.1.3. Usos y costumbres.....	6
2.1.4. Origen y distribución .....	7
2.1.5. Reproducción de la planta de <i>H. longipes</i> .....	8
2.1.6. Usos agronómicos .....	9
2.2 Sistema de respuesta inmune de la planta.....	10
2.2.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno .....	13
2.3 Teoría del estrés .....	14
2.3.1 Clasificación de los factores de eustrés .....	15
2.3.2 Elicitores .....	17
2.3.2.1 Peróxido de hidrógeno .....	17
2.3.2.2 Ácido salicílico .....	19
2.3.2.3 Aplicaciones de factores de estrés en plantas medicinales	21
2.4 Metabolitos especializados.....	24
2.5 Afinina, metabolito especializado de <i>H. longipes</i> .....	28

2.5.1	Distribución de las alcaloides y la afinina.....	28
2.5.2	Composición fitoquímica de las raíces de <i>H. longipes</i> .....	28
2.5.3	Función de la afinina en las plantas .....	29
2.5.4	Estructura de las alcaloides .....	30
2.5.5	Biosíntesis de las alcaloides .....	32
2.5.6	Rendimiento de obtención de afinina .....	35
<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>38</b>
3.1	Hipótesis.....	38
<b>IV.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
4.1	Objetivo .....	38
4.2	Objetivos particulares .....	38
4.3	Pregunta de investigación .....	39
<b>V.</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>40</b>
5.1	Ubicación del área del proyecto de investigación.....	40
5.2	Especificaciones del invernadero .....	40
5.3	Obtención del material vegetal .....	41
	<b>OBJETIVO 1</b> .....	<b>44</b>
5.4	Diversidad genética de las colectas de <i>Heliopsis longipes</i> .....	44
5.4.1	Preparación del extracto para ADN.....	44
5.4.2	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP - Amplified fragment length polymorphism).....	45
	<b>OBJETIVO 2</b> .....	<b>47</b>
5.5	Aclimatación de las accesiones de <i>H. longipes</i> .....	47
5.6	Evaluación de las metodologías de propagación asexual de plantas de <i>Heliopsis longipes</i> . .....	47
	<b>OBJETIVO 3</b> .....	<b>50</b>

5.7 Evaluación del efecto de la elicitación controlada mediante peróxido de hidrogeno y ácido salicílico en el crecimiento y desarrollo de plantas de *H. longipes* colectadas en diferentes regiones del centro de México en invernadero.

50

**OBJETIVO 4**..... 52

5.8. Determinación de las actividades enzimáticas asociadas al eustrés, en las plantas que mejor respondieron a las variables de crecimiento para la producción de afinina en comparación contra un control ..... 52

5.8.1 Preparación de las muestras para ensayos enzimáticos. .... 52

5.8.2 Ensayo de la actividad Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) 52

5.8.2.1 Principio..... 52

5.8.2.2 Procedimiento..... 53

5.8.2.3 Cálculos..... 53

5.8.3 Ensayo de la actividad Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) ..... 54

5.8.3.1 Principio..... 54

5.8.3.2 Procedimiento..... 55

5.8.3.3 Cálculos..... 55

5.8.4 Ensayo de la actividad Fenilalanina-amonio liasa (PAL) (EC 4.3.1.5) 56

5.8.4.1 Principio..... 56

5.8.4.2 Procedimiento..... 57

5.8.4.3 Cálculos..... 58

5.8.5 Ensayo de la actividad Valina descarboxilasa (VDC) (EC 4.1.1.14)

59

5.8.5.1 Principio..... 59

5.8.5.2 Procedimiento..... 60



5.8.5.3 Cálculos.....	61
5.8.6 Determinación de proteína.....	61
5.8.6.1 Principio.....	61
5.8.6.2 Procedimiento.....	62
5.8.6.8.3 Cálculos.....	62
<b>OBJETIVO 5</b> .....	63
5.9. Determinar la producción de afinina en las plantas de <i>H. longipes</i> sometidas a elicitación controlada bajo condiciones de invernadero.....	63
5.1.1 Procesamiento de muestras para la determinación del contenido de afinina en las raíces de <i>H. longipes</i> .....	63
5.1.2 Cuantificación de afinina en extractos de <i>H. longipes</i> por HPLC-DAD	63
5.10 Análisis estadísticos.....	64
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	65
<b>OBJETIVO 1</b> .....	65
6.1 Análisis de la diversidad genética de colectas de <i>Heliopsis longipes</i> realizadas en los estados de Guanajuato y Querétaro.....	65
6.1.1 Marcadores moleculares de ADN.....	65
6.1.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs)	66
<b>OBJETIVO 2</b> .....	69
6.2 Producción acodos para la propagación asexual de plantas de <i>Heliopsis longipes</i> .....	69
<b>OBJETIVO 3</b> .....	71
6.3 Efecto de la elicitación controlada mediante peróxido de hidrogeno y ácido salicílico en el crecimiento y desarrollo de plantas de <i>Heliopsis longipes</i> colectadas en diferentes regiones del centro de México en invernadero.....	71

<b>OBJETIVO 4</b> .....	77
6.4 Actividades enzimáticas de respuesta a estrés oxidativo y de producción de alcaloides alifáticos en las plantas de <i>Heliopsis longipes</i> sometidas a elicitación controlada bajo condiciones de invernadero. ....	77
<b>OBJETIVO 5</b> .....	83
6.5 Determinar el contenido de afinina en las colectas de <i>Heliopsis longipes</i> sometidas a elicitación controlada. ....	83
6.5.2 Contenido de afinina en las raíces de las poblaciones de plantas de <i>Heliopsis longipes</i> sometidas a elicitación controlada .....	84
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	92
7.1 Resumen de resultados .....	92
7.2 Conclusión .....	92
<b>VIII. REFERENCIAS</b> .....	94
<b>IX. ANEXOS</b> .....	116
ANEXO 1 Fraccionamiento del extracto de diclorometano obtenido de raíces de <i>H. longipes</i> y purificación de afinina .....	117
ANEXO 2 Preparación de las soluciones para la cuantificación de las actividades enzimáticas.....	118
Soluciones para el ensayo de la actividad Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) .....	118
Soluciones para el ensayo de la actividad Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) .....	119
Soluciones para el ensayo de la actividad Fenilalanina-amonió liasa (PAL) (EC 4.3.1.5) .....	119
Soluciones para el ensayo de la actividad Valina descarboxilasa (VDC) (EC 4.1.1.14) .....	120
Soluciones para la determinación de proteína .....	120

ANEXO 3	Curvas patrón usadas en la cuantificación de las actividades enzimáticas	121
ANEXO 4	Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs)	125
ANEXO 5	Disposición de residuos	125
ANEXO 6	Recursos Humanos	126
ANEXO 7	Artículos como Primer autor	127
ANEXO 8	Artículos indexados y memorias de congresos	146
ANEXO 9	Artículos coautoría	151
ANEXO 10	Participación en capítulos de libros	152
ANEXO 11	Organización de Simposios y ferias	157
ANEXO 12	Acta de Clase	160
ANEXO 13	Participación en ponencias y congresos	161
ANEXO 14	Manual de producción de chilcuague ( <i>H. longipes</i> ) en condiciones de invernadero con elicitación controlada	170

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1.</b> Descripción taxonómica de <i>Heliopsis longipes</i> .....	3
<b>Cuadro 2.2.</b> Distribución geográfica restringida: delimitadas por sistemas orográficos aislados.....	6
<b>Cuadro 2.3.</b> Rendimientos obtenidos de afinina reportados en diversos estudios de <i>H. longipes</i> .....	37
<b>Cuadro 5.1.</b> Condiciones ambientales de los puntos de colecta de <i>H. longipes</i> ..	42
<b>Cuadro 5.2.</b> Datos de análisis químicos del suelo de las colectas de <i>H. longipes</i> .	43
<b>Cuadro 5.3.</b> Bases selectivas de 24 distintas combinaciones probadas para evaluar diversidad genética 29 colectas de <i>H. longipes</i> .....	46
<b>Cuadro 6.1.</b> Valores de concentración y pureza de ADN (ng/ $\mu$ L) de las poblaciones de <i>H. longipes</i> .....	66
<b>Cuadro 6.2.</b> Variables morfológicas de <i>H. longipes</i> bajo condiciones de invernadero.....	72
<b>Cuadro 6.3.</b> Rendimientos obtenidos de afinina reportados en diversos estudios de <i>H. longipes</i> .....	90

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Planta de *Heliopsis longipes* silvestre, colecta de Xichú, Gto.....4
- Figura 2.2.** *H. longipes* (Cilia 117 SLPM). A. Hábito. B. Raíz. C. Yema Floral. D. Cabezuela. E. Pedúnculo. F. Flor ligulada. G. Flor del disco. Ha. Aquenio de flor ligulada. Hb. Aquenio de flor del disco (Cilia-López, 2007).....5
- Figura 2.3.** Distribución geográfica *H. longipes* en los estados de Guanajuato y Querétaro.....8
- Figura 2.4.** Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP): inmunidad activada (PTI) e inmunidad activada por efectores (ETI) para diferentes tipos de patrones moleculares producidos por microorganismos e insectos patógenos y no patógenos (patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), daño) patrones moleculares asociados (DAMP) y patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMP). Traducido de (Malik et al., 2020).....12
- Figura 2.5.** Curva hormética originada por la aplicación de factores de estrés en las plantas. Eustrés, hace referencia a la dosis y duración positiva del factor de estrés, mientras que distrés se refiere al factor de estrés prolongado o dosis tóxicas que provocan la muerte de la planta.....15
- Figura 2.6.** Clasificación de los factores de estrés basados en su naturaleza de origen.....16
- Figura 2.7.** Modelo para la inducción de la cascada de señalización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. APX: ascorbato peroxidasa, CAT: catalasa, COR: gen regulador del frío, g-ECS: gamma glutalacisteína sintetasa, GSH: glutatone, GSSG: glutatone disulfido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno (*Hungarica, 2016*).....18
- Figura 2.8.** Vías propuestas para la biosíntesis de AS y la modificación de AS. AS se sintetiza a través del isocorismato (ICS) o vías de la fenilalanina amonio liasa (PAL). SA también se convierte en varias formas. BA2H, ácido benzoico-2-hidroxilasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; MeSA, salicilato de metilo; SA-Asp, ácido saliciloil-L-aspartico; SAG, ácido salicílico 2-O-β-glucósido; SGE, éster de saliciloil glucosa La figura está adaptada de (Miura and Tada, 2014).....21
- Figura 2.9.** Esquema de biosíntesis de los metabolitos secundarios en plantas. Figura traducida de (Dewick, 2002).....26
- Figura 2.10.** Estructuras químicas de (1) Afinina, y alcamidas menores presentes en las raíces de *H. longipes* (López-Martínez et al., 2011).....29

<b>Figura 2.11.</b> Propiedades estructurales de las N-alquilamidas (Boonen et al., 2012).....	32
<b>Figura 2.12.</b> La vía biosintética propuesta expone una arquitectura multi-modular y requiere acil-CoA como unidad de inicio y malonil-ACP como unidad de extensión. Dominios enzimáticos: ACP: proteína transportadora de acilo, AT: acil transferasa, KS: cetosintasa, KR: ceto reductasa, DH: deshidratasa, ER: enoil reductasa, TE: tioesterasa (Buitimea-Cantúa et al., 2020b).....	34
<b>Figura 2.13.</b> Esquema de biosíntesis de las alcanidas: la parte amarilla representa el metabolismo primario, los bloques verdes representan la biosíntesis de la cadena acilo propuesta mediada por policétido sintasa (PKS) de las alcanidas y los bloques naranjas específica la ruta de las alcanidas alifáticas y de la afinina. Figura traducida y modificada de (Buitimea-Cantúa et al., 2020b; Dewick, 2009; Rizhsky et al., 2016; Schlüter et al., 2011; Subramanian et al., 2012).....	35
<b>Figura 5.1.</b> Mapa de la ubicación del campus de Amazcala, municipio de El Marqués, Estado de Querétaro (Google Maps, 2018).....	40
<b>Figura 5.2.</b> Invernadero local. UAQ campus Amazcala.....	41
<b>Figura 5.3.</b> Propagación por acodo de <i>H. longipes</i> : A) Planta madre de tres años de aclimatación y B) acodo de la planta madre con un año de crecimiento de <i>H. longipes</i> .....	48
<b>Figura 5.4.</b> A) Acodo de la planta de <i>H. longipes</i> en una maceta adyacente con el mismo sustrato. B) Raíz de acodo de un mes.....	48
<b>Figura 5.5.</b> A) Tallo para esquejar en el sustrato. B) Plástico con sustrato para mantener el tallo en su lugar.....	49
<b>Figura 5.6.</b> Línea del tiempo para acesión de seis meses de aclimatación con elicitores.....	51
<b>Figura 6.1.</b> ADN en gel de agarosa de las poblaciones de <i>H. longipes</i> , usando $\lambda$ sin cortar como marcador de peso.....	65
<b>Figura 6.2.</b> Visualización en gel de agarosa al 1.5 % de los fragmentos amplificados con el cebador 26S de las muestras de <i>H. longipes</i> , utilizando el marcador de peso 1 KB plus.....	66
<b>Figura 6.3.</b> Dendrograma de las relaciones genéticas existentes entre 29 colectas de chilcuague ( <i>Heliopsis longipes</i> ), basado en el coeficiente DICE calculado con 24 combinaciones AFLP.....	68

<b>Figura 6.4.</b> Acodos de <i>H. longipes</i> : A) Tallo con tres semanas enterrado. B) Acodo con seis semanas. C) Acodo con ocho semanas. D) Acodo con diez semanas...	69
<b>Figura 6.5.</b> A) Raíces de acodo de <i>H. longipes</i> con seis semanas. B) Comportamiento del crecimiento de la longitud de las raíces de los acodos de <i>H. longipes</i> durante 14 semanas.....	70
<b>Figura 6.6.</b> A) Plántula de <i>H. longipes</i> de siete semanas. B) Acodos desarrollados trasplantados.....	70
<b>Figura 6.7.</b> Aspecto morfológico típico de <i>H. longipes</i> en el día 190 después del trasplante. A) población de Conca, B) población de Rancho Beltrán (RB).....	71
<b>Figura 6.8.</b> A) Diámetro de tallo (mm), B) Longitud de tallo (mm) y C) Longitud de la raíz (mm) de las poblaciones Conca y RB (Rancho Beltrán) después de la elicitación con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 mM y AS 10 mM. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (P=0.05).....	73
<b>Figura 6.9.</b> Plantas de <i>H. longipes</i> : A) tratamiento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 mM, B) AS 10 mM y C) agua destilada.....	74
<b>Figura 6.10.</b> Raíz de <i>H. longipes</i> bajo condiciones de cultivo en invernadero de un año.....	76
<b>Figura 6.11.</b> Actividades enzimáticas específicas en las poblaciones de <i>H. longipes</i> antes de la producción de acodos: A) Superóxido dismutasa (SOD), B) Catalasa (CAT), C) Fenilalanina amonio-liasa (PAL) y D) Valina descarboxilasa (VDC). RB: Rancho Beltrán. Diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo a ANOVA y a la prueba de media Tukey (P=0.05).....	77
<b>Figura 6.12.</b> Actividades enzimáticas específicas en las poblaciones RB y Conca de <i>H. longipes</i> con acodos y aclimatas por seis meses. A) Superóxido dismutasa (SOD), B) Catalasa (CAT), C) Fenilalanina amonio-liasa (PAL) y D) Valina descarboxilasa (VDC). RB: Rancho Beltrán. Diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo a ANOVA y a la prueba de media Tukey (P=0.05).....	79
<b>Figura 6.13.</b> Cuantificación de afinina en las poblaciones de <i>H. longipes</i> en condiciones silvestres y bajo condiciones de invernadero después de seis meses. RB: Rancho Beltrán. Diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo a ANOVA y a la prueba de media Tukey (P=0.05).....	83
<b>Figura 6.14.</b> Contenido de afinina en raíces de <i>Heliopsis longipes</i> elicidadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 mM y AS 10 mM y producidas por acodos. Letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA y la prueba de Tukey (P = 0.05).....	85

**Figura 6.15.** SA es reconocido por dos clases de receptores: NPR1 y NPR3/NPR4. La unión de SA suprime la actividad de represión transcripcional de NPR3/NPR4 y mejora la activación transcripcional de NPR1, lo que desencadena la regulación positiva de los reguladores de defensa que responden a SA. La inducción de genes biosintéticos de SA (ICS1, EDS5 y PBS3) promueve la producción de SA, mientras que la inducción de UGT76B1 y DMR6 estimula la conversión de SA en 2,5-DHBA y SAG, respectivamente. En los tejidos locales, la expresión de reguladores de defensa que responden a SA promueve tanto PTI como ETI y estimula la producción de la señal móvil de SAR, activando la expresión de genes biosintéticos de NHP (ALD1, SARD4 y FMO1). En los tejidos distales, el NHP promueve la biosíntesis de SA y la resistencia inducida por SA (M. I. R. Khan et al., 2015; Liu et al., 2016, 2020).....87

**Figura 6.16.** Esquema de acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular como segundo mensajero en sitios como la NADPH oxidasa, peroxidasa de la pared celular, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas como fuentes importantes de generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las vías de señalización para inducir la respuesta de defensa (Camejo et al., 2016; Cheeseman, 2007; Guevara-González et al., 2020).....88

**Figura 6.17.** Proceso de disponibilidad de raíz de *H. longipes* con raíces de tamaño comercial en menor tiempo a través de la elicitación controlada, y que además logra niveles iguales o superiores de afinina por unidad de materia seca a los reportes previos por otros autores.....89



## Abreviaturas y siglas

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	Calcio libre en el citosol
·HO	Radicales hidroxilo
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno simple
ADP	Adenosina difosfato
APX	Peroxidasa de ascorbato
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenoseno trifosfato
AzA	Ácido azelaico
C(w)	Clima templado subhúmedo
C <sub>4</sub> H	Cinamato 4-hidroxilasa
cAMP	AMP cíclico
CAT	Catalasa
CDB	Diversidad Biológica de las Naciones Unidas
cGMP	GMP cíclico
CGT	Tricomas glandulares capitados biseriados
CoA	Coenzima A
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
DAG	Diacilglicerol
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ETI	Effector-triggered immunity
G3P	Glicerol 3-fosfato
<i>H. longipes</i>	<i>Heliopsis longipes</i>

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
HAMP	Patrones moleculares asociados a herbívoros
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	Respuesta hipersensible local
HSP	Proteínas de choque térmico
InsP3	Inositol trifosfato
IUCN	International Union for Conservation of Nature's
ME	Metabolitos especializados
MeJA	Ácido metil-jasmónico
MeSA	Metil-SA
MG	Metilglioxal
mM	Milimolar
NADP	Nicotinamida adenina fosfato dinucleotide
ON	Óxido nítrico
PAL	fenilalanina-amonioliasa
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
POD	Peroxidasa
PRO	Prolina
PTI	Pattern-triggered immunity
RBSG	Reserva de la Biosfera Sierra Gorda
RRP	Receptores de patrones de reconocimiento
SAR	Resistencia adquirida sistémica
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SINAP	Sistema Nacional de Áreas de Naturaleza Protegida
SMM	Segunda molécula mensajera

SOD	Superóxido dismutasa
SOM	Small organic molecules
STL	Lactonas sesquiterpénicas
TGM	Tasa media de germinación
TME	Tasa media de emergencia
VDC	valina descarboxilasa

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## RESUMEN

El chilcuague (*Heliopsis longipes*) es una planta medicinal endémica de Guanajuato, Querétaro y San Luis Potosí, México. La raíz es la parte de la planta utilizada, siendo descartada el área foliar. La raíz comercial es extraída de las poblaciones silvestres y algunos cultivos rudimentarios. Las colectas, el comercio y el rápido desarrollo urbano han provocado el declive de sus individuos. El extracto de la raíz se utiliza como analgésico, anestésico, antiinflamatorio y anti-ulceroso, por nombrar algunos. La afinina es el metabolito de interés, este compuesto es una alcaloide responsable de las propiedades curativas en sus raíces. La afinina es eficaz como compuesto medicinal, saborizante y de control biológico. Las plantas están expuestas a estrés en su medio ambiente limitando crecimiento, calidad y rendimientos. La aplicación de estrés bajo dosis/respuesta es una estrategia aplicada en la agricultura para mejorar la producción hortícola y el incremento de la síntesis de los metabolitos de interés. Actualmente se han reportado pocos estudios para la propagación, el cultivo y la aplicación de factores de estrés en las plantas de *H. longipes*, además del incremento en el contenido de este metabolito. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de las aplicaciones de ácido salicílico (AS) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en el crecimiento, desarrollo, actividades enzimáticas relacionadas con el estrés y contenido de afinina en colectas de *H. longipes* de diferentes regiones del centro de México en un sistema de cultivo protegido. Las plantas se colectaron en cuatro localidades: Ocotero y Rancho Beltrán, Guanajuato y Conca y San Juan Buenaventura, Querétaro, México. En la experimentación se probaron dosis de AS y  $H_2O_2$  basados en estudios previos del Grupo de Ingeniería de Biosistemas. Se encontró un efecto bioestimulante en la altura del tallo y la longitud de la raíz. Estas mismas concentraciones incrementaron la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y fenilalanina-amonio liasa (PAL) relacionadas con la activación del sistema de defensa. Adicionalmente, la actividad de la valina descarboxilasa (VDC) estuvo directamente relacionada con el contenido de afinina en el sistema radicular con la aplicación de las dosis SA 10 mM y  $H_2O_2$  200 mM. Las dosis anteriormente citadas

pueden ser usadas como elicitores que ayuden a incrementar el contenido de afinina en las raíces de *H. longipes* y disminuir el tiempo de crecimiento. Aunado al manejo agrícola en invernadero, la población de Concá bajo elicitación controlada tiene mayor potencial de rendimiento. Esta investigación contribuye con la definición de un elicitador y su dosis/respuesta, incrementando los compuestos de interés en la raíz, e indirectamente preservando el material vegetal en su hábitat.

**Palabras clave:** elicitores, eustrés, metabolitos especializados, actividad enzimática.

Dirección General de Bibliotecas de la UJAQ

## SUMMARY

The chilcuague (*Heliopsis longipes*) is an endemic medicinal plant of Guanajuato, Querétaro and San Luis Potosí, Mexico. The root is the part of the plant used, the leaf area is discarded. The commercial root is extracted from wild populations and some rudimentary crops. Collections, trade and rapid urban development have led to the decline of its individuals. The root extract is used as a pain reliever, anesthetic, anti-inflammatory, and anti-ulcer, to name a few. Affinin is the metabolite of interest. This compound is an alkalamide responsible for the healing properties in its roots. Affinin is effective as a medicinal, flavoring, and biological control compound. Plants are exposed to stress in their environment limiting growth, quality and yields. The application of low dose/response stress is a strategy applied in agriculture to improve horticultural production and increase the synthesis of the metabolites of interest. Few studies have currently been reported for the propagation, cultivation and application of stress factors in *H. longipes* plants, in addition to the increase in the content of this metabolite. The objective of this study was to determine the effect of the applications of salicylic acid (AS) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on the growth, morphology, enzymatic activities related to stress and affinin content in the *H. longipes* plant in a protected cultivation system. The plants were collected in four locations: Ocotero and Rancho Beltrán, Guanajuato and Concá and San Juan Buenaventura, Querétaro, Mexico. In the experimentation doses of AS and  $H_2O_2$  were tested based on previous studies of the Biosystems Engineering Group. A bio-stimulant effect was found in the height of the stem and the length of the root. These same concentrations increased the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and phenylalanine-ammonium lyase (PAL) related to the activation of the defense system. Additionally, the activity of valine decarboxylase (VDC) was directly related to the content of affinin in the root system with the application of the doses SA 10 mM and  $H_2O_2$  200 mM. The aforementioned doses can be used as elicitors that help to increase the affinin

content in the roots of *H. longipes* and decrease the growth time. In addition to the agricultural management in the greenhouse, the population of Concá under controlled elicitation has greater yield potential. This research contributes to the definition of an elicitor and its dose/response, increasing the compounds of interest in the root, and indirectly preserving the plant material in its habitat.

**Key words:** elicitors, eustress, specialized metabolites, enzymatic activity.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## I. INTRODUCCION

La Agrobiodiversidad es la variedad de conjuntos de especies con un papel ecológico similar en el ecosistema, la variedad de plantas domesticadas por el hombre y sus parientes silvestres en el ecosistema (CONABIO, 2012). México ha ratificado el “Convenio sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas (CDB)” para la conservación de la Agrobiodiversidad, con la finalidad de que la diversidad biológica sea conservada, valorada, restaurada y utilizada en forma racional (ONU, 1992). La variedad de climas, topografía, geología, biología y cultura que posee México, lo clasifica como uno de los países megadiversos. Una de las áreas protegidas en nuestro país es la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda (RBSG) que ocupa a nivel nacional el primer lugar en ecobiodiversidad (Dominguez, 1999). La RBSG está conformada por los estados de Querétaro (Jalpan de Serra, Arroyo Seco, Landa de Matamoros, Pinal de Amoles y Peñamiller, ocupa el 32% del estado), Guanajuato (Xichú, Atarjea, Santa Catarina, San Luis de la Paz y Victoria, ocupa el 8.9% de estado) y San Luis Potosí (Xilitla) (Peña et al., 1998).

La RBSG alberga 15 tipos de vegetación en la que se han registrado 1,718 especies de plantas vasculares compuestas por gimnospermas, pteridofitas y angiospermas (INE and SEMARNAP, 1998); de los cuales 45 especies son endémicas dentro de los límites del estado de Querétaro (Rzedowski et al., 2012; Rzedowski, 2008). Una de estas especies endémicas es *Heliopsis longipes* S. F. Blake (Asteraceae: Heliantheae) conocido como chilcuague, cuya raíz es de importancia alimenticia, medicinal e industrial (Castro-Ruiz et al., 2017; Hernández-Morales et al., 2015). Entre sus usos más comunes se encuentra el tratar enfermedades respiratorias y bucales, neutralizar la acidez estomacal, estimular el sistema inmunológico, como desparasitante, desinflamante, así como también analgésico (Rivera et al., 2010).

La planta, al ser de importancia económica, es recolectada de las poblaciones silvestres de la zona, por lo que su número se ha visto reducido. Se sabe que la



especie está en peligro de extinción. Aunque la planta crece a la sombra y se propaga por estolones (Cilia-López et al., 2014), el incremento en la demanda genera sobreexplotación en las poblaciones silvestres; afectando la biodiversidad en categoría de riesgo. Desde el punto de vista comercial la extracción de campo no garantiza la pureza biológica, la calidad fotoquímica ni la oferta sostenida (Hernández-Morales et al., 2015). Asimismo, en las últimas décadas, se ha retomado la investigación de las propiedades de las plantas, ya que son fuentes potenciales para el descubrimiento de nuevos productos de valor medicinal, saborizante e industrial para el desarrollo de nuevos productos (Islam et al., 2015).

La planta de *H. longipes* está continuamente en investigación por sus propiedades; la raíz es la única parte usada con estos fines, por lo cual al ser extraída en las colectas se reducen los miembros de su población al ser destruida la planta (Cilia-López et al., 2014). La raíz de la planta presenta compuestos fitoquímicos como terpenos, flavonoides y en mayor contenido la afinina. La afinina es una alcaloide que está presente en 90% del total de las alcaloides en las raíces desarrolladas (Arriaga-Alba et al., 2013; Buitimea-Cantúa et al., 2020b) y en los extractos etanólicos de la raíz (Campos-García and Molina-torres, 2021). La extracción de la afinina de la raíz de *H. longipes* requiere de grandes cantidades de raíz seca obteniendo bajos rendimientos de este compuesto (Castro-Ruiz et al., 2017). La afinina ayuda naturalmente a aliviar los padecimientos de algunas enfermedades y al ser un metabolito especializado puede ser potencializada su producción a través de factores de estrés bióticos (Alvarado et al., 2019). Por lo que un sistema de cultivo amigable junto con la aplicación de factores de estrés de origen biótico puede incrementar el rendimiento de la afinina en las raíces de las plantas de *H. longipes* y disminuir la presión que se ejerce en su hábitat natural permitiendo la regeneración de las poblaciones. Adicionalmente, no se tienen datos de la diversidad genética, por lo que conocerla y proponer un sistema de producción que dispare la síntesis del compuesto de interés en menor tiempo y con igual o mayor contenido de afinina apoyará en la regeneración de las poblaciones.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake (Asteraceae)

#### 2.1.1. Taxonomía

El nombre original en náhuatl es chilmécatl, compuesto de chili, que significa picante y mecatl que significa cordel. Es probable que de su castellanización se deriven los nombres chilcuán, chilcuam, chilcuague, además es conocido como pelitre, peritre, raíz de oro y raíz azteca (Molina-Torres et al., 1995). Los primeros registros de esta especie pueden encontrarse en la literatura de la época colonial temprana, en los “*Quatro libros de la natvraleza*” de Francisco Hernández, editada por Ximénez (1615) en su “Libro Segundo, cap. VII de la yerba llamada Chilmecatli” (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2012). Los nombres comunes son chilcuague, chilcuán, pelitre, raíz de oro, raíz azteca; en el caso de la denominación “pelitre” se le asigna por el sabor picante de la raíz (Cilia-López et al., 2008). La descripción taxonómica de esta planta se muestra la Cuadro 2.1.

**Cuadro 2.1.** Descripción taxonómica de *Heliopsis longipes*.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobinta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Heliantheae
Subtribu	Zinniinae
Género	<i>Heliopsis</i>
Especie	<i>Heliopsis longipes</i> (A. Gray) S.F. Blake

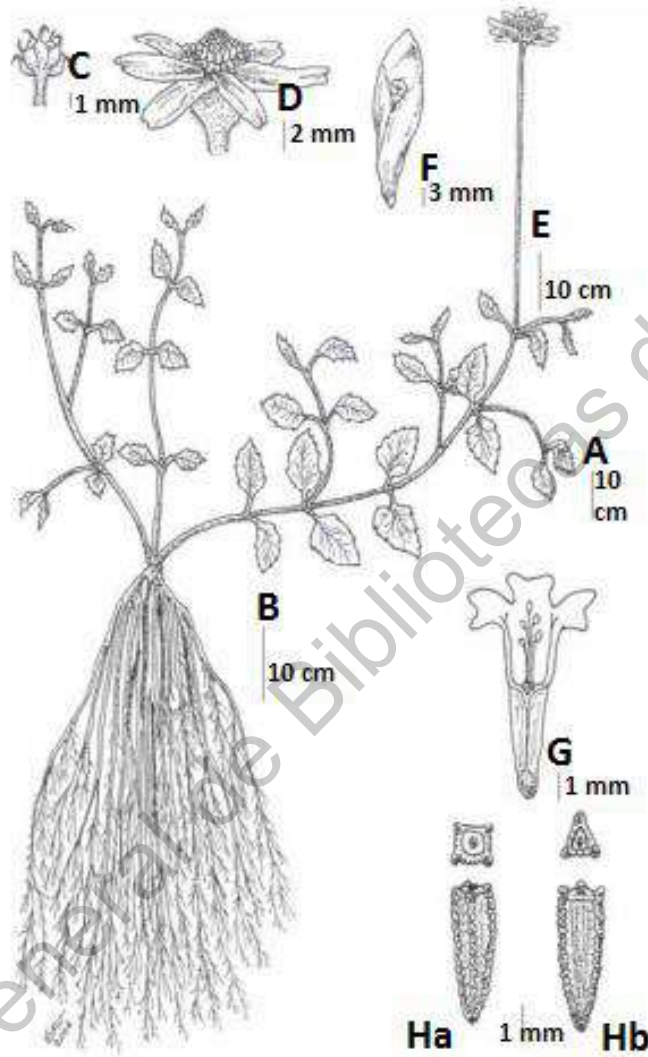
### 2.1.2. Morfología

*H. longipes* es una planta herbácea de 40 cm de altura (Figura 2.1), los tallos pueden ser simples o ramificados de 1 a 7, con un diámetro de 1.9 mm, de 8 nudos. Las hojas miden 4 cm de largo y 2.9 cm de ancho. La raíz tiene aspecto filiforme con un máximo de 33 raíces fibrosas con longitud máxima de 38 cm y de 4.1 mm de diámetro. Las flores liguladas son amarillas y hermafroditas, con el ápice bidentado. Las flores del disco son amarillas, tubulosas, hermafroditas (Cilia-López et al., 2008).



**Figura 2.1.** Planta de *Heliopsis longipes* silvestre, colecta de Xichú, Gto.

Cilio -López *et al.* (2008) mencionan que las etapas fenológicas de *Heliopsis longipes* son: etapa vegetativa (producción de hojas y tallos), aparición de las estructuras reproductoras (yema floral), anthesis de las flores liguladas y del disco (floración), presencia de aqueninos (fructificación) y pérdida del follaje (defoliación), (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** *Heliopsis longipes* (Cilia 117 SLPM). A. Hábito. B. Raíz. C. Yema Floral. D. Cabezuela. E. Pedúnculo. F. Flor ligulada. G. Flor del disco. Ha. Aquenio de flor ligulada. Hb. Aquenio de flor del disco (Cilia-López, 2007).

Los representantes de *Heliopsis* son plantas perennes con la excepción de cinco especies anuales (*H. annua*, *H. anomala*, *H. filifolia*, *H. parviceps* y *H. sinaloensis*) endémicas a México, Cuadro 2.2 (García-Chávez et al., 2004).

**Cuadro 2.2.** Distribución geográfica restringida: delimitadas por sistemas orográficos aislados (García-Chávez et al., 2004).

<b>Especie</b>	<b>Distribución geográfica</b>
<i>H. filifolia</i> S. Wats	Cuatro Ciénegas, Carneros y Puerto Colorado, Coahuila
<i>H. longipes</i> (Gray) Blake	Sierra Gorda, en el centro del país en la región de colindancia de los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Querétaro
<i>H. sinaloensis</i> B. L. Turner	Imala, Sinaloa

### 2.1.3. Usos y costumbres

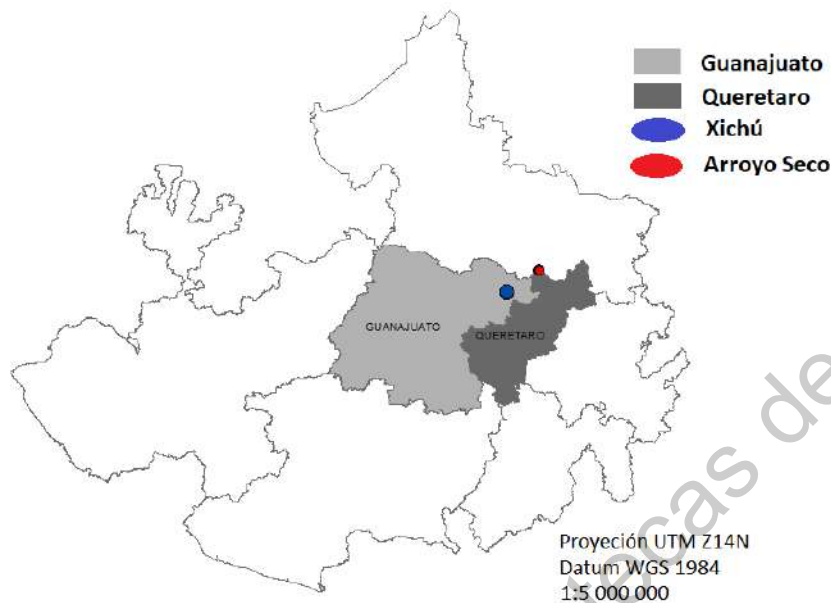
Esta planta se acostumbra en los platillos de la región, en fresco y en seco. Tradicionalmente se usa como condimento en frijoles, guisos y salsas: así como en la preparación de bebidas alcohólicas para darle mejor sabor. Un dato interesante, es que favorece la conservación de los alimentos que se aliñan con él, gracias a las propiedades antimicrobianas y anti-fúngicas (Hernández-Morales et al., 2012). El uso de la raíz como saborizante en la industria europea regulada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, está limitada a una ingesta de 24 mg / cápita / día (European Food Safety Authority, 2011).

Las raíces de *H. longipes* se emplean en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias en gotas, como anestésico en pomadas para calmar dolores muy fuertes de muelas y musculares, en el tratamiento de lesiones bucales, desinflamante; es un fuerte sialólogo, lo que le confiere a la saliva la capacidad de neutralizar la acidez estomacal y bucal, ayudando en la digestión, se estimula el sistema inmunológico, disminuye la diarrea y desparasita (Cilia-López et al., 2014). El extracto de *H. longipes* modifica el comportamiento ansioso ya que puede contener principios sedativos y disminuir la actividad convulsiva; también prolonga el tiempo del pentobarbital sódico en hipnosis inducida (Déciga-Campos et al., 2012).

*H. longipes* tiene como parte útil la corteza de la raíz. Al coleccionar la raíz se arranca la planta, cortando a la altura del cuello del tallo y se desecha el follaje; por lo que el área foliar no es usado ni se tienen programas para su aprovechamiento o propagación. Este aspecto, aunado a su alta demanda y alto valor comercial ha provocado que las poblaciones silvestres disminuyan considerablemente (Cilia-López et al., 2014). Según el informe en 2014 de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (International Union for Conservation of Nature's, IUCN) indicó que solamente en Europa el 31% de las poblaciones de este tipo de plantas ha disminuido en orden de importancia, a la colecta silvestre, ganadería, modificaciones en sus ecosistemas, agricultura, silvicultura, introducción de especies exóticas, infraestructura, producción de energía y minería (Allen et al., 2014).

#### **2.1.4. Origen y distribución**

La planta crece entre la maleza del bosque Quercus-Pinus y alcornoque, entre altitudes de 500 a 3000 m s. n. m. El clima registrado es templado y templado subhúmedo con lluvias en verano ( $C(w_0)$  y  $C(w_1)$ ), la temperatura promedio anual es de 18 a 20°C, y de 600 a 800 mm de precipitación promedio anual (Rzedowski et al., 2012). La litología es mayoritariamente ígnea (71,43%) y sedimentaria (28,57%), con litosol, feozem y luvisol de tipo suelo, moderadamente ácido y rico en materia orgánica (una capa de hojarasca de 15 a 40 cm de profundidad) (Cilia-López et al., 2014). Esto corresponde a los tipos de roca presentes en las partes de las provincias de la Mesa del Centro y la Sierra Madre Oriental, donde *H. longipes* se distribuye (Cilia-López et al., 2013), (Figura 2.3). Las poblaciones de esta planta se han registrado desde Río Verde y San Ciro en San Luis Potosí, San Luis de la Paz y Xichú en Guanajuato, Peñamiller, Arroyo Seco y San Joaquín en Querétaro (Castro-Ruiz et al., 2017; Cilia-López et al., 2014, 2010; Molinotorres et al., 1996; Parola-Contreras et al., 2020a).



**Figura 2.3.** Distribución geográfica *Heliopsis longipes* en los estados de Guanajuato y Querétaro.

### 2.1.5. Reproducción de la planta de *H. longipes*

La reproducción de los individuos de la familia Asteraceae se ha llevado a cabo con antelación. La germinación en *Heliopsis helianthoides* (L.) Sweet fue del 70% con embebimiento de las semillas en 5 mM ethephon, exposición a la luz roja por 1.5 h y estratificación en frío a 4°C (Zlesak, 2007). Las semillas de *Helianthus annuus* fueron germinadas *in vitro* para el estudio de los compuestos secundarios que se secretan en tricomas glandulares (Rowe et al., 2012) y del desarrollo de los tricomas en los primordios de las hojas de la flor (Aschenbrenner et al., 2015). La germinación de las semillas silvestres de *H. longipes* fue del 90% de colectas menores a un año (Almaguer González, 2002). Mientras que García-Chávez et al. (2004) señalan que las personas que se dedican al cultivo de *H. longipes*, lo hacen por propagación de esquejes, en algunos casos por semilla y que el tiempo de desarrollo de las raíces para alcanzar el tamaño comercial es de dos a tres años (García-Chávez et al., 2004). Por su parte, Cilia-López et al. (2008) observaron que en ninguna época del año hubo germinación o presencia de plántulas en las

poblaciones endémicas, lo cual sugiere limitaciones para la reproducción sexual y el establecimiento de plántulas (Cilia-López et al., 2008). Tiempo después, la germinación obtenida fue del 94% a una temperatura constante de 18°C en cámara de germinación (Cilia López et al., 2013).

Por otro parte, la colecta en el hábitat natural es la forma de obtención de las plantas medicinales de importancia económica, con lo cual se tiene desigualdad en la cantidad y calidad (Barata et al., 2016; Jamwal et al., 2018). La propagación asexual es utilizada para multiplicar la planta progenitora con las características morfológicas, la información genética, resistencia a enfermedades y rendimientos deseadas ya que es más fácil y barata (Liu et al., 2019). Debido a esto las características deseadas de una planta se mantienen en los clones reduciendo la variabilidad genética y la desigualdad entre ellas (Liu et al., 2018; Ramakrishnan et al., 2017).

*H. longipes* se multiplica de forma asexual en su hábitat ya que forma raíces de cualquier lugar de la planta como de nudos de tallos maduros en contacto con el suelo, en especial durante las épocas húmeda y seca-fría (Cilia-López et al., 2014). Durante el trasplante de plantas por esqueje se obtuvo 99% de supervivencia (Almaguer González, 2002). Por su parte Cilia-López et al. (2013) propagaron la planta a partir de órganos vegetativos (Cilia López et al., 2013). A cielo abierto y después de 18 meses se obtuvieron plantas con raíces de 30 cm de largo, diámetro de 3 mm y en promedio tres manojos por planta, uno más que de forma silvestre (Almaguer González, 2002). A pesar de esto, aún se tienen oportunidades en el aprovechamiento sustentable de la planta bajo Agricultura Protegida, incrementar el rendimiento de las sustancias de interés y disminuir el tiempo de crecimiento de las raíces en las plantas de *H. longipes*.

#### **2.1.6. Usos agronómicos**

La afinina, principal compuesto encontrado en las raíces de *H. longipes*, ha mostrado el mismo grado de acción paralizante y de toxicidad contra insectos como



el piretro extraído de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Casida, 1980). La afinina se ha probado como plaguicida en la mosca doméstica (*Musca domestica*) (Jacobson et al., 1947), el lepidóptero *Diaphania hyalinta*, el díptero *Aedes aegypty* (vector del dengue) y el mosquito vector del paludismo (*Anopheles albimanus*) (Acree et al., 1945; Hernández-Morales et al., 2012). así como el gorgojo del frijol (*Acanthoscelides octectus* Say) (Domínguez et al., 1958) y en el gorgojo (*Sitophilus granarius*ngrese) (Parola-Contreras et al., 2019). La densidad letal media de la afinina es de 234.09 ppm en el caso de ninfas de *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Beache et al., 2015). Esta alcanida tiene aplicaciones como antimicrobiano (Molina-Torres et al., 1999), bacteriostático (Molina-Torres et al., 2004), fungicida agrícola (Salgado-Garciglia et al., 2008), fungicida (Morales et al., 2011; Ramírez-Chávez et al., 2000), molusquicida (Cilia-López et al., 2013; Johns et al., 1982) y larvicida (Naranjo et al., 2015).

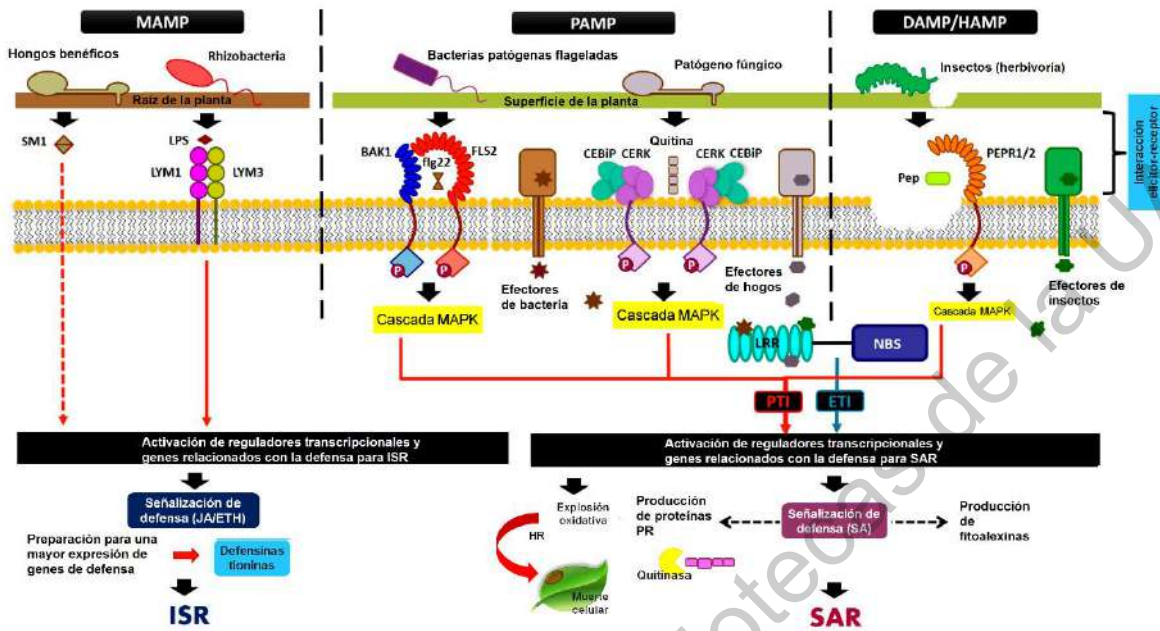
## 2.2 Sistema de respuesta inmune de la planta

La activación de la 'inmunidad conservada' es consecuencia de las estrategias de supervivencia de la planta. Una de estas estrategias es la **respuesta inmune innata** que ayuda a afrontar enfermedades locales y sistémicas, peligros potenciales ocasionados por patógenos y microorganismos (microbios, hongos, bacterias y oomicetos) protegiendo sus tejidos, los procesos vitales y la restauración de las partes dañadas (Guevara-González et al., 2020). Estas amenazas requieren ser reconocidas como señales de advertencia y poder desencadenar la señalización molecular adecuada (Prince et al., 2014). El reconocimiento de estas moléculas se lleva a cabo por dos vías. Los patrones moleculares asociados al daño (DAMP) son moléculas endógenas producidas por el huésped que activan la vía del 'autoreconocimiento dañado' y respuestas inmunitarias. Algunas moléculas que funcionan como DAMP son fragmentos de pared celular, monómeros de cutina, oligogalacturónidos, oligosacáridos, ATP, metanol, etanol y sistemina, entre otros (Malik et al., 2020). Por su parte, los patrones moleculares asociados a herbívoros

(HAMP) y los patrones moleculares asociados a microbios y patógenos (MAMP y PAMP, respectivamente) son moléculas exógenas que activan las vías del 'no reconocimiento de sí' (Vega-Muñoz et al., 2018).

Las moléculas segregadas por los patógenos y microorganismos son llamadas elicitores. El elicitor es toda aquella molécula que desencadena una señalización celular de respuesta de defensa al ser reconocida y que es percibida como un factor de estrés en cierta dosis. Estas moléculas al ser derivadas de organismos, partes de organismos, células u organelos de los mismos son de origen biótico (Guevara-González et al., 2020). Este reconocimiento por parte de las células se lleva a cabo mediante proteínas de superficie transmembrana llamadas receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Zipfel, 2008). Los PRR desencadenan la inmunidad activada (PTI), la inmunidad activada por efectores (ETI) (Prince et al., 2014), al igual que incorporan flujos de iones como  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y proteína quinasa activadas por mitógenos, lo que conduce a una rápida respuesta a todas las partes de la planta (Ferrusquía-Jiménez et al., 2020; Malik et al., 2020). Adicionalmente los PRR juegan un papel importante en la resistencia a patógenos desencadenando respuestas mediadas por ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA), presentando así también resistencia a herbívoros (Sudhamoy et al., 2010).

Paralelamente, la membrana plasmática transmite señales a través de una segunda molécula mensajera (SMM) y pequeñas moléculas orgánicas (SOM, por sus siglas en inglés small organic molecules) al núcleo para sintetizar la transcripción y traducción de enzimas (Cuello and Yue, 2008), Figura 2.4. Genéricamente, los SMM incluyen especies reactivas de oxígeno (ERO), óxido nítrico (ON), inositol trifosfato (InsP3), GMP cíclico (cGMP),  $\text{Ca}^{2+}$ , AMP cíclico (cAMP), iones pH y diacilglicerol (DAG). Iniciando cascadas de transducción de señalización intracelular, las SMM están implicadas en la diferenciación celular, migración, proliferación, migración y apoptosis (Di et al., 2015).



**Figura 2.4.** Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP): inmunidad activada (PTI) e inmunidad activada por efectores (ETI) para diferentes tipos de patrones moleculares producidos por microorganismos e insectos patógenos y no patógenos (patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), daño) patrones moleculares asociados (DAMP) y patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMP). Traducido de (Malik et al., 2020).

El modelo de elicitador-receptor bien establecido para hongos y bacterias patógenos, insectos y microbios no patógenos es la proteína de unión del elicitador de quitina / quinasa del receptor del inductor de quitina (CEBIP / CERK), quitina, cinasa asociada a FLAGELLIN SENSITIVE2 / BRI1 (FLS2 / BAK1), flg22, receptor 1/2 de PEP (PEPR1 / 2), péptidos (Pep), proteína de motivo lisina 12 (LYM1 / LYM2), LPS e hidrofobina -como elicitador (SM1) (Malik et al., 2020). Asimismo, la resistencia sistémica adquirida (SAR) y localizada son otro tipo de inmunidad de la planta. La resistencia adquirida localizada se presenta alrededor del tejido dañado o infectado. Mientras que el SAR se produce posteriormente al ataque localizado de un patógeno mediante la inducción de una respuesta hipersensible local (HR) a los síntomas moderados de la enfermedad o daño transmitido a toda la planta. La HR es un proceso sofisticado asociado con la muerte celular, la síntesis de ERO, los

cambios en la pared celular, la mejora de las lipasas y la modificación del pH. El conjunto de señales del SAR que participan en la planta son ácido salicílico (AS), metil-SA (MeSA), deshidroabietinal, ácido metil-jasmónico (MeJA), glicerol 3-fosfato (G3P) o los derivados de glicerol 3-fosfato y / o ácido azelaico (AzA) y permiten al organismo tener menor susceptibilidad al ataque (Sudhamoy et al., 2010). Sin embargo, los MAMps derivados de microorganismos benéficos generan resistencia sistémica inducida, tal es el caso de las rizobacterias. Las respuestas de defensa y sus señalizaciones están mediadas por tres hormonas vegetales, el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), seguida de la expresión de genes de defensa por medio de la señalización celular (Guevara-González et al., 2020).

### **2.2.1 Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno**

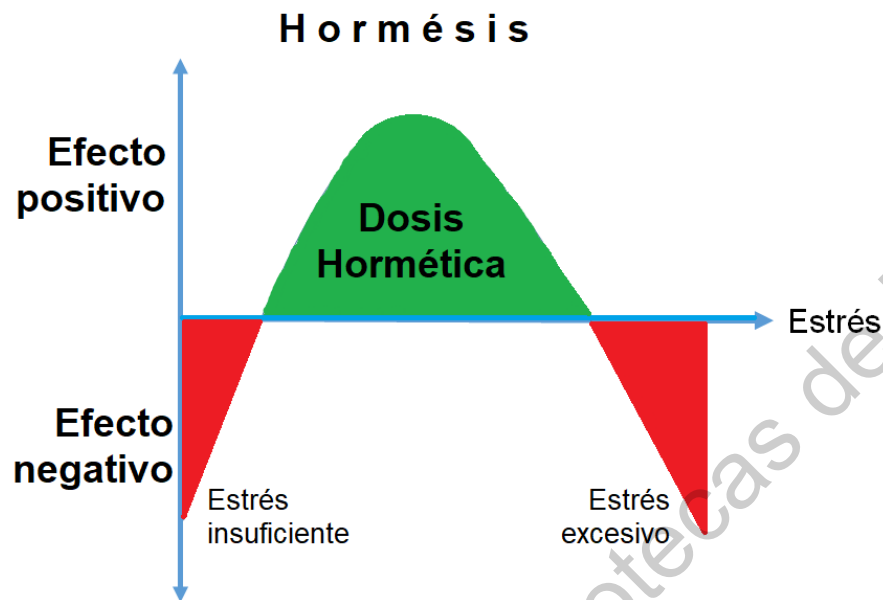
El estrés biótico y abiótico modifica la fotosíntesis y el transporte de electrones respiratorios, aumentando también la producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO) como respuesta inmunológica (De Gara et al., 2010). Los ERO son reguladores de señalización activados por el estrés; estas moléculas están agrupadas en radicales hidroxilo ( $\cdot\text{HO}$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno simple ( $^1\text{O}_2$ ) (Fan et al., 2011). Los ERO pueden inducir la activación de canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$ . Los niveles altos de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) movilizan canales de aniones de tipo rápido y lento que provocan un flujo de aniones en las células, despolarizando la membrana plasmática (Shanker, A. K., Venkateswarlu, 2012). El papel de las enzimas derivadas de  $\text{Ca}^{2+}$  es decodificar y responder a los aumentos de inducción de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

Debido a que los aminoácidos constituyen la fuente más abundante de formas químicas en las que es transportado el N; su biosíntesis, la degradación y el transporte están regulados para satisfacer la demanda en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno y carbono (Kumar et al., 2017). Asimismo, el efecto de los factores de estrés sobre las plantas, tienen al nitrógeno (N) como un segundo

mecanismo de respuesta. El nitrógeno es parte importante del estrés en las plantas y en la relación del C:N, que participa en la detección de los cambios climáticos (Montesinos-Navarro et al., 2017). Las especies reactivas de nitrógeno (ERN) en altas concentraciones pueden dañar las estructuras celulares. Los niveles altos de ERO y ERN causan estrés "nitrosativo" que causa distrés en la planta. Sin embargo, ERO y ERN en dosis bajas pueden conducir al fortalecimiento de la planta y a una alta tolerancia en respuesta al estrés (Kranner et al., 2010). Cuando se expresan los genes de defensa derivados del ERO y ERN, las proteínas codificadas minimizan el estrés ocasionado. Además de esta acción, se inducen varias vías bioquímicas del metabolismo especializado de la planta para producir un arsenal bioquímico de defensa contra el estrés percibido (Johansson et al., 2015).

### 2.3 Teoría del estrés

Las plantas adaptan su metabolismo como respuesta adaptativa para compensar los diversos factores de estrés a los que están sometidas, a este proceso se le ha llamado '**Hormé시스**' (Vargas-Hernandez et al., 2017). Estos factores de estrés disparan la respuesta del sistema inmune de las plantas al activar las respuestas transcripcionales y modificar su desarrollo, crecimiento y rendimiento. Sin embargo, la respuesta del organismo puede ser positiva y adaptativa (**eustrésica**) o negativa si el daño es irreversible (**distrésica**); estas respuestas dependen de la dosis y duración del factor de estrés (Vázquez-Hernández et al., 2019). El efecto de los factores de estrés puede seguirse en tres etapas de respuesta: 'alerta', 'resistencia' y 'extenuación', Figura 2.5. La etapa de 'alerta' activa la señalización de mensajeros alertando al organismo, la etapa de 'resistencia' desencadena las modificaciones transcripcionales y postraduccionales para su adaptación al estrés aun siendo reversible el efecto, y por último la fase de 'extenuación' es irreversible provocando la muerte del individuo (Vargas-Hernandez et al., 2017).

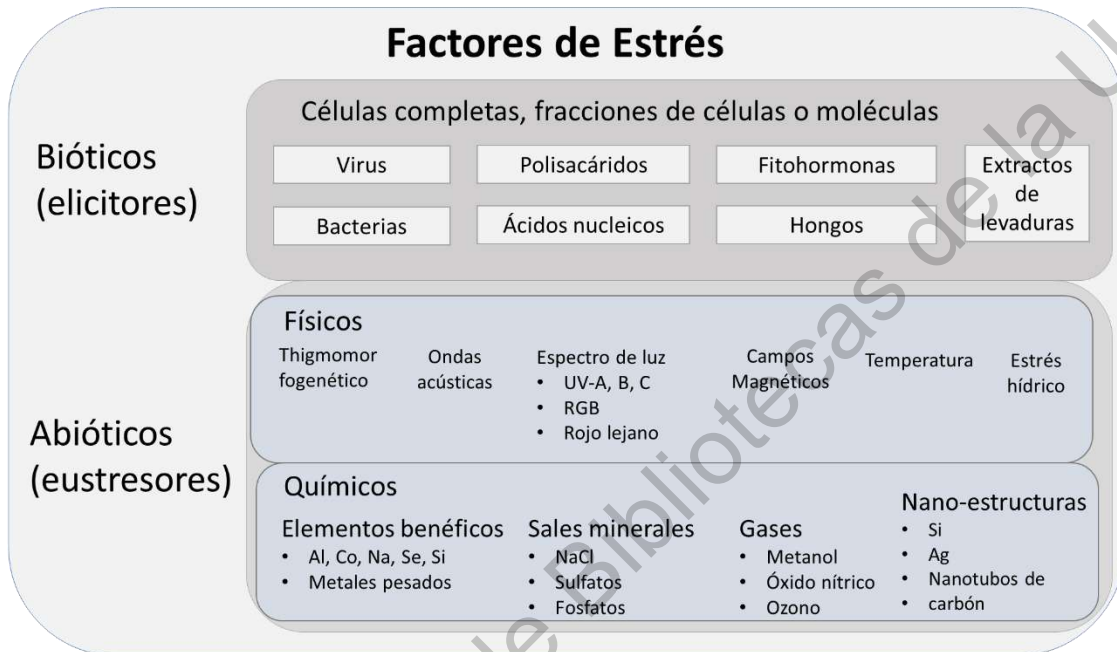


**Figura 2.5.** Curva hormética originada por la aplicación de factores de estrés en las plantas. Eustrés, hace referencia a la dosis y duración positiva del factor de estrés, mientras que distrés se refiere al factor de estrés prolongado o dosis tóxicas que provocan la muerte de la planta.

### 2.3.1 Clasificación de los factores de eustrés

Los factores de estrés se clasifican por su origen o naturaleza en bióticos y abióticos, Figura 2.6. Los factores bióticos (**elicitores**) son patrones moleculares de células completas o fracciones o compuestos específicos de virus, bacterias, hongos, extractos de levaduras, polisacáridos, ácidos nucleicos, feromonas y fitohormonas. Los **factores abióticos** se subclasifican en físicos (ondas acústicas, espectro de luz, temperatura, estrés hídrico, entre otros) y químicos (microelementos esenciales, sales minerales, gases y nano-estructuras) (Vázquez-Hernández et al., 2019). Un elicitor tiene efecto eustrésico si se activa el sistema de respuesta inmune teniendo como segundo efecto la síntesis de metabolitos especializados (ME) y/o metabolitos secundarios (MS), y puede ser bioestimulante si además mejora la eficiencia del uso de la nutrición, estimula el rendimiento de la

planta en biomasa foliar, radicular y en frutos (du Jardin, 2015). Incluso, algunos factores de estrés pueden tener efecto eustrésico y bio-estimulante al mismo tiempo (Mejía-Teniente et al., 2010; Vázquez-Hernández et al., 2019).



**Figura 2.6.** Clasificación de los factores de estrés basados en su naturaleza de origen.

Las plantas al activar el sistema de respuesta de defensa también activan el metabolismo secundario, y en algunos casos puntuales en el metabolismo primario, sustancias específicas llamadas metabolitos especializados (ME) que les permiten adaptarse al estrés aplicado (Kaciene et al., 2014; Kranner et al., 2010). La aplicación controlada de los factores de estrés puede incrementar la producción de MS y ME en los cultivos de frutas, hortalizas y plantas medicinales (Alvarado et al., 2019).

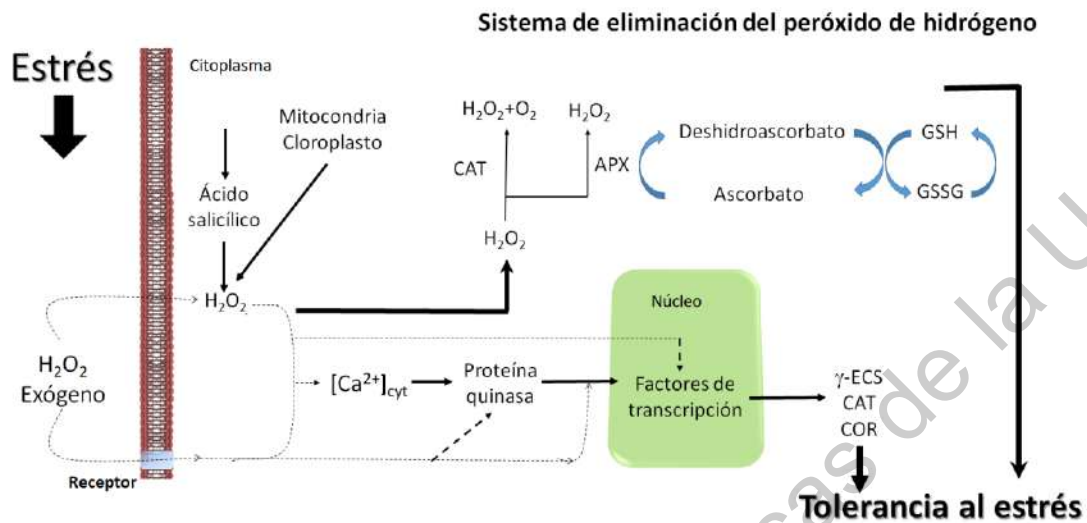
### 2.3.2 Elicitores

Los elicitores son una variedad de factores de estrés biológicos que desencadenan respuestas de defensa inducibles después de ser reconocidos por la planta, lo que proporciona una resistencia eficiente contra patógenos (Vázquez-Hernández et al., 2019). El peróxido de hidrógeno y el ácido salicílico son considerados como elicitores por su origen.

#### 2.3.2.1 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es nombrado como dioxigen, óxido de agua, dioxidano y agua oxigenada (Smirnoff and Arnaud, 2019). Es un compuesto químico polar y oxidante. El  $H_2O_2$  actúa como una molécula de señalización, en la maduración de la pared celular, funciones en la defensa, la rigidez por la acción de los factores de estrés, apertura de los estomas, las reacciones bio-sintéticas oxidativas y la muerte celular programada (Mustafavi et al., 2018). Una función novedosa del  $H_2O_2$  en la resistencia a enfermedades, es que actúa como señal exógena para el SAR, de la parte local del ataque trasloca la señal al resto de la planta (Kuźniak and Urbanek, 2000). Asimismo, en bajas concentraciones, el  $H_2O_2$  también participa en la transducción de señales en las rutas del metabolismo primario y secundario; y al mismo tiempo que incrementa y activa los genes de expresión, la activación enzimática y la apoptosis. Sin embargo, un aumento en los niveles celulares de  $H_2O_2$  se relaciona con varias alteraciones clave de las mismas, que incluyen mutaciones del ADN, proliferación celular, resistencia a la apoptosis, metástasis (Sun et al., 2016). El  $H_2O_2$  exógeno tiene menor impacto en el proceso de transducción de señales que el  $H_2O_2$  endógeno (Figura 2.7), (Hungarica, 2016).





**Figura 2.7.** Modelo para la inducción de la cascada de señalización de  $H_2O_2$ . APX: ascorbato peroxidasa, CAT: catalasa, COR: gen regulador del frío,  $\gamma$ -ECS: gamma glutalcisteína sintetasa, GSH: glutatión, GSSG: glutatión disulfido,  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno (Hungarica, 2016).

El pretratamiento con un nivel apropiado de  $H_2O_2$  puede mejorar la tolerancia al estrés abiótico a través de la modulación de múltiples procesos fisiológicos, tales como la fotosíntesis, y modulando múltiples vías de respuesta al estrés, tales como el ERO y las vías de desintoxicación metilgloxal (MG) (Hasanuzzaman et al., 2012). Las aplicaciones foliares de  $H_2O_2$  inducen tolerancia a la salinidad, sequía, heladas y altas temperaturas, estrés por metales pesados. Los tejidos vegetales pueden tolerar altas concentraciones de  $H_2O_2$  en el intervalo de  $10 \times 10^5 \mu M$  (Smirnoff and Arnaud, 2019). Por otra parte, las plantas de *Arabidopsis thaliana* pre-tratadas con  $H_2O_2$  fueron más resistentes al exceso de luz y esfuerzos de enfriamiento. La sensibilidad al estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  aumentó en presencia de un medio mínimo (Méndez-Bravo et al., 2011).

Recientemente, se encontró que las plántulas de ginseng *Panax* tratadas con  $100 \mu M$  de  $H_2O_2$  durante dos días mostraron una mayor tolerancia a la salinidad y un aumento de las actividades de APX, CAT y peroxidasa de guaiacol. Otros parámetros oxidativos como los niveles de MDA y los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  fueron

menores en las plántulas con estrés salino tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sathiyaraj et al., 2014). El peso seco de la plántula, el contenido de clorofila y carotenoides también fueron mayores en las plántulas tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que en los controles, después de que las plántulas fueron sometidas a estrés salino. Los hallazgos anteriores demuestran que la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede inducir tolerancia a la salinidad en las plantas mediante la modulación de procesos fisiológicos y metabólicos como la fotosíntesis, la acumulación de prolina y la detoxificación de ERO, y que esto conduce a un mejor crecimiento y desarrollo. Es importante destacar, que el metabolismo de ERO también desempeña un papel fundamental en el desarrollo de estrés y tolerancia al estrés cruzado (Sathiyaraj et al., 2014).

#### 2.3.2.2 Ácido salicílico

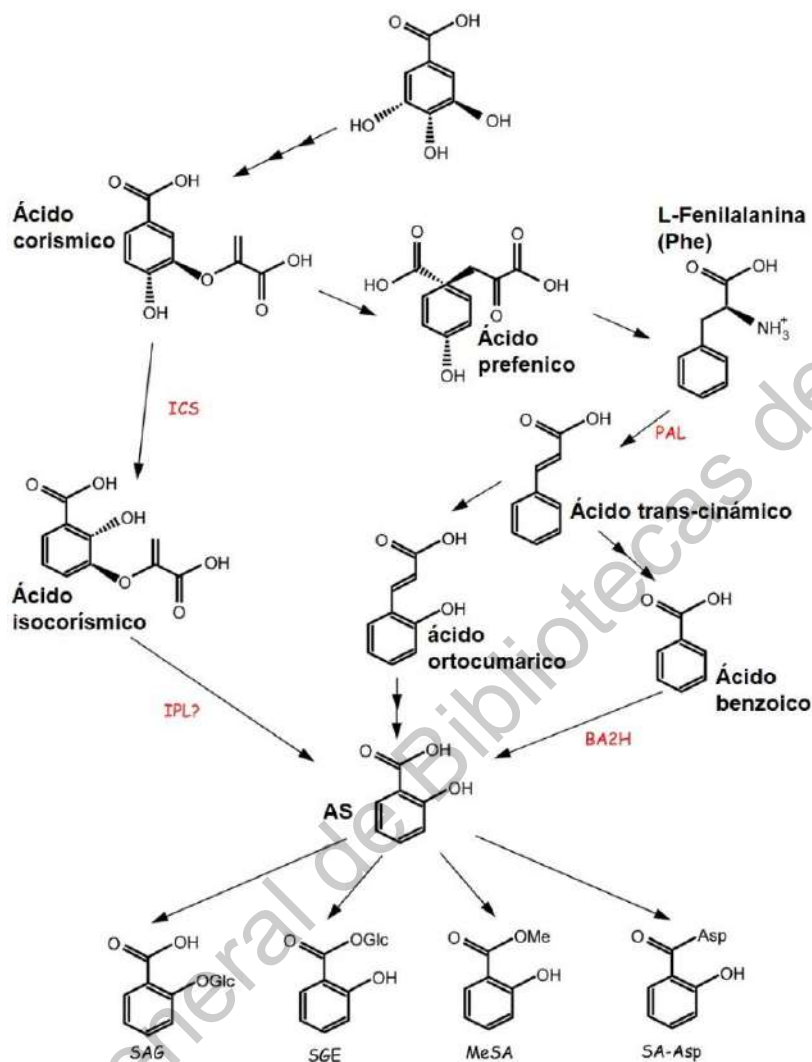
El ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico que interviene en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas y sus respuestas a los factores de estrés biótico y abiótico (J. Khan et al., 2015). AS participa en la regulación de importantes procesos fisiológicos de las plantas como la fotosíntesis, la respiración, formación de flores, producción y germinación de semillas, el metabolismo del nitrógeno, el metabolismo de la prolina (PRO), la producción de glicina betaína (GB), el sistema de defensa antioxidante y las relaciones planta-agua en condiciones de estrés (Farhangi-Abriz and Ghassemi-Golezani, 2018). Así como, de mantener los procesos de regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, de la inducción del SAR y HR, y regulación de las respuestas a los factores de estrés biótico y abiótico. Además, AS ha mostrado mejora en la tolerancia a metales pesados, sequía, altas temperaturas y salinidad en las plantas (Khalil et al., 2018; Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011).

El AS se forma como un producto de la vía del ácido shikímico; esta ruta participa en la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos vegetales (Dewick, 2002). Inicialmente, la ruta del ácido shikímico convierte los precursores de carbohidratos simples derivados del glicólisis y la ruta de fosfato pentosa a los

aminoácidos aromáticos, incluyendo el precursor de AS y fenilalanina. AS es sintetizado a través de dos distintas y apartadas vías que emplean diferentes precursores: la ruta de fenilpropanoides que inicia en el citoplasma desde fenilalanina, y la ruta del ácido benzoico que tiene lugar en el cloroplasto, mostrada en la Figura 2.8 (Dempsey et al., 2011; Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011).

Por otro lado, el ácido benzoico es sintetizado por el ácido cinámico ya sea a través de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos o una vía no oxidativa. Cinamato 4-hidroxilasa (C<sub>4</sub>H) cataliza la segunda etapa en la vía durante la conversión del ácido cinámico al ácido cumárico. El ácido cinámico se produce a partir de la fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). El ácido cinámico se hidroxila para formar el ácido cumárico seguido de la oxidación de la cadena lateral, y además se hidroxila y forma AS (Mur et al., 2013).

De igual manera, el AS exógeno también afecta las actividades de las enzimas del metabolismo del nitrato/nitrógeno, como son los metabolitos secundarios con alto contenido de N y las poliaminas (PA) (Mohammad Yusuf, Shamsul Hayat, Mohammed Nasser Alyemeni, 2013). Estos metabolitos tienen funciones fisiológicas en la asimilación de AS:N (Diao et al., 2017). El amonio se transforma en glutamato (GLU) por las actividades enzimáticas de la glutamina sintetasa y el glutamato sintasa bajo condiciones de estrés. El GLU es el precursor de los metabolitos ricos en N como son la putrescina y la prolina; y que produce intermediarios como el NO y la Ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Pisoschi and Pop, 2015). Además de la concentración de AS, la duración del tratamiento, las especies de plantas, la edad y el órgano de la planta tratados también pueden influir en los efectos de AS en las plantas (Ali, 2017). También, AS indujo a varios genes responsables de la codificación chaperona, proteínas de choque térmico (HSP), antioxidantes y metabolitos secundarios y el citocromo P450 (Kováčik et al., 2009; Singh et al., 2011).



**Figura 2.8.** Vías propuestas para la biosíntesis de AS y la modificación de AS. AS se sintetiza a través del isocorismato (ICS) o vías de la fenilalanina amonio liasa (PAL). SA también se convierte en varias formas. BA2H, ácido benzoico-2-hidroxilasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; MeSA, salicilato de metilo; SA-Asp, ácido saliciloil-L-aspartico; SAG, ácido salicílico 2-O-β-glucósido; SGE, éster de saliciloil glucosa La figura está adaptada de (Miura and Tada, 2014).

### 2.3.2.3 Aplicaciones de factores de estrés en plantas medicinales

Una posibilidad para incrementar la biosíntesis de metabolitos secundarios y especializados es el manejo del sistema inmunológico de la planta, a través de los

factores de estrés en una dosis adecuada (dosis eustrésica) utilizando la estrategia de elicitación controlada (Vázquez-Hernández et al., 2019).

Algunos ejemplos de las aplicaciones de los elicitores para incrementar ME y MS en plantas medicinales se refieren a continuación. El tratamiento con MeJA 100  $\mu\text{M}$  durante 48 h en las plántulas de *Eryngium planum* L. resultó en un aumento de aproximadamente 4.5 veces en el contenido de rosmarínico (RA) + clorogénico (CGA) + cafeico (CA) en comparación con el control (19.795 mg /g peso seco, 4.36 mg /g peso seco, respectivamente) (Kikowska et al., 2015). Rowe et al. (2012) aplicaron metil jasmonato (MeJA) en concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  y 1 mM en plantas de dos accesiones de *Helianthus annuus* L. No se observaron diferencias transcripcionales ni el cambio de la densidad inicial del tricoma glandular entre las plantas tratadas con MeJA y el control. Las plantas de ambas accesiones mostraron una fuerte inhibición del crecimiento en respuesta al tratamiento de MeJA 1 mM (Rowe et al., 2012).

EL salicato de metilo fue encontrado en los frutos y flores de *Stiffia chrysantha Mikan* después de su aplicación. Este resultado podría estar correlacionado con la defensa anti-herbívora y funcionar como una señal aerotransportada que activa la resistencia a la enfermedad y la defensa en esta especie vegetal en particular (Marques et al., 2012). He et al. (2012) aplicaron NaCl en diferentes concentraciones de 0-12 días para determinar el índice fisiológico en plántulas de *Chrysanthemum lavandulifolium*. El tratamiento de NaCl 100 mM/12vo día y NaCl 200 mM/6to día incrementaron las variables fisiológicas de permeabilidad de membrana, actividad de las enzimas peroxidasa (POD) y prolina, malon-dialdehído (MDA) y contenido de clorofila (He et al., 2012).

Puntualmente, aplicaciones de AS incrementan la biomasa y los metabolitos de interés. En *Matricaria chamomilla*, la aplicación de AS 50  $\mu\text{M}$  promovió su crecimiento (Kováčik et al., 2009). En otro caso, AS 0.1 y 0.5 mM promovieron la fotosíntesis y el crecimiento de *Vigna radiata*. El tratamiento con AS 50 mg/L en

brotos de *Paris polyphylla* aumentó el contenido de saponinas esteroides 3.6 veces ( $87.66 \pm 1.66$  mg/g de peso seco) (Raomai et al., 2014). El contenido de  $\alpha$ -tocoferol en las hojas de *Moringa oleifera* aumentó 187.5% en comparación con el control en campo abierto después de aplicaciones foliares de AS 0.1 mM. Este aumento representó en peso fresco 49.7 mg/100 g (Saini et al., 2014). La alcachofa (*Cynara scolymus*) pertenece a la familia Asteraceae, aplicaciones de AS 200  $\mu$ M tuvo un efecto significativo sobre el contenido de fenoles y flavonoides en medio Murashigue Skoog (Tanoori et al., 2015).

La aplicación foliar de AS 0.50 mM incrementó la producción de biomasa de las raíces, masa seca total, relación raíz/brote, clorofila a, contenido de clorofila a+b y la síntesis de compuestos secundarios en milenrama (*Achillea millefolium* L.) en condiciones de invernadero (Gorni and Pacheco, 2016). Las concentraciones de AS 0.50 y 1.00 mM son más efectivas en la producción de aceites esenciales y fenoles totales, con la consiguiente mejora de la actividad antioxidante del extracto de la planta (Gorni and Pacheco, 2016). Vázquez-Hernández et al. (2019) incrementó el contenido de glucósidos de esteviol en las hojas *Stevia rebaudiana* B. con AS 0.1 mM.

Puntualmente las aplicaciones de  $H_2O_2$  también incrementan el contenido de ME en las plantas. Como resultado de la aspersion de  $H_2O_2$  14 y 18 mM indujeron la expresión de genes y actividades enzimáticas relacionadas al estrés en plantas de *C. annuum* (Mejía-Teniente et al., 2013). Asimismo, estas mismas concentraciones en la misma variedad indujeron tolerancia a PepGMV por la atenuación/retraso o ausencia de síntomas (Mejía-Teniente et al., 2019). Las plántulas de calabaza con sequía media tuvieron aplicaciones de  $H_2O_2$  1.5 mM; este tratamiento foliar aumentó significativamente la biomasa, el contenido relativo de agua de las hojas y el contenido de clorofila. Mientras que las actividades de las enzimas antioxidantes aumentaron como superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POD), prolina (PRO) y los azúcares solubles (Sun et al., 2016). Aplicaciones de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17.5 mM en *Cicer arietinum* L. incrementaron el contenido de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante (León-López et al., 2020)

#### **2.4 Metabolitos especializados**

Bourgaud *et al.* (2001) describieron hace 200 años el metabolismo primario. En Biología, el concepto de “Metabolito Secundario” le es atribuido a Kossel (Bourgaud et al., 2001). Czapek indicó que estos compuestos podían ser derivados del metabolismo del nitrógeno (Czapek, 1921). Los metabolitos secundarios (MS) y especializados (ME) son compuestos de bajo peso molecular que se producen por especies vegetales o taxones específicos y son estructuralmente muy diversos provenientes del metabolismo secundario y en algunos casos del metabolismo primario (Shakya et al., 2019).

Los ME participan en la protección de las plantas contra infecciones microbianas y virales, herbivoría, radiación UV, atracción de polinizadores, espectro de luz, sales minerales, toxinas gaseosas, metales pesados, agua, CO<sub>2</sub>, alelopatía y señalización (Ahmed et al., 2009). El contenido de bioactivos de los ME es modificado por varias vías enzimáticas que pueden ser inducidas por factores de estrés. Los ME producidos en el cultivo de plantas se utilizan como productos farmacéuticos, toxicológicos, saborizantes, fragancias, colorantes, aditivos y conservadores de alimentos, agroquímicos; así como, la manipulación de los procesos metabólicos y control de las poblaciones microbianas en el ganado (Aharoni and Galili, 2011; Vélez-Terranova et al., 2014).

Las rutas bio-sintéticas son responsables de la existencia de ambos metabolitos primarios y secundarios. Las reacciones que se dan en las rutas bio-sintéticas consumen energía, combustible liberado por la ruta de glucólisis de hidratos de carbono y a través del ciclo del ácido cítrico (Michal and Schomburg, 2012). La oxidación de la glucosa, ácidos grasos y ácidos amino resultan en la formación de adenoseno trifosfato (ATP), que es una molécula de alta energía formada por el catabolismo de compuestos primarios. El ATP se recicla en reacciones anabólicas

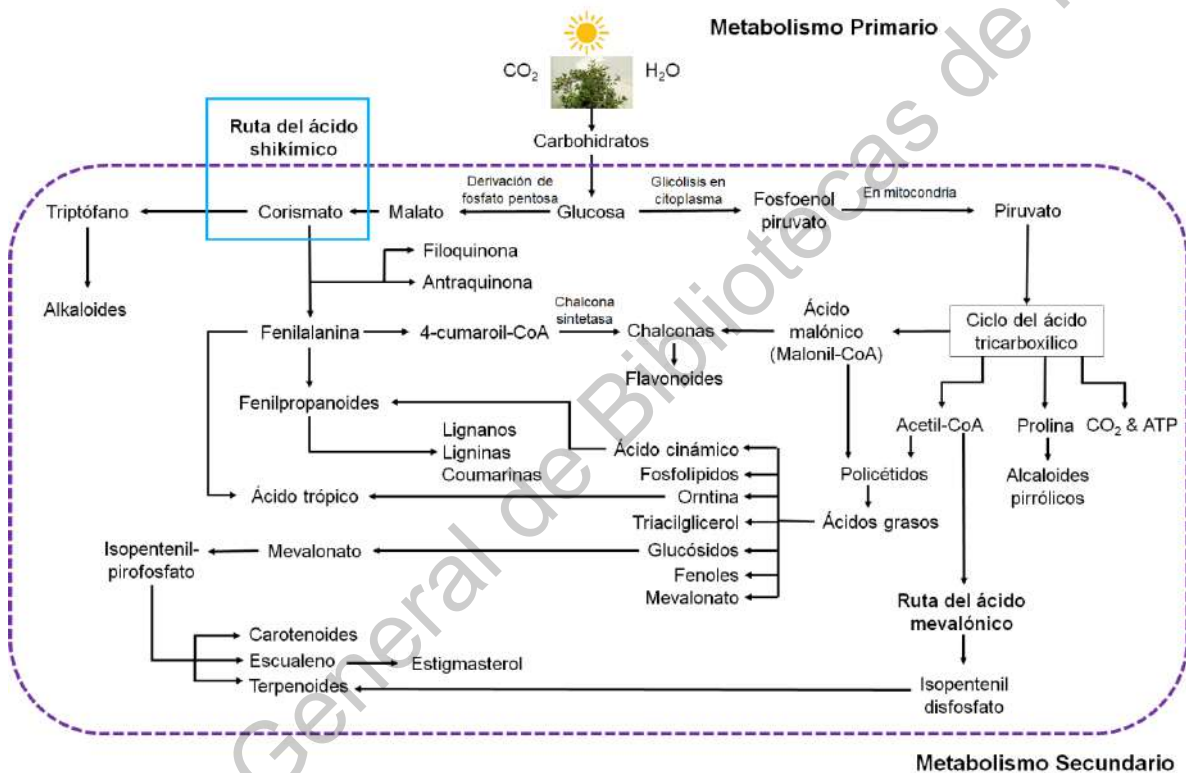
o de reducción de combustible que implica la participación de moléculas intermedias sobre las rutas; como son los agentes reductores o hidrógeno de donantes (nicotinamida adenina fosfato dinucleotido, NADP), (Figura 2.9), (Kabera et al., 2014).

En las rutas sintéticas se emplean catalizadores, algunas llamadas coenzimas, las más usada es CoA (coenzima A) compuesta de ADP (adenosina difosfato) y fosfato panteteína. Las vías clásicas para la biosíntesis se realizan a través de la pentosa para glucósidos, polisacáridos; Ácido shikímico para fenoles, taninos, alcaloides aromáticos; Acetato-malonato para fenoles y alcaloides y ácido mevalónico para terpenos, esteroides y alcaloides (Kabera et al., 2014). Como se muestra en la Figura 2.9, el esquema ilustra cómo los metabolitos del proceso de fotosíntesis, glicólisis y ciclo de Krebs se extraen del proceso generador de energía para proporcionar intermediarios biosintéticos. Los bloques de construcción importantes empleados en la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de acetil-CoA (acetil coenzima A), ácido shikímico, ácido mevalónico y 1-desoxilulosa 5-fosfato (Miura and Tada, 2014).

Los compuestos terpenoides y los esteroides se caracterizan por tener una estructura cíclica y una cadena principal de ciclopentano perhidrofenantreno, respectivamente. Entre ellos se encuentran sequiterpenos, triterpenos, diterpenos, monoterpenos, carotenos. Estos compuestos se usan en la industria como sabores, especias, aromas, edulcorantes naturales, reductores del colesterol, actividades antiparasitarias, antiinflamatorias, antiinflamatorias, antiateroscleróticas, antipalúdicas, anticancerígenas, cardiotónicas, anticonceptivas y antioxidantes (García-Mier et al., 2014) El ME que contiene nitrógeno está compuesto por alcaloides, glucosinolatos y glucósidos cianogénicos. Estos compuestos tienen agentes psicotrópicos, antineoplásicos, anticolinérgicos, antipalúdicos, antitusivos, antihipertensivos, analgésicos, neuroactivos, reguladores de los trastornos cardíacos, insecticidas y otras actividades biológicas (Sidhu, 2010). Sin embargo, pueden formar sales con ácidos y complejos con iones metálicos, algunas



sustancias derivadas son cancerígenas, hepatotóxicas y mutagénicas. Los compuestos fenólicos son compuestos aromáticos, que en su anillo están uniendo uno o más grupos hidroxilo ácido (Verma and Shukla, 2015). Éstos están integrados por arilpironas, flavonoides, cumarinas, ligninas, lignanos, estibenos, estililpironas y taninos. Tienen actividad antioxidante, anticancerígenos, protectores UV, antidiabéticos y anticoagulantes, entre otros (Ebrahimi and Mokhtari, 2017).



**Figura 2.9.** Esquema de biosíntesis de los metabolitos secundarios en plantas. Figura traducida de (Dewick, 2002).

Los metabolitos difieren en su contenido dependiendo del origen de las plantas. Por ejemplo, si las plantas son silvestres, presentan alta variabilidad en su composición química y genética (Gorelick and Bernstein, 2014). De acuerdo a Sánchez-Pujante *et al.*, (2017), las estrategias para incrementar los metabolitos secundarios son a través de la selección y mejoramiento de las plantas. Una de estas estrategias es por medio de la ingeniería genética y metabólica, a) a través

del incremento del flujo por una ruta biosintética, b) incrementar el número de células que los producen, y c) la inhibición y degradación de los productos de interés (Sánchez-Pujante et al., 2017).

La segunda estrategia es la elección de los nutrientes para el cultivo, entre las cuales se encuentran: a) macronutrientes, que son las fuentes de carbono (sacarosa), fosfatos (activación de enzimas y biosíntesis de metabolitos) y nitrógeno (síntesis de proteínas y ácidos nucleicos); b) los micronutrientes, los iones inorgánicos importantes para el metabolismo celular en forma de sales como son  $K^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mo^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , favoreciendo el aumento en la concentración de la biomasa, usando los bio-estimulantes en la síntesis del metabolito de interés mediante el incremento de la presión osmótica en el medio, e incrementando la disponibilidad de cofactores enzimáticos cuando actúan como grupo prostético; c) elementos traza, como vitaminas y fitohormonas, que median procesos de señalización relacionados al crecimiento, la diferenciación o la respuesta a factores ambientales, como son: auxinas (elongación celular), citoquininas (inducción de callos), giberelinas (estimula la elongación y división celular), ácido abscísico (estimulante), etileno (maduración, abscisión y respuesta a patógenos). La tercera estrategia es provocar variaciones en las condiciones físicas para el cultivo, como presión osmótica (balance hídrico, afecta el crecimiento, estrés osmótico), temperatura (estabilidad de proteínas, transcripción de genes, transferencia de calor), iluminación (longitud de onda, intensidad luminosa, fotoperiodo), pH (influye en el metabolismo secundario), (Sánchez-Pujante et al., 2017). Cabe señalar, que algunas partes de las plantas tienen altas concentraciones de estos compuestos ya sea que se sintetizan o no en ellas (Zaynab et al., 2018).

Diversas investigaciones señalaron que la ingesta de ciertos ME tendría un efecto positivo en la prevención de la incidencia de cáncer y muchas enfermedades crónicas. La utilización de inductores controlados se ha convertido en una estrategia para mejorar el rendimiento de ME en plantas silvestres. Además, estas técnicas aumentan la producción de biomasa y la acumulación excesiva de ME, aumentando

su valor comercial y medicinal (Cardenas-Manrriquez et al., 2016; Mejía-Teniente et al., 2013, 2010; Parola-Contreras et al., 2020b; Vargas-Hernández et al., 2017; Vázquez-Hernández et al., 2019).

## **2.5 Afinina, metabolito especializado de *H. longipes***

### **2.5.1 Distribución de las alcanidas y la afinina**

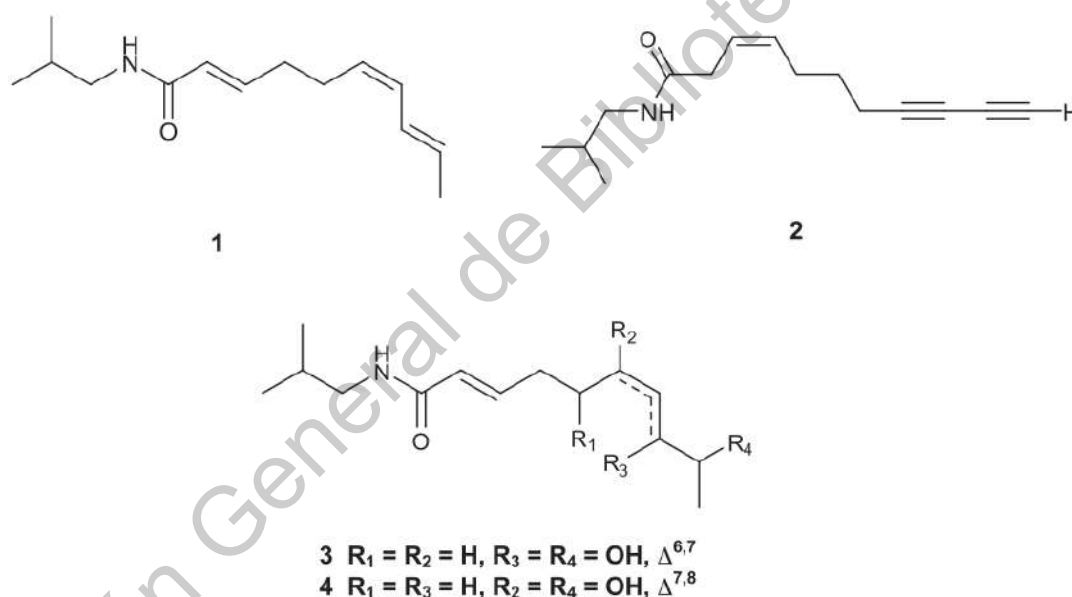
Recientemente, se han aislado 180 alcanidas con patrones puramente olefinicos de ocho familias de plantas: Asteraceae, Piperaceae, Rutaceae, Brassicaceae, Euphorbiaceae, Aristolochiaceae, Menispermaceae y Poaceae. El 75% de las alcanidas acetilénicas se sintetizan de las Asteraceae, donde se acumulan únicamente en las dos tribus Anthemideae y Heliantheae (Greger, 2016). Al analizar químicamente cinco especies de Heliantheae que contienen alcanidas olefinicas (*Wedelia parviceps* Blake, *Acmella ciliata* H.B.K., *Acmella oleracea* L., *Acmella oppositifolia* (Lam.) Jansen, y *H. longipes* S.F. Blake), se encontró que solo a *H. longipes* puede extraerse afinina con un rendimiento del 45% de un extracto seco (Rios et al., 2007). De igual forma, la afinina se encuentra como el componente principal en otras cinco especies de la familia Asteraceae: *Wedelia parviceps* (Johns et al., 1982), *Acmella ciliata*, *A. oleracea*, *A. oppositifolia* (Molina-Torres et al., 1999) y *Spilanthes acmella* (Nakatani and Nagashima, 1992; Singh and Chaturvedi, 2012).

### **2.5.2 Composición fitoquímica de las raíces de *H. longipes***

En las raíces de *H. longipes* se encuentran azúcares, flavonoides y terpenos, y en las hojas presencia de esteroides, terpenos y flavonoides (Cilia-López et al., 2008; García-Chávez et al., 2004). La primera vez que se aisló el principal componente de la raíz de *H. longipes* fue en 1945 por Acree *et al.* (1945) (Acree et al., 1945), compuesto que se nombró afinina (N-isobutil-2E, 6Z, 8E-decatrienoamida – C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO) (Bedolla-Cázares et al., 2017). La afinina es una alcanida que está presente en 90% del total de las alcanidas en las raíces desarrolladas de *H. longipes* (Arriaga-Alba et al., 2013; Buitimea-Cantúa et al., 2020b) y en los extractos

etanólicos de la raíz (Campos-García and Molina-torres, 2021). Asimismo, es uno de los metabolitos de mayor interés de *H. longipes* que tiene como propiedades las siguientes: medicinales, farmacológicas, culinarias e industriales (Campos-García and Molina-torres, 2021; Déciga-Campos et al., 2012).

Por su parte, López-Martínez et al. (2011) aislaron y elucidaron la estructura de tres alcanidas menores (Figura 2.10): N-isobutil-8,10-diinoico-3Z-undecenamida (2), N-isobutil-syn-8,9-dihidroxi-2E, 6Z -decadienamida (3), y N-isobutil-syn-6,9-dihidroxi-2E, 7E-decadienamida (4) a partir de raíces de *H. longipes*, junto con la afinina (1), entre otros compuestos adicionales de las raíces de *H. longipes* (López-Martínez et al., 2011).



**Figura 2.10.** Estructuras químicas de (1) Afinina, y alcanidas menores presentes en las raíces de *H. longipes* (López-Martínez et al., 2011).

### 2.5.3 Función de la afinina en las plantas

El rol intrínseco en las plantas que sintetizan alcanidas ha sido poco estudiado. Las alcanidas promueven la inducción de la defensa genética e interactúan con

moléculas de señal intercelular en humanos, bacterias y plantas (Buitimea-Cantúa et al., 2020b). La posición y la estereoquímica de los dobles enlaces son esenciales para las diferentes cualidades del sabor picante. Médicamente en los mamíferos, las alcanoidas poseen propiedades antiinflamatorias y analgésicas y son responsables de los efectos inmunomoduladores y cannabinomiméticos (Greger, 2016). La acumulación de las alcanoidas está restringida a tejidos específicos como raíces, flores, frutos o semillas, excepto en el género *Acmella* (Asterácea) donde se han detectado alcanoidas en toda la planta (Buitimea-Cantúa et al., 2020b).

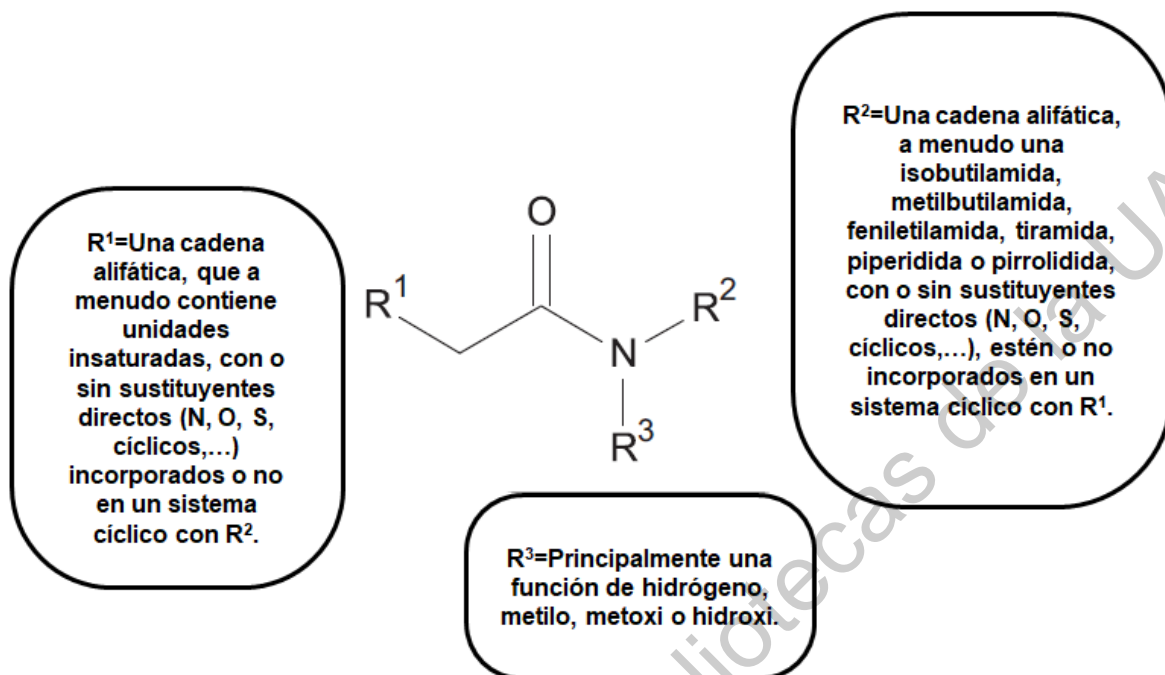
Las alcanoidas alifáticas y sus derivados promueven el crecimiento y cambian el desarrollo de las raíces dependiendo de la concentración (Boonen et al., 2012). Por ejemplo, la afinina en concentraciones de 7  $\mu\text{M}$  y 14 $\mu\text{M}$  estimularon el crecimiento de hojas y raíces de *Arabidopsis thaliana*, y afectaron la arquitectura del sistema radicular, el crecimiento de las raíces primarias y secundarias, al igual que la densidad de raíces laterales a través de la inducción de la expresión de los genes DR5:uidA y BA3:uidA en células de tricoblastos en las concentraciones dadas (Ramírez-Chávez et al., 2004). Asimismo, la aplicación de afinina en concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  en plántulas de *Solanum lycopersicum* aumentó el número y la longitud de raíces laterales emergentes (Campos-García and Molinartorres, 2021). Lo que sugiere que la acción de la afinina en las raíces de *H. longipes* es promover el crecimiento de las raíces laterales y mejorar el crecimiento de las raíces primarias (Méndez-Bravo et al., 2011).

#### **2.5.4 Estructura de las alcanoidas**

Las alcanoidas son productos naturales derivadas y el mayor constituyente lipofílico de ocho familias de plantas y por lo general son encontrados en altas concentraciones en las raíces y en menor contenido en la parte aérea de diferentes especies de plantas de las familias Asterácea y Piperaceae (Woelkart and Bauer, 2007); pero también algunas han sido encontrada en Brassicaceae. Las alcanoidas contienen principalmente una cadena de ácidos grasos alifáticos poliinsaturados y

un sustituto más corto amina acilada. Ambos pueden incluir sistemas cíclicos y/o hetero moléculas (nitrógeno, azufre, oxígeno) (Boonen et al., 2012). Más de 300 derivaciones son conocidas de ocho familias de plantas, que son la combinación de 200 ácidos con 23 aminas. Las partes de la amina se derivan de varios aminoácidos por descarboxilación. Aparte de las alcanidas de isobutilaminas generalizadas con aminas de anillo de seis y cinco miembros (Greger, 2016); también se encuentran las aminas derivadas de la isoleucina, fenilalanina, tirosina y leucina que sirven como precursores de etilbutil-, feniletil-, 4-hidroxifeniletil- e isopentilamina, respectivamente (Boonen et al., 2012) pertenecientes a las familias Asterácea y Piperaceae (Greger, 2016). La estructura básica de estos compuestos se muestra en la Figura 2.11.

El grupo R<sup>1</sup> corresponde con la parte de los ácidos grasos, mientras que la parte amina está representada por el grupo R<sup>2</sup>. Esta propiedad estructural se construye a partir de las dos partes, caracterizada por una serie de grupos metilo repetidos. Para ambas partes, hay trece grupos similares que pueden diferir en longitud, grado, lugar y configuración de insaturación. Asimismo, pueden poseer heteroátomos y carbocíclicos y/o heterocíclicos (incluso aromáticos y/o sustituido) (Boonen et al., 2012). La parte de los ácidos grasos está constituida por cadenas de carbono y diferentes patrones de dobles y triples enlaces formados por sucesivas actividades desaturasa y acetilénasa, respectivamente, frecuentemente acompañadas de isomerización (Minto and Blacklock, 2008). La mayoría de las longitudes de las cadenas de carbono se consideran derivados del ácido oleico C18 formado por diversas degradaciones oxidativas que conducen a acortamientos de la cadena en el sitio carboxilo y en el extremo metil (Greger, 2016). Para la parte amínica de las alcanidas, es muy probable que se deriven de varios aminoácidos por descarboxilación (Cortez-Espinosa et al., 2011).



**Figura 2.11.** Propiedades estructurales de las N-alquilamidas (Boonen et al., 2012).

### 2.5.5 Biosíntesis de las alcanidas

Como se mencionó anteriormente, las alcanidas son considerados metabolitos especializados de productos naturales formados al integrar ácidos alifáticos de cadena lineal, en su mayoría insaturados, con varias aminas mediante un enlace amida (Greger, 2016). Las raíces de *H. longipes* contienen afinina la cual pertenece al grupo de las alcanidas alifáticas (Johns et al., 1982). Por lo que la afinina está constituida de dos partes: la parte amina acilada y la parte ácida carboxílica (Rizhsky et al., 2016)

El aminoácido valina se consideró precursor de la isobutilamina, del dihidroisobutilamina y de deshidroisobutilamina. Y como enzima a la valina descarboxilasa (VDC) para llevar a cabo el proceso (Cortez-Espinosa et al., 2011). Adicionalmente, los estudios de Rizhky et al. (2016) establecieron que, para la formación de la isobutilamina, también se requiere una enzima dependiente de

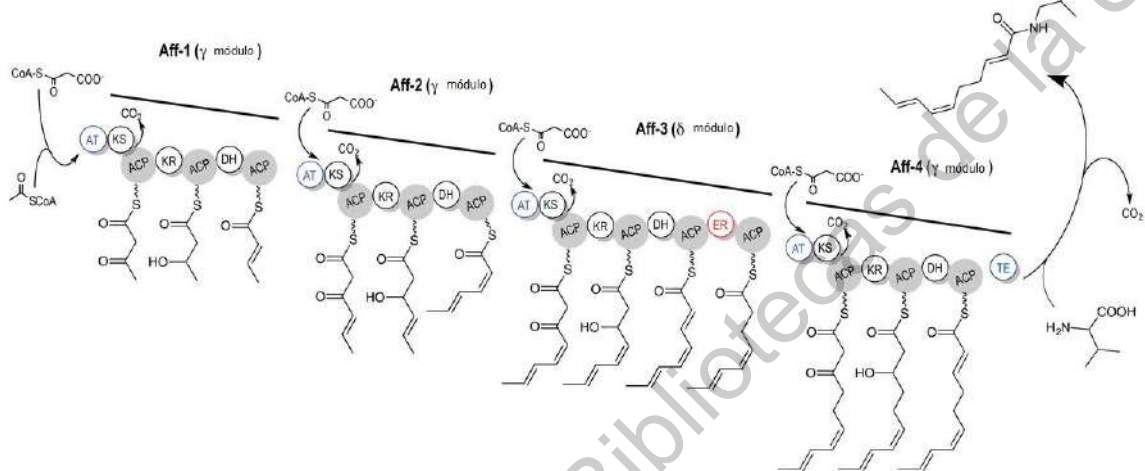
piridoxal, validando así a L-valina como precursor y al fosfato piridoxal como enzima co-dependiente para llevar a cabo la reacción y generar la parte amina en plantas de Echinacea. Por su parte, las partes ácidas de las alcanidas se consideran productos de las sintasas de ácidos grasos, que añaden unidades de malonil a una cadena acilo en crecimiento (Minto and Blacklock, 2008).

Incluyendo a Buitimea-Cantúa et al. (2020) realizaron el análisis de la expresión génica usando raíces de *H. longipes*, que dio como resultado un conjunto de genes candidatos involucrados en la biosíntesis de la cadena de acilo de la afinina. Asimismo, sugieren que puede ser realizado por un complejo policétido sintasa (PKS) de tipo I de cuatro módulos no iterativo, parcialmente reductor (PKS alcanidas). Los genes probados fueron AT2 (acil transferasa 2), DH1 (deshidratasa 1), DH3 (deshidratasa 3), KAS4 (3-cetoacil-ACP sintasa), OR2 (óxido reductasa 2 que incluye la K: ceto reductasa), OR3 (óxido reductasa 3 que incluye la K: ceto reductasa) y TE1 (tioesterasa 1).

El modelo propuesto de la vía para la biosíntesis de la cadena del acilo mediada por policétido sintasa (PKS) de las alcanidas por Buitimea-Cantúa et al. (2020), se muestra en la Figura 2.12. En esta, la cadena acilo de la afinina es una cadena lineal con un número par de carbonos, en donde las unidades de acetato están involucradas en su biosíntesis mediada por un ácido graso sintasa (FAS). La presencia de dobles enlaces en la cadena en posiciones pares puede deberse a la deficiencia de enzimas enoil reductasa (ER) de manera modular. Los genes expresados diferencialmente que codifican los dominios de policétido sintasa, cuatro transcripciones que codifican acil transferasa (AT), cetosintasa (KS) y deshidratasa (DH), siete transcripciones que codifican OR y once transcripciones que codifican los dominios enzimáticos ACP fueron encontrados para la síntesis de esta cadena (Buitimea-Cantúa et al., 2020b). El dominio KS cataliza una condensación descarboxilativa de Claisen (CO<sub>2</sub>) entre la cadena en crecimiento y una unidad extensora unida al dominio ACP (círculos grises), mientras que el dominio AT selecciona y carga una unidad extensora en la ACP. La óxido-reductasa

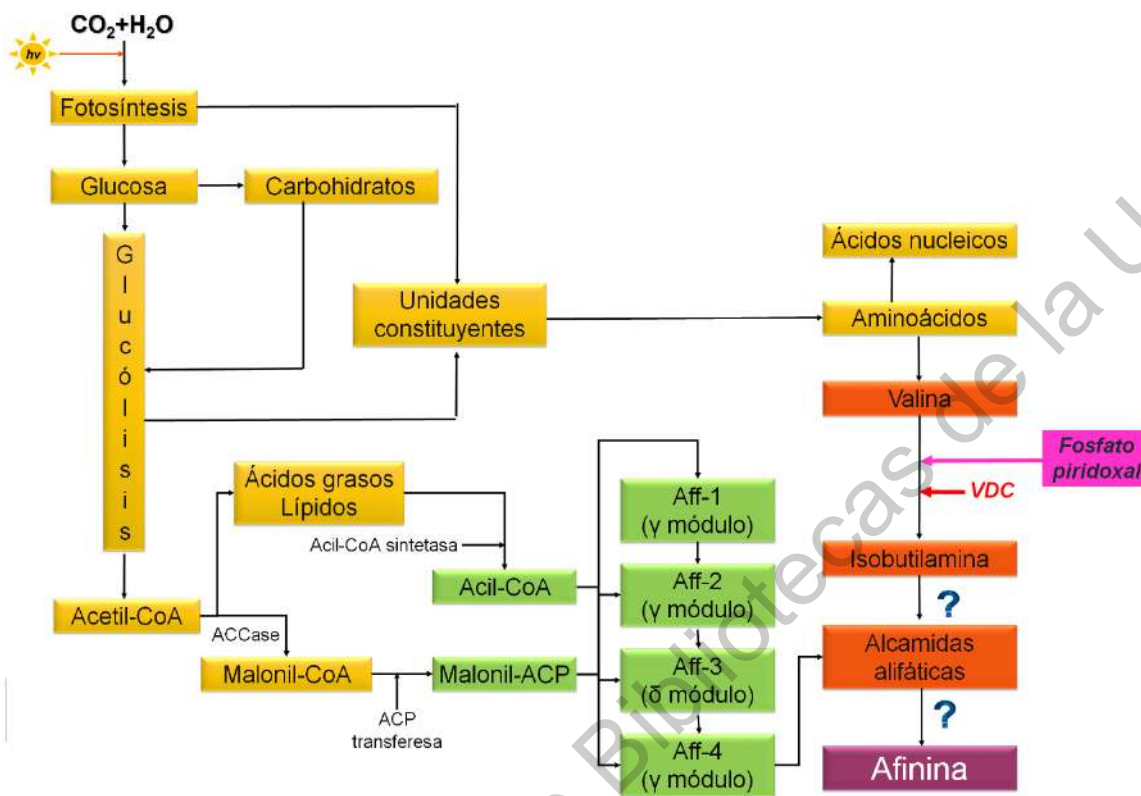


que incluye los dominios KR y DH reduce secuencialmente el grupo  $\beta$ -ceto a un grupo  $\beta$ -hidroxi y  $\alpha$ -doble enlace. Los dominios ER adicionales reducen el doble enlace a a un producto saturado y TE escinde la cadena de acilo sintetizada (Buitimea-Cantúa et al., 2020b).



**Figura 2.12.** La vía biosintética propuesta expone una arquitectura multi-modular y requiere acil-CoA como unidad de inicio y malonil-ACP como unidad de extensión. Dominios enzimáticos: ACP: proteína transportadora de acilo, AT: acil transferasa, KS: cetosintasa, KR: ceto reductasa, DH: deshidratasa, ER: enoil reductasa, TE: tioesterasa (Buitimea-Cantúa et al., 2020b).

La ruta biosintética propuesta por las investigaciones previamente citadas se muestra en la Figura 2.13.



**Figura 2.13.** Esquema de biosíntesis de las alcaloides: la parte amarilla representa el metabolismo primario, los bloques verdes representan la biosíntesis de la cadena acilo propuesta mediada por poliketido sintasa (PKS) de las alcaloides y los bloques naranjas especifica la ruta de los alcaloides alifáticos y de la afinina. Figura traducida y modificada de (Buitimea-Cantúa et al., 2020b; Dewick, 2009; Rizhsky et al., 2016; Schlüter et al., 2011; Subramanian et al., 2012).

### 2.5.6 Rendimiento de obtención de afinina

En todo el mundo, se registra que la colecta en el hábitat natural es la principal obtención de las plantas medicinales de importancia económica, con lo cual se tiene desigualdad en la cantidad y calidad (Barata et al., 2016; Jamwal et al., 2018). Además de esto, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) realiza reportes para identificar las especies amenazadas, esta especie amenazada puede ser preservada a través de dos estrategias de propagación: *in vitro* y convencional. Sin embargo, a pesar de que existen reportes de que las

poblaciones de *H. longipes* están disminuyendo con la cosecha de sus raíces, no se ha visto mencionada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo). La extracción de la afinina de la raíz de *H. longipes* requiere de grandes cantidades de raíz seca para obtener bajos rendimientos de esta sustancia (Castro-Ruiz et al., 2017). En el Cuadro 2.3 se registran los rendimientos de afinina obtenidos en estudios previos.

El procedimiento para la extracción de **afinina pura** hecho por Castro-Ruiz et al. (2017) se detalla en el [Anexo 1](#).

Analizando el Cuadro 2.3 vemos que efectivamente el rendimiento obtenido de forma natural es poco en comparación al material vegetal usado. Algunos gobiernos locales como el de Xichú, Gto. han tenido programas para preservar sus poblaciones en el municipio (Almaguer González, 2002). Sin embargo, García-Chávez et al. (2004) señalan que las personas que se dedican al cultivo de *H. longipes*, lo hacen por propagación de esquejes, en algunos casos por semilla y que el tiempo de desarrollo de las raíces para alcanzar el tamaño comercial es de dos a tres años (García-Chávez et al., 2004). Basados en la información anterior, es urgente establecer sistemas de cultivo sustentables para el aprovechamiento de especies endémicas como esta.

**Cuadro 2.3.** Rendimientos obtenidos de afinina reportados en diversos estudios de *H. longipes*.

Planta	Lugar de obtención del material vegetal	Cantidad de raíz usada	Solvente	Rendimiento obtenido de afinina	Referencia
<i>H. longipes</i>	Xichu, Guanajuato	1.5 Kg Raíz seca	Etanol absoluto	142.2 mg/mL	(Hernández-Morales et al., 2012)
<i>H. longipes</i>	Xichu, Guanajuato	Raíz seca	Acetato de etilo	7.3 mg/g	(Molinatorres et al., 1996)
<i>Acamella oppositifolia</i>	Sierra de Álvarez, San Luis Potosí	Raíz seca	Acetato de etilo	0.351 mg/g	(Molinatorres et al., 1996)
<i>Acamella oppositifolia</i>	Sierra de Álvarez, San Luis Potosí	Hojas secas	Acetato de etilo	0.172 mg/g	(Molinatorres et al., 1996)
<i>H. longipes</i>	Rio Verde, San Luis Potosí	100 g raíz fresca	Etanol absoluto	1 mg/kg afinina pura	(Cilia-López et al., 2010)
<i>H. longipes</i>	Xichu, Guanajuato	100 g raíz fresca	Etanol absoluto	10 mg/kg	(Cilia-López et al., 2010)
<i>H. longipes</i>	Xichu, Guanajuato	1 kg raíz fresca	Etanol	1% (w/w)	(Ramírez-Chávez et al., 2004)
<i>H. longipes</i>	Xichu, Guanajuato	4.7 kg raíz fresca	Etanol	0.86574 K	(Arriaga-Alba et al., 2013)
<i>H. longipes</i>	Xichu, Guanajuato	1 kg raíz seca	Etanol	7.84 mg/g	(Buitimea-Cantúa et al., 2020a)
<i>H. longipes</i>	Peñamiller, Querétaro	10 g raíz seca	Dichlorometano	19 g/kg	(Castro-Ruiz et al., 2017)
<i>H. longipes</i>	Peñamiller, Querétaro	7 Kg raíz seca	Dichlorometano	28.5 g de afinina pura	(Castro-Ruiz et al., 2017)
<i>H. longipes</i>	Peñamiller, Querétaro	10 g raíz seca	Etanol	17 g/kg	(Castro-Ruiz et al., 2017)

### III. HIPÓTESIS

#### 3.1 Hipótesis

La implementación de un sistema de producción de colectas de *Heliopsis longipes* del centro de México propagadas asexualmente, crecidas bajo condiciones protegidas y empleando elicitación controlada buscando dosis eustrésicas de peróxido de hidrógeno o ácido salicílico durante su cultivo, producirá efectos bio-estimulantes e incrementos en la concentración de afinina en raíces en las plantas, relacionados con incrementos en actividades enzimáticas antioxidantes y de producción de afinina.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo

Implementar un sistema de producción bajo condiciones protegidas de *Heliopsis longipes* utilizando colectas del centro de México de esta especie, propagadas asexualmente y empleando elicitación controlada con peróxido de hidrógeno y ácido salicílico durante su cultivo, buscando dosis eustrésicas de estos elicitores para producir efectos bio-estimulantes en la planta e incrementos de afinina en las raíces, asociados a la inducción de sistemas enzimáticos de respuesta a estrés oxidativo y de producción de afinina.

#### 4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la diversidad genética de colectas de *Heliopsis longipes* realizadas en los estados de Guanajuato y Querétaro.
2. Evaluar metodologías de propagación asexual de plantas de *Heliopsis longipes*.
3. Evaluar el efecto de la elicitación controlada con peróxido de hidrogeno y ácido salicílico en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Heliopsis longipes* colectadas en diferentes regiones del centro de México en invernadero.

4. Determinar las actividades enzimáticas de respuesta a estrés oxidativo y a producción de alcaloides alifáticos (afinina) en las plantas de *Heliopsis longipes* sometidas a elicitación controlada bajo condiciones de invernadero.
5. Determinar el contenido de afinina en las colectas de *Heliopsis longipes* sometidas a elicitación controlada.

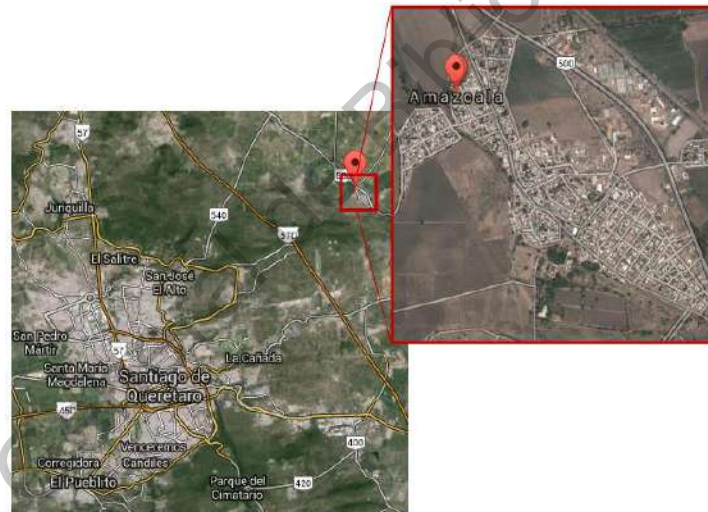
#### **4.3 Pregunta de investigación**

¿Es posible encontrar dosis eustrésicas de los elicitors  $H_2O_2$  y ácido salicílico que aplicados a las plantas de *Heliopsis longipes* colectadas en el centro de México y cultivadas en condiciones protegidas, estén relacionadas con efectos bioestimulantes e incremento del contenido de afinina en sus raíces?

## V. METODOLOGIA

### 5.1 Ubicación del área del proyecto de investigación

El experimento se desarrolló en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro Campus Amazcala. El poblado de Amazcala (Figura 5.1) pertenece al municipio El Marqués, Qro., el cual se localiza en el sector Suroeste del estado, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud Norte. Su longitud se encuentra entre los 100° 24' del Oeste a 1850 m s. n. m. Colinda al Oeste con el municipio de Querétaro, al Norte con el estado de Guanajuato, el Este con el municipio de Colón, y al Sur con los municipios de Huimilpan y Pedro Escobedo. La temperatura media oscila entre los 18°C y los 24°C, con un clima predominante subtropical, templado semi-seco.



**Figura 5.1.** Mapa de la ubicación del campus de Amazcala, municipio de El Marqués, Estado de Querétaro (Google Maps, 2018).

### 5.2 Especificaciones del invernadero

El invernadero en el que se realizó la experimentación es de perfil tubular galvanizado de 2", recubierto de plástico agrícola y malla anti-áfido en las ventanas laterales. Este invernadero tiene con una superficie de 17.5 m<sup>2</sup> (5 m de largo y 3.6

m de ancho). La cumbre está orientada este-oeste, con solo ventilación natural, las dos ventanas laterales son del tipo enrollable (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Invernadero local. UAQ campus Amazcala.

### **5.3 Obtención del material vegetal**

Los acodos de *Heliopsis longipes* se obtuvieron de cuatro localidades: Conca (marzo 2017) y San Juan Buenaventura (mayo 2018), en el municipio de Arroyo Seco, Querétaro; y del Rancho de Beltrán (mayo 2018) y el Ocotero (octubre 2019 y febrero 2020) en el municipio de Xichú, Guanajuato dentro de la Reserva de la Biosfera Sierra Gorda. Las condiciones ambientales de cada punto de colecta se muestran en el Cuadro 5.1.

Se hicieron muestras de suelo de todos los sitios de colecta, se realizaron análisis de suelo en Fundación Produce Querétaro, los cuales se muestran en el Cuadro 5.2.



**Cuadro 5.1.** Condiciones ambientales de los puntos de colecta de *H. longipes*.

Localidad	Municipio	Estado	Coordenadas geográficas (Longitud, Latitud)	Altitud (msnm)	Precipitación acumulada (mm)	Temperatura promedio (°C)	Clima
Concá	Arroyo Seco	Qro	-99.63, 21.44	560	860	24-26	Aw
San Juan Buenaventura	Arroyo Seco	Qro	-99.47, 21.35	1,400	872.2	20-22	ACw
Ocotero	Xichú	Gto	-100.05, 21.27	2,141	1384	14-16	Cwa
Rancho de Beltrán	Xichú	Gto	-100.04, 21.27	1,594	700	20 - 22	BS1h

Aw: Cálido subhúmedo con lluvias en verano, ACw: Semi-cálido subhúmedo con lluvias en verano. Cwa: templado subhúmedo con lluvias en verano, BS1h: Semi-seco muy cálido y cálido con régimen de lluvia en verano (INEGI, 2017a, 2017b).

**Cuadro 5.2.** Datos de análisis químicos del suelo de las colectas de *H. longipes*.

Localidad	Calcio (mg/Kg)	Potasio (mg/Kg)	Fosforo (mg/Kg)	Magnesio (mg/Kg)	Sodio (mg/Kg)	Conductividad eléctrica (dSm <sup>-1</sup> )	Materia Orgánica (%)	pH
Concá	5834.3	149.2	5.35	204.37	4.85	0.192	1.93	7.92
San Juan Buenaventura	9278.23	216.83	1.71	172.76	4.21	0.258	3.99	8.35
Rancho de Beltrán	3219.86	67.73	16.24	276.80	6.58	0.067	1.14	7.63
Ocotero	4 854.40	577.90	4.58	777.80	4.22	0.122	13.18	6.22

## OBJETIVO 1

### 5.4 Diversidad genética de las colectas de *Heliopsis longipes*

#### 5.4.1 Preparación del extracto para ADN

Para la obtención del tejido vegetal, se colectaron hojas jóvenes de cada una de las 29 colectas de chilcuague (*Heliopsis longipes*) 10 plantas de la localidad de Xichú, 9 de Concá y 10 de Arrollo seco. La extracción de ADN se hizo por duplicado, se utilizó el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1990) (Doyle and Doyle, 1990) con algunas modificaciones propuestas por Bermúdez-Guzmán et al. (2016) (Bermúdez-Guzmán et al., 2016), las cuales se describen a continuación:

Se cortaron hojas sanas y jóvenes, inmediatamente después de cortadas se molieron en un mortero con 2 mL de buffer de lisis CTAB (100 mM Tris HCL pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1.4 M de NaCl, 3% de CTAB y 1% PVP), y 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol concentrado, de la mezcla del tejido molido y el buffer de lisis, se transfirieron 500  $\mu$ L a un microtubo de 1.5 mL. Se le adicione a la solución, 5  $\mu$ L de Proteinasa K (20mg/mL), se agito por inversión y se colocó en baño María a 65°C por 60 min. Se le adicione 500  $\mu$ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), se agito en el vórtex y se centrifugo a 13,000 rpm/15 min, se repitió nuevamente este procedimiento. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 mL con 600  $\mu$ L de isopropanol frio y 100  $\mu$ L de acetato de sodio al 3.2 M pH 5.2, se refrigero a -20 °C por 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 1,000 rpm/10 min, se descartó el sobrenadante y se le adicione 500  $\mu$ L de etanol al 70%, se agito por inversión y nuevamente se centrifugo por 1,000 rpm/3 min, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla en toallas absorbentes. La pastilla se eluyo con 100  $\mu$ L de TE 1X.

Se cuantificó con la ayuda de un espectrofotómetro (NanoDrop 8000) y se complementó con una cuantificación visual en gel de agarosa a 1.5%. Se uniformizaron las diluciones a una concentración de 120 ng/ $\mu$ L de ADN. Para comprobar que la pureza del ADN era suficiente para realizar la PCR. Se amplificó en todas las muestras el fragmento del 26S con las siguientes condiciones.

La reacción se llevó a un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , con Buffer 10x, (2.0  $\mu\text{L}$ ),  $\text{MgCl}_2$  50x (1  $\mu\text{L}$ ), dNTP's 2.5Mm (2  $\mu\text{L}$ ), cebador 26s 5  $\mu\text{m}$  (4  $\mu\text{L}$ ), Taq polimerasa 1 U (0.2  $\mu\text{L}$ ), ADN 20ng/ $\mu\text{L}$  (3.0  $\mu\text{L}$ ). El programa utilizado en el termociclador fue: un ciclo a 94°C por 5 min seguido de 25 ciclos a 94°C 30 s, 60°C por un minuto, 72°C 30 s, y por ultimo un ciclo a 72 °C por 5 min.

#### **5.4.2 Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP - Amplified fragment length polymorphism)**

La técnica de AFLP se desarrolló según el protocolo descrito por Vos et al. (1995), pero utilizando fluoróforos adheridos a los iniciadores de la amplificación selectiva, con el fin de ser separados por electroforesis capilar y reconocidos por un secuenciador automático (Vos et al., 1995).

La técnica consta de tres pasos: 1) digestión-ligación: se realizó la digestión a 10 ng/ $\mu\text{L}$  de ADN de *Heliopsis longipes* con las enzimas EcoRI y MseI, posteriormente se ligó el producto de la digestión con adaptadores de doble cadena, específicos para cada enzima, 2) amplificación preselectiva: con el producto del paso anterior se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores del tipo EcoRI+A y MseI+C, 3) amplificación selectiva: se probaron 24 combinaciones de iniciadores selectivos del tipo EcoRI+3 / MseI+3 marcados con fluoróforos (Cuadro 5.3).

Los fragmentos AFLP se separaron y visualizaron por medio de una electroforesis capilar con el secuenciador automático Applied Biosystems 3500xL Genetic Analyzer, con los resultados obtenidos se genera una matriz de datos binarios. El archivo de datos binarios fue analizado con el programa NTSYS-pc versión 2.1 (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System) (Rohlf, 1992), para generar una matriz de similitud basada en el coeficiente DICE (Núñez-Colín and Valadez-Moctezuma, 2010), el cual considera para determinar la semejanza entre dos variedades solo las coincidencias. A partir de la matriz de similitud, se determinaron las relaciones genéticas entre el germoplasma estudiado, utilizando un dendrograma generado por un análisis de agrupamientos aplicando el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average*).

**Cuadro 5.3.** Bases selectivas de 24 distintas combinaciones probadas para evaluar diversidad genética 29 colectas de *H. longipes*.

Número	Bases selectivas de distintos iniciadores EcoR1+3	Bases selectivas de distintos iniciadores MseI+3
1	AAG	CAA
2		CAC
3		CAG
4		CAT
5		CGA
6		CGC
7		CGG
8		CGT
9	AGC	CAA
10		CAC
11		CAG
12		CAT
13		CGA
14		CGC
15		CGG
16		CGT
17	ACA	CAA
18		CAC
19		CAG
20		CAT
21		CGA
22		CGC
23		CGG
24		CGT

## OBJETIVO 2

### 5.5 Aclimatación de las accesiones de *H. longipes*

Los acodos fueron trasplantados en bolsas de 8 L/30 K con Peat moss® (musgo del género *Sphagnum*), composta y tezontle (1:2:1). Las plántulas se mantuvieron en condiciones de invernadero hasta que alcanzaron un mes, cinco y siete meses de aclimatación para su experimentación. La distribución de las plantas fue por hileras de 2 plantas mismas que fueron organizadas por colectas. Se tuvo una densidad de 5.7 plantas /m<sup>2</sup>. Las condiciones climatológicas durante la aclimatación y la experimentación fueron entre 18 - 28°C, fotoperiodo de 14 h luz/ 10 h oscuridad y 43% HR.

### 5.6 Evaluación de las metodologías de propagación asexual de plantas de *Heliopsis longipes*.

La forma predilecta de multiplicación de *H. longipes* es asexual, ya que forma raíces a partir de los nudos de los tallos maduros en contacto con el suelo, en especial durante las épocas húmeda y seca-fría. A este tipo de reproducción asexual se le llama estolón o acodo, (Figura 5.3), en especial durante las épocas húmeda y seca-fría (Cilia-López et al., 2008).

La planta de *H. longipes* al tener espacio en el sustrato va generando por si misma acodos (Figura 5.4). En las pruebas realizadas en tallos enterrados en el sustrato, se generan de 3 a 5 raicillas de 3 cm de largo en un periodo de dos meses. Asimismo, la propagación por acodos permite la multiplicación más controlada de las plantas, pudiendo hacer una selección de variedades y eco tipos.



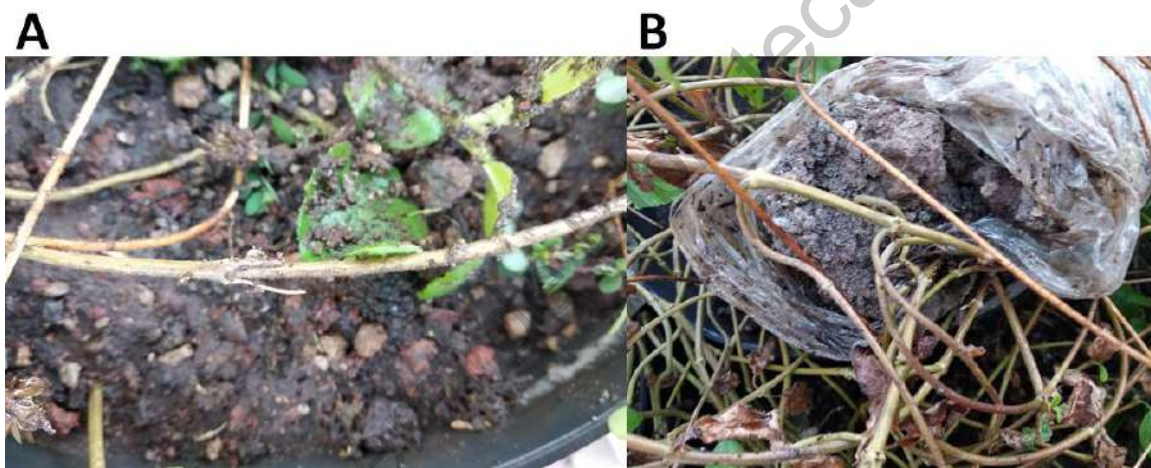
**Figura 5.3.** Propagación por acodo de *H. longipes*: A) Planta madre de tres años de aclimatación y B) acodo de la planta madre con un año de crecimiento de *H. longipes*.



**Figura 5.4.** A) Acodo de la planta de *H. longipes* en una maceta adyacente con el mismo sustrato. B) Raíz de acodo de un mes.

La propagación con tallos se hace con plantas sanas, vigorosas y con ramas de longitudes mayores a 20 cm. Las macetas se tienen con sustrato homogéneo y

marcadas con fecha del día en el que se hace el corte. El sustrato se prepara previamente con humus seco, composta y gravilla en proporción 1:1:1 y a capacidad de campo con agua corriente minutos antes de comenzar con la maniobra de las varas. Se prepara el enraizador comercial proroot® (4.5 g/5L agua). La solución del enraizador se vierte en un atomizador. Los nudos de los tallos se ponen en contacto con el sustrato a una profundidad de 2 cm y se rellena el espacio con más sustrato hasta que cubrir por completo, seguidamente se aplica con el atomizador el enraizador, de manera superficial hasta que el sustrato este suficiente mojado y se cubre con un plástico, encima de este último más sustrato como peso para mantener el tallo fijo (Figura 5.5).



**Figura 5.5.** A) Tallo para esquejar en el sustrato. B) Plástico con sustrato para mantener el tallo en su lugar.



### OBJETIVO 3

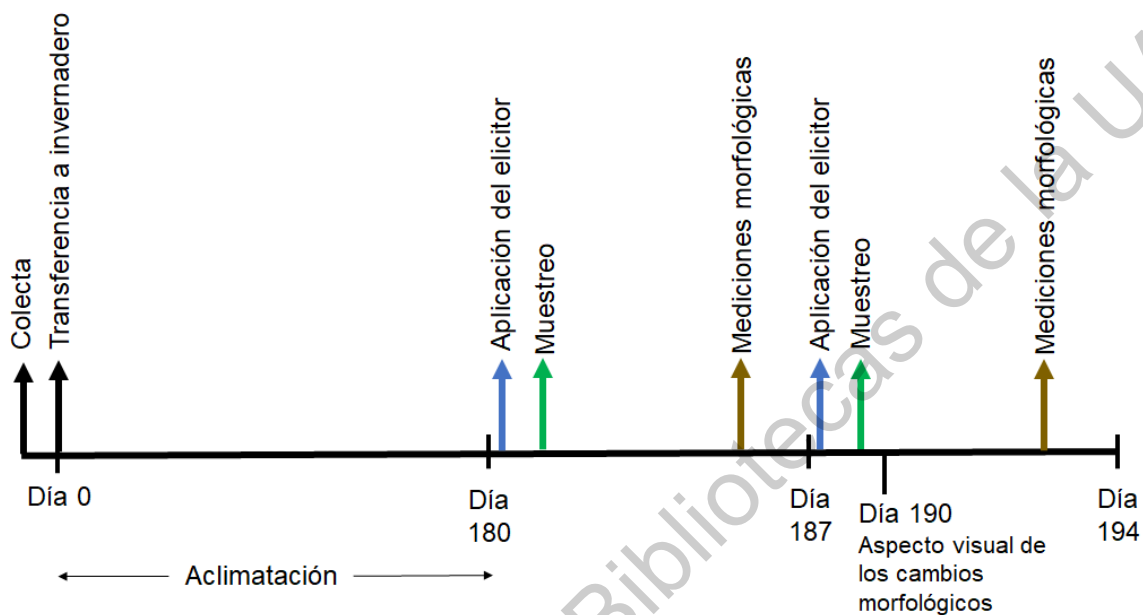
#### 5.7 Evaluación del efecto de la elicitación controlada mediante peróxido de hidrogeno y ácido salicílico en el crecimiento y desarrollo de plantas de *H. longipes* colectadas en diferentes regiones del centro de México en invernadero.

Se evaluaron los factores de estrés después de seis meses de aclimatación de las accesiones de *H. longipes* colectadas en Beltrán y Conca. Las variables morfológicas medidas fueron el ancho basal del tallo (W) en mm (medido con Vernier Multitoyo Absolute digital), altura del tallo (H) en mm y longitud de raíz (L) en mm (medidos con una regla graduada). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Las determinaciones se realizaron entre las 9:00-11:00 a.m. La duración de la exposición a los elicitors se determinó con base en Mejía-Teniente et al. (2013). Donde los resultados mostraron que la exposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y AS permanece durante 7 días en las plantas de *capsicum annuum*.

De acuerdo con lo descrito en antecedentes, las concentraciones de los factores de elicitación se determinaron en base a las investigaciones previas del grupo de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, las cuales se describen a continuación: ácido salicílico (AS) en un rango 1–10 mM, y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en un rango de 10-400 mM (Mejía-Teniente et al., 2013; Vargas-Hernández et al., 2017; M C Vázquez-Hernández et al., 2019). Las concentraciones representativas fueron seleccionadas para AS (10 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 mM). En el caso de AS, la concentración 10 mM es la concentración máxima de solubilidad en agua para fines prácticos en campo y sin agregar sustancias contaminantes (Mejía-Teniente et al., 2013). La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM tuvo respuesta morfológica significativa en *Stevia rebaudiana* B. cv. Morita II (Vázquez-Hernández et al., 2019).

Después del período de aclimatación (180 días), los factores de estrés se asperjaron sobre el área foliar por dos semanas seguidas. El control se realizó con agua destilada (Vázquez-Hernández et al., 2019). Para las determinaciones bioquímicas y moleculares, se tomaron las muestras (hojas, tallos y raíces) 2 h

después de la aplicación (Figura 5.6), se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta los análisis (Mejía-Teniente et al., 2013).



**Figura 5.6.** Línea del tiempo para acésión de seis meses de aclimatación con elicitores.

## OBJETIVO 4

### 5.8. Determinación de las actividades enzimáticas asociadas al eustrés, en las plantas que mejor respondieron a las variables de crecimiento para la producción de afinina en comparación contra un control

#### 5.8.1 Preparación de las muestras para ensayos enzimáticos.

Las muestras secas de raíz de *H. longipes* (0.3 g) de plantas individuales se homogeneizaron con 1 mL de búfer de extracción en frío y la suspensión se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se usó para determinar las actividades enzimáticas. La concentración de proteínas en los extractos enzimáticos se determinaron de acuerdo con el método reportado por Bradford (1976) (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.).

#### 5.8.2 Ensayo de la actividad Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

La actividad de superóxido dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés) se determina espectrofotométricamente ( $\lambda 560\text{nm}$ ) por la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio. Se determina de acuerdo al método reportado por Hayat et al. (2018) (Hayat et al., 2018).

##### 5.8.2.1 Principio



Las condiciones del ensayo fueron temperatura ambiente, pH 7.8, tiempo 30 minutos. La definición de unidad enzimática (U). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (SOD) que inhibe el 50% de la reducción de NBT por superóxidos generados, bajo las condiciones del ensayo. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (SOD) que realiza el 50% de la reducción de radicales superóxido, bajo las condiciones del ensayo. Los reactivos requeridos fueron fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, EDTA-Na<sub>2</sub> (ácido etilendiaminotetraacético-disodio), L-Metionina, NBT

(Nitroazul de tetrazolio) y riboflavina. La preparación de las soluciones verla en [ANEXO 2](#). Las soluciones que se usaron fueron:

1. Búfer de extracción (Fosfato de potasio 0.05 M, pH 7.8).
2. Búfer de reacción (Fosfato de potasio 0.05 M, pH 7.8).
3. Solución de EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 mM.
4. Solución de Metionina 0.13 M.
5. Solución de NBT 0.75 mM.
6. Solución de Riboflavina 0.02 mM.

#### 5.8.2.2 Procedimiento

##### 5.8.2.2.1 Ensayo de actividad enzimática (en celda)

1. Se colocó 1.5 mL de búfer de reacción en un tubo de ensayo.
2. Se añadieron 0.3 mL de EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 mM, 0.3 mL de Metionina 0.13 M, 0.3 mL de NBT 0.75 mM, 0.3 mL de Riboflavina, 0.05 mL del extracto enzimático y 0.25 mL de agua destilada.
3. Se mezcló por inversión de los tubos.
4. Se expusieron los tubos a luz fluorescente durante 30 min (desarrollo de color).
5. Se midió la absorbancia a  $\lambda_{560\text{nm}}$ .
6. Se elaboró un blanco de reacción, el cual contuvo todos los reactivos del paso 2 excepto el extracto enzimático (cambiar por agua destilada).

#### 5.8.2.3 Cálculos

Calcular el % de inhibición de reducción de NBT, utilizando la siguiente ecuación

(1):

$$\% \text{Inhibición} = (1 - A/B) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$A = A_{\lambda_{560\text{nm}}}$  de la muestra de reacción

$B = A\lambda_{560nm}$  del blanco de reacción

A partir de la curva patrón de % de inhibición de reducción de NBT versus actividad de SOD, ver ANEXO 2:

$$y = 8.6026 \cdot \ln(x) + 55.836 \quad (2)$$

Donde:

y = % Inhibición

x = Actividad de SOD (U/mL)

Despejar x

$$x = e^{\left(\frac{y-55.836}{8.6026}\right)} \quad (3)$$

Sustituir el valor de % inhibición (y) obtenido de la ecuación (1) en la ecuación (3) y calcular la actividad de SOD (x).

### 5.8.3 Ensayo de la actividad Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

La actividad de catalasa (CAT, por sus siglas en inglés) se determina espectrofotométricamente ( $\lambda 240nm$ ) por la cuantificación de peróxido de hidrógeno catalizado. Se determina de acuerdo al método reportado por Afiyanti & Chen (2014) con modificaciones (Afiyanti and Chen, 2014).

#### 5.8.3.1 Principio

Peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Sustrato

→

Agua (H<sub>2</sub>O)

Producto

Las condiciones del ensayo fueron temperatura ambiente, pH 8.0, tiempo 6 minutos. La definición de unidad enzimática (U). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (CAT) que cataliza (consume) 1  $\mu\text{mol/min}$  de peróxido de hidrógeno, bajo las condiciones del ensayo. Los reactivos requeridos

fueron fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, glicerol, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Tris-HCl y 2- Mercaptoetanol. La preparación de las soluciones verla en [ANEXO 2](#). Las soluciones que se usaron fueron:

1. Búfer de extracción (Tris-HCl 100 mM, Glicerol 20 % v/v, 2-Mercaptoetanol 30 mM, pH 8.0).
2. Búfer de reacción (Fosfato de potasio 50 mM, pH 8.0).
3. Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM.

#### 5.8.3.2 Procedimiento

##### 5.8.3.2.1 Preparación del extracto enzimático

1. Se pesó 0.3 g de muestra vegetal y se homogeneizó en un mortero con 1 mL de búfer de extracción a 4 °C.
2. Posteriormente, se colocó la muestra homogeneizada en un tubo de ensayo, se agregó 1 mL de búfer de extracción y se agitó en vortex durante 2 min.
3. Se centrifugó la mezcla a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
4. Se separó el sobrenadante (extracto enzimático) y almacenar a 4 °C.

##### 5.8.3.2.2 Ensayo de actividad enzimática (en celda)

1. Se colocó 2 mL de búfer de reacción.
2. Se añadió 0.2 mL de solución de peróxido de hidrógeno.
3. Se añadió 0.1 mL de extracto enzimático.
4. Se midió el cambio de absorbancia  $\lambda$ 240nm durante 6 min (una lectura cada minuto).

#### 5.8.3.3 Cálculos

$$U = \frac{(\Delta A_{240nm})(Vt)(FD)}{(\varepsilon)(Ve)(L)} \quad (4)$$

$\Delta A_{240nm}$  = cambio de absorbancia por min

$V_e$  = volumen del extracto

$V_t$  = volumen total del ensayo

$FD$  = factor de dilución

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de peróxido de hidrógeno (0.0394 M/m · cm)

$L$  = longitud de la celda

#### 5.8.4 Ensayo de la actividad Fenilalanina-amonio liasa (PAL) (EC 4.3.1.5)

La actividad de Fenilalanina-amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés) se determina espectrofotométricamente ( $\lambda_{290nm}$ ) por la cuantificación de ácido cinámico formado a partir de la catálisis de L-fenilalanina de acuerdo al método reportado por Toscano *et al.* (2018) con modificaciones (Toscano *et al.*, 2018).

##### 5.8.4.1 Principio

L-Fenilalanina

Sustrato



Ácido cinámico

Producto

Las condiciones del ensayo fueron temperatura 40 °C, pH 8.8, tiempo 60 minutos. La definición de unidad enzimática (U). Es una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (PAL) que produce 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de ácido cinámico, bajo las condiciones del ensayo. Los reactivos requeridos fueron ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido cinámico, borato de sodio, L- Fenilalanina y 2-mercaptoetanol. La preparación de las soluciones verla en [ANEXO 1](#). Las soluciones que se usaron fueron:

1. Búfer de extracción (Borato 0.1 M, 0.1% v/v de 2-Mercaptoetanol, pH 8.8).
2. Búfer de reacción (Borato 0.1 M, L-Fenilalanina 10 mM, pH 8.8).

3. Solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 N.
4. Solución Stock de ácido cinámico [3 mg/mL].

#### 5.8.4.2 Procedimiento

##### 5.8.4.2.1 *Preparación del extracto enzimático:*

1. Se pesó 0.3 g de muestra vegetal y se homogeneizó en un mortero con 1 mL de búfer de extracción a 4 °C.
2. Posteriormente, se colocó la muestra homogeneizada en un tubo de ensayo, agregar 1 mL de búfer de extracción y agitar en vortex durante 2 min.
3. Se centrifugó la mezcla a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
4. Se separó el sobrenadante (extracto enzimático) y almacenar a 4 °C.

##### 5.8.4.2.2 *Preparación de curva patrón:*

1. Se pipeteó de la solución stock de ácido cinámico 0.67, 2, 3.3, 4.6, 6, 7.3 y 8.7 mL en matraces aforados de 50 mL, previamente etiquetados y se aforó a 50 mL con agua destilada.
2. Dichas soluciones tuvieron una concentración de 0.2, 0.6, 1, 1.4, 1.8, 2.2 y 2.6 mg/mL, respectivamente.
3. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ 340nm) de cada dilución y de la solución stock (3 mg/mL).

##### 5.8.4.2.3 *Ensayo de actividad enzimática (en microplaca)*

1. Se colocó 230  $\mu$ L de búfer de reacción y se añadió 20  $\mu$ L de extracto enzimático.
2. Se incubó la mezcla a 40 °C durante 60 min.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 50  $\mu$ L de solución de HCl 1 N (para detener la reacción) y se dejó reposar 10 min.
4. Se midió la absorbancia a  $\lambda$ 290nm.



5. Se elaboró un blanco, el cual contuvo 250  $\mu\text{L}$  de búfer de reacción.

#### 5.8.4.2.4 *Ensayo de actividad enzimática (en celda)*

1. Se colocó 2.3 mL de búfer de reacción y se añadió 0.2 mL de extracto enzimático.
2. Se incubó la mezcla a 40 °C durante 60 min.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 0.5 mL de solución de HCl 1 N (para detener la reacción) y se dejó reposar durante 10 min.
4. Se midió la absorbancia a  $\lambda 290\text{nm}$ .
5. Se elaboró un blanco, el cual contuvo 2.5 mL de búfer de reacción.

#### 5.8.4.3 Cálculos

A partir de la curva patrón de ácido cinámico, ver ANEXO 2.

$$y = 0.0753x + 0.0714 \quad (5)$$

Donde:

$$y = A\lambda 290\text{nm}$$

$$x = \text{Concentración de ácido cinámico (mg/mL)}$$

Despejar x:

$$x = \frac{y - 0.0714}{0.0753} \quad (6)$$

Unidad

$$\frac{U}{\text{mL}} = \frac{(x)(Vt)(1000)}{(PM)(t)(Ve)} \quad (7)$$

x = concentración de ácido cinámico

Ve = volumen del extracto

Vt = volumen total del ensayo

PM = peso molecular del producto (ácido cinámico)

t = tiempo de la reacción

1000 = factor de conversión de unidades

### 5.8.5 Ensayo de la actividad Valina descarboxilasa (VDC) (EC 4.1.1.14)

La actividad de valina descarboxilasa (VDC) se determina espectrofotométricamente ( $\lambda 550\text{nm}$ ) por la cuantificación de isobutilamina formada a partir de la catálisis de L-valina. La determinación se hizo de acuerdo al método reportado por Cortez-Espinoza et al. (2010) con modificaciones (Cortez-Espinoza et al., 2011).

#### 5.8.5.1 Principio

L-Valina

Sustrato



Isobutilamina

Producto

Las condiciones del ensayo fueron temperatura 42 °C, pH 7.5, tiempo 60 minutos. La definición de unidad enzimática (U). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (VDC) que produce 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de isobutilamina, bajo las condiciones del ensayo. Los reactivos requeridos fueron acetona, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, fosfato de piridoxal, L- Valina y 2- Mercaptoetanol. La preparación de las soluciones verla en [ANEXO 1](#). Las soluciones que se usaron fueron:

1. Búfer de extracción (Fosfato de potasio 50 mM, Fosfato de piridoxal 50  $\mu\text{M}$ , 2-Mercaptoetanol 1 mM, pH 8.0).

2. Búfer de reacción (Fosfato de potasio 50 mM, Fosfato de piridoxal 1 mM, L-Valina 1 mM, pH 7.5).

#### 5.8.5.2 Procedimiento

##### 5.8.5.2.1 *Preparación del extracto enzimático*

1. Se pesó 0.3 g de muestra vegetal y homogeneizar en un mortero con 1 mL de búfer de extracción a 4 °C.
2. Posteriormente, se colocó la muestra homogeneizada en un tubo de ensayo, agregar 1 mL de búfer de extracción y agitar en vortex durante 2 min.
3. Se centrifugó la mezcla a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C.
4. Se separó el sobrenadante (extracto enzimático) y almacenar a 4 °C.

##### 5.8.5.2.2 *Ensayo de actividad enzimática (en microplaca)*

1. Se colocó 200 µL de búfer de reacción y añadir 40 µL de extracto enzimático.
2. Se incubó la mezcla a 42 °C durante 60 min.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 15 µL de acetona y se colocó en baño de hielo (para detener la reacción) durante 10 min. Posteriormente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min.
4. Se midió la absorbancia a  $\lambda 550\text{nm}$ .
5. Se elaboró un blanco, el cual deberá contener: 240 µL de búfer de reacción.

##### 5.8.5.2.3 *Ensayo de actividad enzimática (en celda)*

1. Se colocó 1.4 mL de búfer de reacción y se añadió 0.3 mL de extracto enzimático.
2. Se incubó la mezcla a 42 °C durante 60 min.

3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 0.1 mL de acetona y se colocó en baño de hielo (para detener la reacción) durante 10 min. Posteriormente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min.
4. Se midió la absorbancia a  $\lambda 550\text{nm}$ .
5. Se elaboró un blanco, el cual deberá contener 1.7 mL de búfer de reacción.

#### 5.8.5.3 Cálculos

$$U = \frac{(A_{550\text{nm}})(Vt)(1000)}{(\epsilon)(Ve)(t)(L)} \quad (8)$$

$A_{550\text{nm}}$  = absorbancia de la muestra de reacción

$Ve$  = volumen del extracto

$Vt$  = volumen total del ensayo

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar de isobutilamina (17400 M/m · cm)

$t$  = tiempo de la reacción

$L$  = longitud de la celda

1000 = factor de conversión de unidades

### 5.8.6 Determinación de proteína

#### 5.8.6.1 Principio

La concentración de proteína se determina espectrofotométricamente ( $\lambda 595\text{nm}$ ) por la cuantificación del complejo azul brillante de Coomassie G-250 con la proteína de la muestra. Se determina de acuerdo al método reportado por Bradford (1976) (Bradford, 1976). Los reactivos requeridos fueron: reactivo de Bradford y cloruro de Sodio. La preparación de las soluciones verla en [ANEXO 1](#). Las soluciones que se usaron fueron:

1. Solución de cloruro de sodio 0.15 M.
2. Solución Stock de albúmina de suero bovino [1 mg/mL].

## 5.8.6.2 Procedimiento

### 5.8.6.2.1 Preparación de curva patrón

1. Pipetear de la solución stock de albúmina de suero bovino 2, 4, 6 y 8 mL en matraces aforados de 10 mL, previamente etiquetados y aforar a 10 mL con agua destilada.
2. Dichas soluciones tendrán una concentración de 0.2, 0.4, 0.5 y 0.8 mg/mL, respectivamente.
3. Leer la absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ 595nm) de cada dilución y de la solución stock (1 mg/mL).

### 5.6.8.2.2 Determinación de proteína en microplaca

1. Se mezcló 20  $\mu$ L de muestra (extracto enzimático) con 230  $\mu$ L de reactivo de Bradford.
2. Se dejó reposar durante 20 min (en la oscuridad).
3. Se midió la absorbancia a  $\lambda$ 595nm.
4. Se preparó un blanco con 250  $\mu$ L de solución de cloruro de sodio.

### 5.6.8.2.3 Determinación de proteína en celda

1. Se mezcló 50  $\mu$ L de muestra (extracto enzimático) con 1.5 mL de reactivo de Bradford.
2. Se agitó en vortex durante 30 segundos.
3. Se dejó reposar durante 20 min (en la oscuridad).
4. Se midió la absorbancia a  $\lambda$ 595nm.
5. Se preparó un blanco con 1.5 mL de solución de cloruro de sodio.

### 5.8.6.8.3 Cálculos

A partir de la curva patrón de albúmina de suero bovino, ver ANEXO 2.

$$y = 0.5066x + 0.0085 \quad (9)$$

Donde:

$$y = A\lambda_{595\text{nm}}$$

x = Concentración de albúmina (mg/mL)

Despejar x:

$$x = \frac{y - 0.0085}{0.5066} \quad (10)$$

\*Nota: cuando sea el caso el valor de x obtenido a partir de la curva patrón se multiplica por el factor de dilución (FD) correspondiente.

## **OBJETIVO 5**

### **5.9. Determinar la producción de afinina en las plantas de *H. longipes* sometidas a elicitación controlada bajo condiciones de invernadero.**

#### **5.1.1 Procesamiento de muestras para la determinación del contenido de afinina en las raíces de *H. longipes***

Los extractos de raíz de *H. longipes* se prepararon para las determinaciones del contenido de afinina como sigue: las muestras de raíz de plantas individuales se liofilizaron durante tres días, se molieron hasta obtener un polvo fino homogeneizado. La muestra (10 mg) se maceró con 1 mL de etanol (grado reactivo), se sonicó durante 15 min, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C; y se recuperó el sobrenadante. Los extractos se concentraron en un concentrado Savant™ SpeedVac™ a 4 °C durante dos días. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 1 mL de etanol (grado HPLC), las soluciones se filtraron en acrodiscos de malla de poro de 0,45 µm y diámetro de 25 mm (Agilent Technologies) (Aguilar et al., 2016; Bae et al., 2010).

#### **5.1.2 Cuantificación de afinina en extractos de *H. longipes* por HPLC-DAD**

Para la cuantificación del contenido de afinina se utilizó un método estandarizado desarrollado en el laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Este análisis se realizó

utilizando un sistema HPLC Waters (Millipore Corp., División de Cromatografía de Aguas, Milford, MA, EE. UU.). Este equipo está compuesto por un sistema de suministro multidisolvente 600E y un detector PDA 2998. La columna utilizada fue ZORBAX ECLIPSE XDB-C8 (4,5 × 150 mm, tamaño de partícula de 5 µm, tamaño de poro de 120 Å). En el sistema isocrático se logró la composición de la fase móvil que fue del 50% del 1% ácido acético en agua grado HPLC y 50% acetoneitrilo de grado HPLC a una razón de flujo de 1 mL / min. El volumen de inyección fue de 20 µl, y el tiempo total de análisis fue de 8.5 min. El contenido de afinina se obtuvo usando una curva de calibración afinina pura (15–90 µg / mL). Se obtuvieron cinco puntos, cada uno corresponde a la media de tres réplicas. Las áreas bajo la curva (Y) obtenidas para cada punto se trazaron frente a las respectivas concentraciones utilizadas (X) y una correlación lineal establecida como  $Y = aX + b$  (Aguilar et al., 2016; Bae et al., 2010).

#### **5.10 Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.0 (Software GraphPad, San Diego, CA). El diseño experimental fue completamente al azar para evaluar el efecto de la aplicación foliar de ambos elicitores sobre los cambios en variables de crecimiento y desarrollo, las actividades enzimáticas SOD, CAT, PAL y VDC y el contenido de afinina. La disposición del experimento fue de siete tratamientos con una unidad experimental de 12 plantas por triplicado. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias se compararon utilizando las comparaciones múltiples de la prueba de Tukey (P = 0.05).

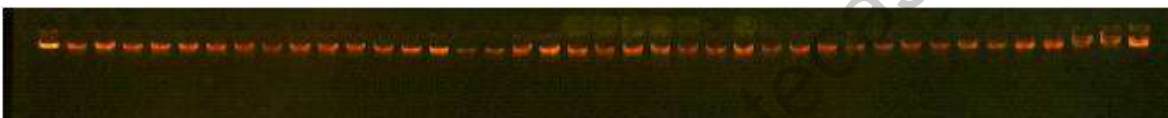
## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

### OBJETIVO 1

#### 6.1 Análisis de la diversidad genética de colectas de *Heliopsis longipes* realizadas en los estados de Guanajuato y Querétaro.

##### 6.1.1 Marcadores moleculares de ADN

En la Figura 6.1 se visualiza la calidad de ADN en ella se aprecia una banda de alto peso molecular sin señales de degradación para todas las colectas. Esto es indicativo de que el ADN genómico de las muestras de *H. longipes*, se encuentra integro.



**Figura 6.1.** ADN en gel de agarosa de las poblaciones de *H. longipes*, usando  $\lambda$  sin cortar como marcador de peso.

La cuantificación y pureza de cada ADN se muestra en el cuadro 6.1, en él se puede apreciar que se obtuvo gran cantidad de ADN y la pureza de las muestras va de 1.8 a 2.00.

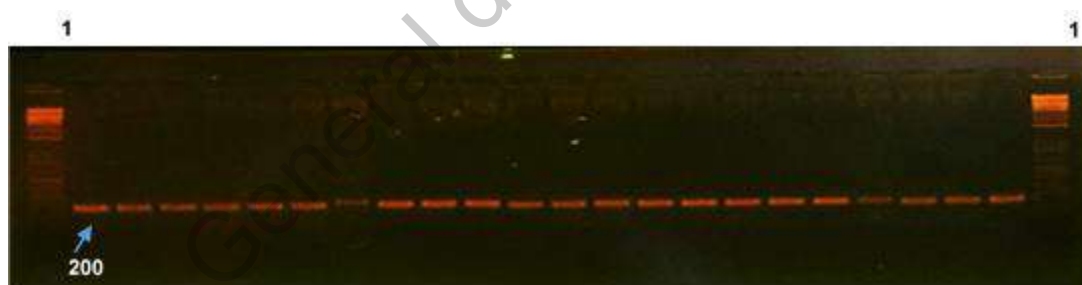
En la Figura 6.2 se observa el resultado de la amplificación del PCR con el cebador universal 26S en las muestras de chilcuague, en ella se aprecia que se obtuvo la banda esperada de 200pb, lo cual es indicativo de que el ADN no tiene ningún contaminante que impida realizar la PCR.



**Cuadro 6.1.** Valores de concentración y pureza de ADN (ng/μL) de las poblaciones de *H. longipes*.

Muestra	Concentración	Pureza 260/280	Muestra	Concentración	Pureza 260/280
3 RB	316.8	2.09	5 Concá	362.4	1.9
11 RB	952.3	2.06	6 Concá	346.2	1.8
13 RB	600.8	2.09	7 Concá	348.9	2.09
14 RB	326	2.1	9 Concá	590.7	1.98
15 RB	496.1	2	10 Concá	303.8	2.05
16 RB	442.1	2.05	1 SJB	128.8	1.95
17 RB	641.5	2.03	4 SJB	318.7	2.04
18 RB	662.5	1,97	9 SJB	147.4	2
19 RB	389	2,07	21 SJB	277.2	2.01
20 RB	189	2,09	22 SJB	328.2	2.04
1 Concá	737.9	2,13	23 SJB	371	1.98
2 Concá	99.34	2	24 SJB	159.8	1.98
3 Concá	633	2,14	25 SJB	236.3	2.03
4 Concá	360.2	2,08	27 SJB	182.2	2.09
			28 SJB	273.5	2.03

SJB - San Juan Buenaventura, RB- Rancho de Beltrán



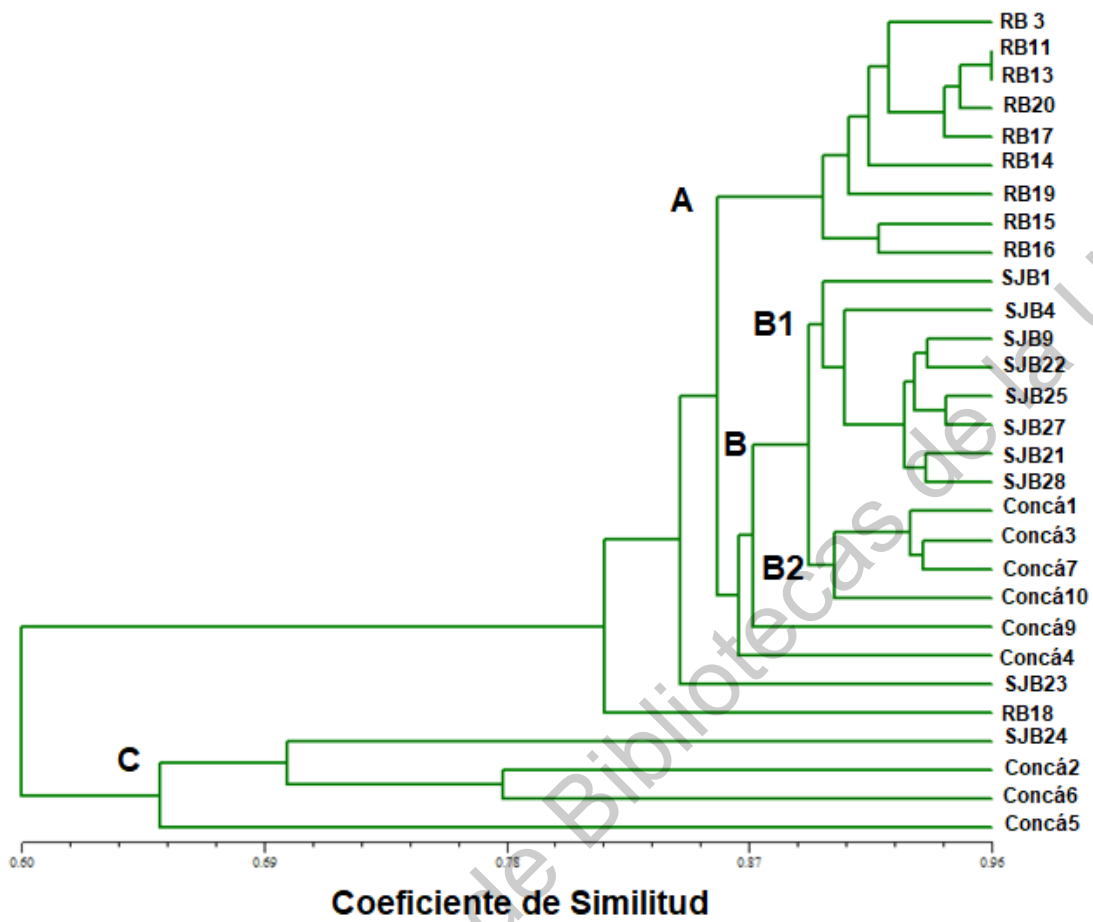
**Figura 6.2.** Visualización en gel de agarosa al 1.5 % de los fragmentos amplificados con el cebador 26S de las muestras de *H. longipes*, utilizando el marcador de peso 1 KB plus.

### 6.1.2 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs)

La media general de la similitud genética obtenida entre las 29 colectas de chilcuague fue de 0.84, con un rango que varió desde 0.60 a 0.96. La mayor similitud fue entre las colectas RB 11 y RB 13, y la menor fue entre la Concá 5 y SJB 1.

En las relaciones genéticas encontradas, se puede apreciar en el dendrograma (Figura 6.3), que a pesar de que el promedio general de similitud entre el total de las colectas fue alto, se formaron tres grupos (A, B y C), el grupo A formado por las colectas de RB excepto RB-18, el grupo B con una mezcla de catorce genotipos de Concá y SJB y el C también formado por cuatro colectas de Concá y Arroyo Seco. Se separa de estos grupos la colecta de SJB-23. Los genotipos del grupo A, mostraron un coeficiente promedio de similitud de 0.89.

Al analizar el grupo B del dendrograma generado, se puede observar que se forman dos subgrupos el B1 y B2, los cuales juntos con el grupo A, presentan una tendencia de separar los genotipos por su lugar de origen. En el subgrupo B1 se ubicaron colectas originarias de Arroyo Seco y en el subgrupo B2 materiales procedentes de Concá. La formación de estos tres grupos podría señalar la presencia de fuentes de diversidad diferentes en este germoplasma, este agrupamiento, que correspondió a un patrón geográfico, indica baja diseminación o flujo genético entre las zonas de RB en Guanajuato y la de SJB-Concá de Querétaro.

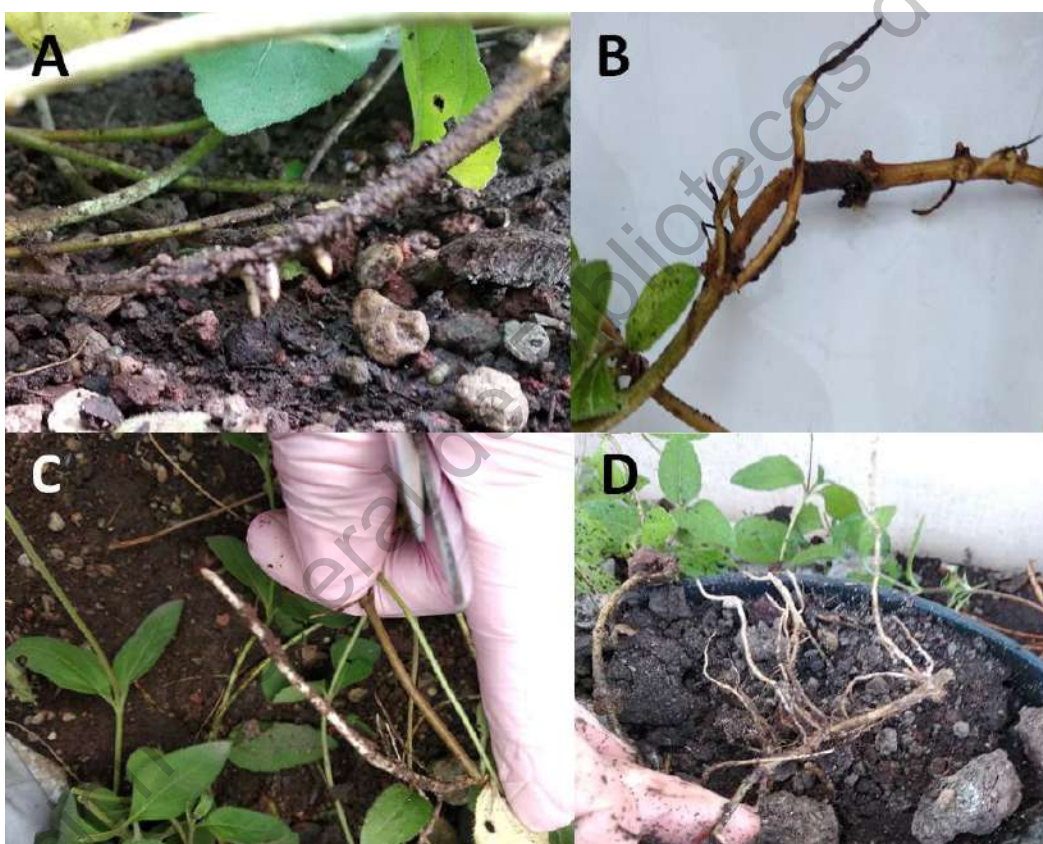


**Figura 6.3.** Dendrograma de las relaciones genéticas existentes entre 29 colectas de chilcuague (*Heliopsis longipes*), basado en el coeficiente DICE calculado con 24 combinaciones AFLP.

## OBJETIVO 2

### 6.2 Producción acodos para la propagación asexual de plantas de *Heliopsis longipes*.

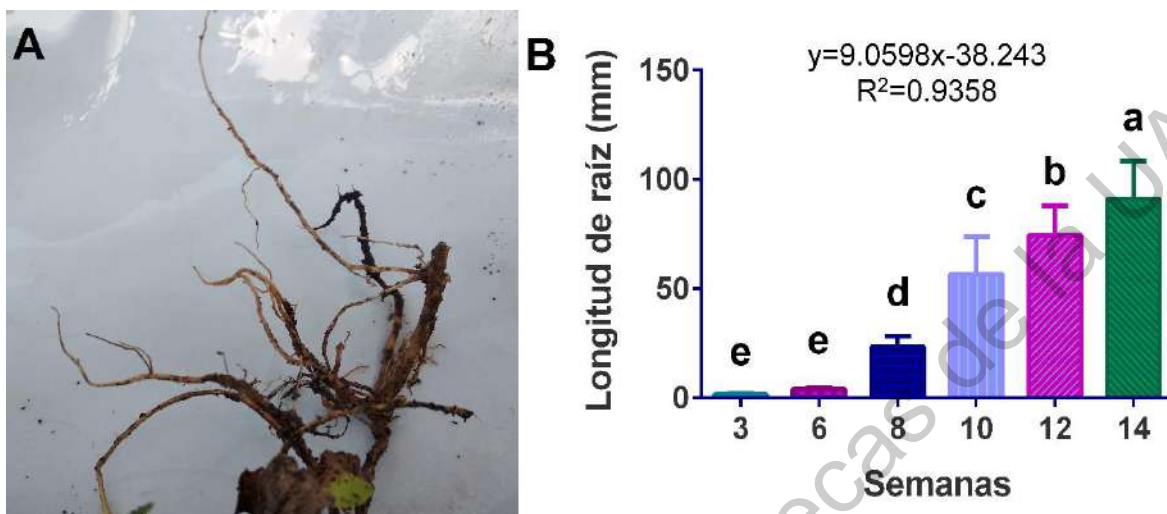
La generación del sistema radicular tarda en promedio 15 semanas en establecerse y dar a la formación de un nuevo ejemplar idéntico, por lo cual se requiere cuidar la humedad del sustrato, la temperatura del aire de las macetas y la solución nutritiva. Asimismo, se sugiere mantener los tallos en un lugar sombreado, con una malla sombra del 30% para cubrir las macetas (Figura 6.4).



**Figura 6.4.** Acodos de *H. longipes*: A) Tallo con tres semanas enterrado. B) Acodo con seis semanas. C) Acodo con ocho semanas. D) Acodo con diez semanas.

El enraizador se aplicó a los siete y quince días posteriores. El riego se hizo cada tercer día vigilando la humedad del sustrato. Durante 14 semanas se registró la longitud de las raíces con un vernier digital. Después de diez semanas, los codos se visualizan como en la Figura 6.4A. Mientras que la formación y crecimiento de

las raíces de los acodos se comportaron como se muestra en la Figura 6.4B. Las plántulas de *H. longipes* de catorce semanas se visualizan como en la Figura 6.5.



**Figura 6.5.** A) Raíces de acodo de *H. longipes* con seis semanas. B) Comportamiento del crecimiento de la longitud de las raíces de los acodos de *H. longipes* durante 14 semanas.

Los acodos se separaron de la planta madre con tijeras de poda previamente desinfectadas y se establecieron en macetas de 10 L con el mismo sustrato (Figura 6.6).



**Figura 6.6.** A) Plántula de *H. longipes* de siete semanas. B) Acodos desarrollados trasplantados.

### OBJETIVO 3

6.3 Efecto de la elicitación controlada mediante peróxido de hidrogeno y ácido salicílico en el crecimiento y desarrollo de plantas de *Heliopsis longipes* colectadas en diferentes regiones del centro de México en invernadero.

Las poblaciones de *H. longipes* colectadas se trasplantaron y colocaron en el invernadero por 190 días, el aspecto visual se muestra en la Figura 6.7.



**Figura 6.7.** Aspecto morfológico típico de *H. longipes* en el día 190 después del trasplante. A) población de Conca, B) población de Rancho Beltrán (RB).

Las medidas de las plantas de *H. longipes* bajo condiciones de invernadero sin la aplicación de elicitores se muestran en el Cuadro 6.2.

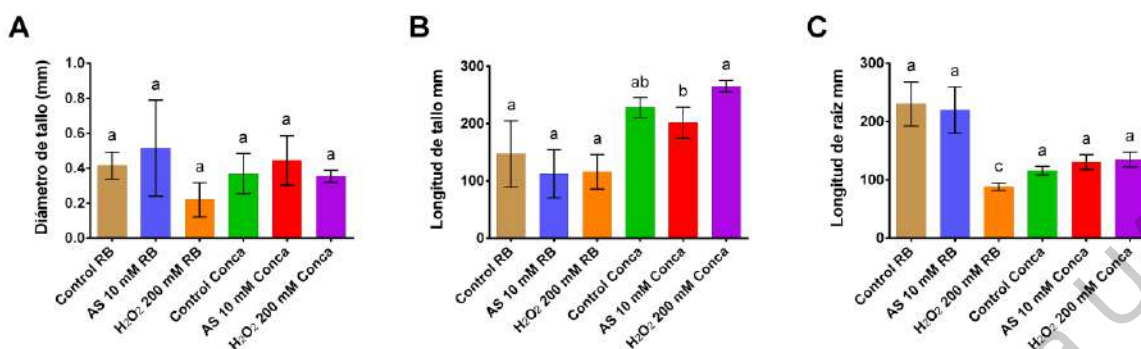
**Cuadro 6.2.** Variables morfológicas de *H. longipes* bajo condiciones de invernadero.

<b>Población</b>	<b>Diámetro de tallo (mm)</b>	<b>Altura de planta (mm)</b>	<b>Longitud de raíz (mm)</b>
RB	2.35 ± 0.35 <sup>b</sup>	104.62 ± 27.07 <sup>b</sup>	191.50 ± 31.67 <sup>b</sup>
Concá	3.99 ± 0.22 <sup>a</sup>	570.00 ± 43.77 <sup>a</sup>	290.00 ± 18.25 <sup>a</sup>

RB- Rancho de Beltrán

La población de Concá registró diferencia significativa en diámetro de tallo. En la altura de planta, la población de Concá tuvo diferencia significativa respecto a la población de RB, este resultado pudo deberse a las condiciones climáticas en el invernadero. La longitud de raíz fue significativamente diferente en la población de Concá. En este experimento se observaron poblaciones de patógenos como la cochinilla blanca y los grillos en etapas adultas sobre el área foliar, al igual que el tamaño de las hojas se desarrollaron con mayor tamaño que el resto de las poblaciones.

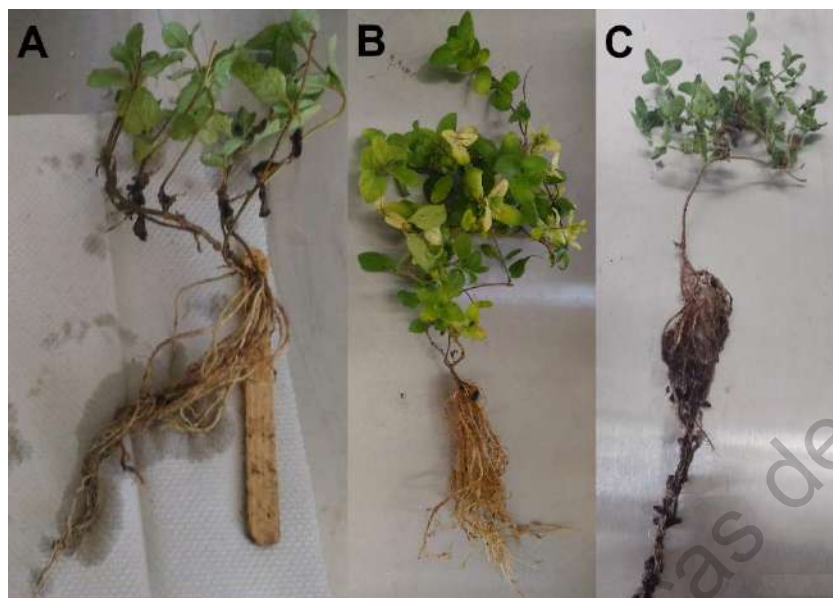
Bajo condiciones de elicitación controlada las variables morfológicas de diámetro y longitud de tallo y longitud de raíz se graficaron, como se muestra en la Figura 6.8. El comparativo entre las poblaciones y elicitores para la variable de diámetro de tallo, no tuvo diferencia significativa (Figura 6.8A). Por el contrario, el mejor tratamiento en la altura del tallo fue H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM (1.57 veces más) con respecto al control en la población de Conca y respecto a la población de RB (Figura 6.8B). Para el caso de la variable de longitud de raíz, se observó un aumento significativo, así como en la biomasa de la planta (similar a la actividad bioestimulante) con el tratamiento de 10 mM AS (1.46 veces más respecto del control) y en comparación a la población de Conca. Hasta donde se sabe, estos datos son los primeros obtenidos sobre los efectos de las estrategias de elicitación controlada sobre la morfología de *H. longipes* en condiciones de invernadero.



**Figura 6.8.** A) Diámetro de tallo (mm), B) Longitud de tallo (mm) y C) Longitud de la raíz (mm) de las poblaciones Conca y RB (Rancho Beltrán) después de la elicitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM y AS 10 mM. Las letras indican las diferencias entre medias usando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (P=0.05).

En estudios similares, con AS como elicitador en otras especies de plantas, Gorni *et al.* (2016) encontraron un aumento significativo en la acumulación de la biomasa en plantas de *Achillea millefolium* L. a AS 0.5 mM (Gorni and Pacheco, 2016). Adicionalmente, las aplicaciones exógenas de AS (0.25, 0.5 y 1 mM) resultaron en la acumulación de la biomasa en plantas de caléndula (*Calendula officinalis* L.) (Pacheco et al., 2013). Del mismo modo, se sugirió que las aplicaciones exógenas de AS influyeron en el crecimiento de la planta sobre la fotosíntesis, alterando las relaciones hídricas, la regulación del estoma y la absorción de nutrientes (War et al., 2011). Es probable que AS esté induciendo cambios en el equilibrio de las fitohormonas (giberelinas, auxinas, entre otras) dentro de las plantas de *H. longipes* que permiten el fenotipo bioestimulante observado, de manera similar a lo sugerido en informes recientes (Vázquez-Hernández et al., 2019). El efecto de los elicitores en el crecimiento de las plantas de RB se muestra en la Figura 6.9





**Figura 6.9.** Plantas de *H. longipes*: A) tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM, B) AS 10 mM y C) agua destilada.

Además, Sun *et al.* (2016) encontraron que la promoción del crecimiento en plántulas de pepino con el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.5 mM, podría atribuirse a una mayor asimilación de carbono bajo la pulverización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que incluso pequeños aumentos en la tasa de fotosíntesis neta de la hoja aumentan la biomasa. Al igual que, Gorni *et al.* (2016) mostraron un aumento significativo en las plantas de *Achillea millefolium* L. en la acumulación de biomasa con la aplicación de AS 0.50 mM. En las plantas de caléndula (*Calendula officinalis* L.) se aplicó exógenamente AS a concentraciones de 0.25, 0.50 y 1.00 mM, lo que resultó en la acumulación de biomasa (Pacheco *et al.*, 2013).

Para el caso de longitud de plántula, diversos estudios describen diferencia significativa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tal es el estudio hecho por Santos *et al.* (2018), donde fueron aplicadas pulverizaciones foliares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en maracuyá amarillo, obteniendo 4.2 mm de ancho de planta y 600 mm de altura de planta con la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15  $\mu$ M y 0.3 CEw (dS m<sup>-1</sup>) (Santos *et al.*, 2018). Adicionalmente, Hasan *et al.* (2016) encontraron incremento en la longitud de brote y raíz en *Vigna unguiculata* L. con aplicaciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM en comparación con el control, esta concentración podría inducir la acción ABA en sus plantas. Vázquez-Hernández *et al.* (2019)

encontró en *S. rebaudiana* var. Morita II que la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM fue el mejor tratamiento en el ancho ( $2.31 \pm 0.02$  mm) y la altura del tallo ( $183.44 \pm 10.68$  mm). Las plantas de menta se rociaron con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el crecimiento de los brotes se obtuvo con el tratamiento AS 2 mM; sin embargo, no hubo diferencias significativas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el crecimiento de hojas y brotes (Figueroa Pérez et al., 2014).

El tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM tuvo un efecto eustresor en la variable de longitud de tallo; mientras que, AS tuvo un efecto bioestimulante en la generación de biomasa foliar y eustresor en longitud de la raíz.

Del mismo modo, Zhou et al. (2018) observaron inhibición en la longitud de la raíz primaria de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con el aumento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-5 mM); incluyendo la modificación del gravitropismo de la raíz primaria. Este comportamiento también se observó en los guisantes de pasto y las plántulas de guisante en la etapa de desarrollo inicial con la aplicación exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhou et al., 2018). Opuestamente, en este estudio comparativo, la longitud de la raíz aumentó en ambos grupos con respecto al control. El crecimiento inmoderado puede afectar el desarrollo de las hojas y la raíz, en detrimento de su supervivencia, reduciendo la biomasa y aumentando la susceptibilidad de estas (Hayes et al., 2017). Hasan et al. (2016) obtuvieron un crecimiento adventicio de raíces en *Vigna unguiculata* L. con la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM. Después de mantener estas plantas en condiciones de cultivo en invernadero por un año, las raíces alcanzaron tamaños como el mostrado en la Figura 6.10.

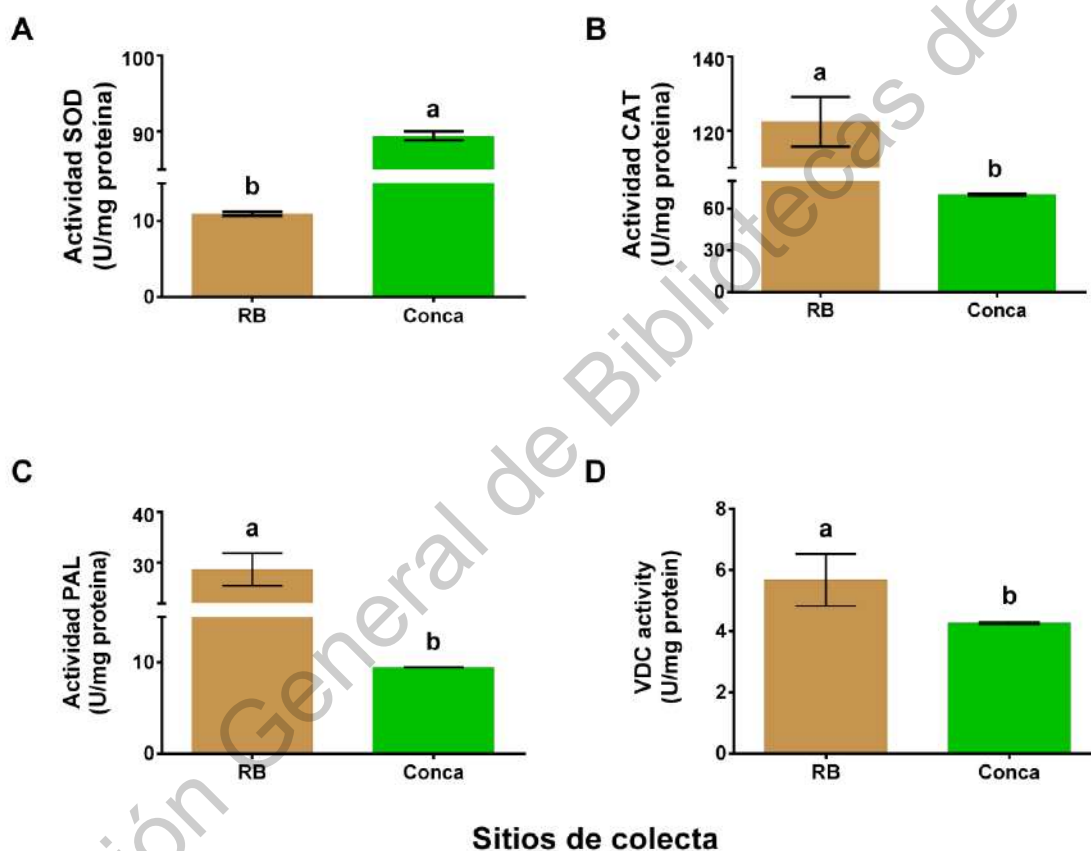


**Figura 6.10.** Raíz de *H. longipes* bajo condiciones de cultivo en invernadero de un año.

## OBJETIVO 4

### 6.4 Actividades enzimáticas de respuesta a estrés oxidativo y de producción de alcanidas alifáticas en las plantas de *Heliopsis longipes* sometidas a elicitación controlada bajo condiciones de invernadero.

Las actividades enzimáticas relacionadas al estrés evaluadas en las plantas colectadas de las poblaciones Rancho Beltrán (RB) y Conca de *H. longipes* se muestran en la Figura 6.11 (plantas silvestres).



**Figura 6.11.** Actividades enzimáticas específicas en las poblaciones de *H. longipes* antes de la producción de acodos: A) Superóxido dismutasa (SOD), B) Catalasa (CAT), C) Fenilalanina amonio-liasas (PAL) y D) Valina descarboxilasa (VDC). RB: Rancho Beltrán. Diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo a ANOVA y a la prueba de media Tukey ( $P=0.05$ ).

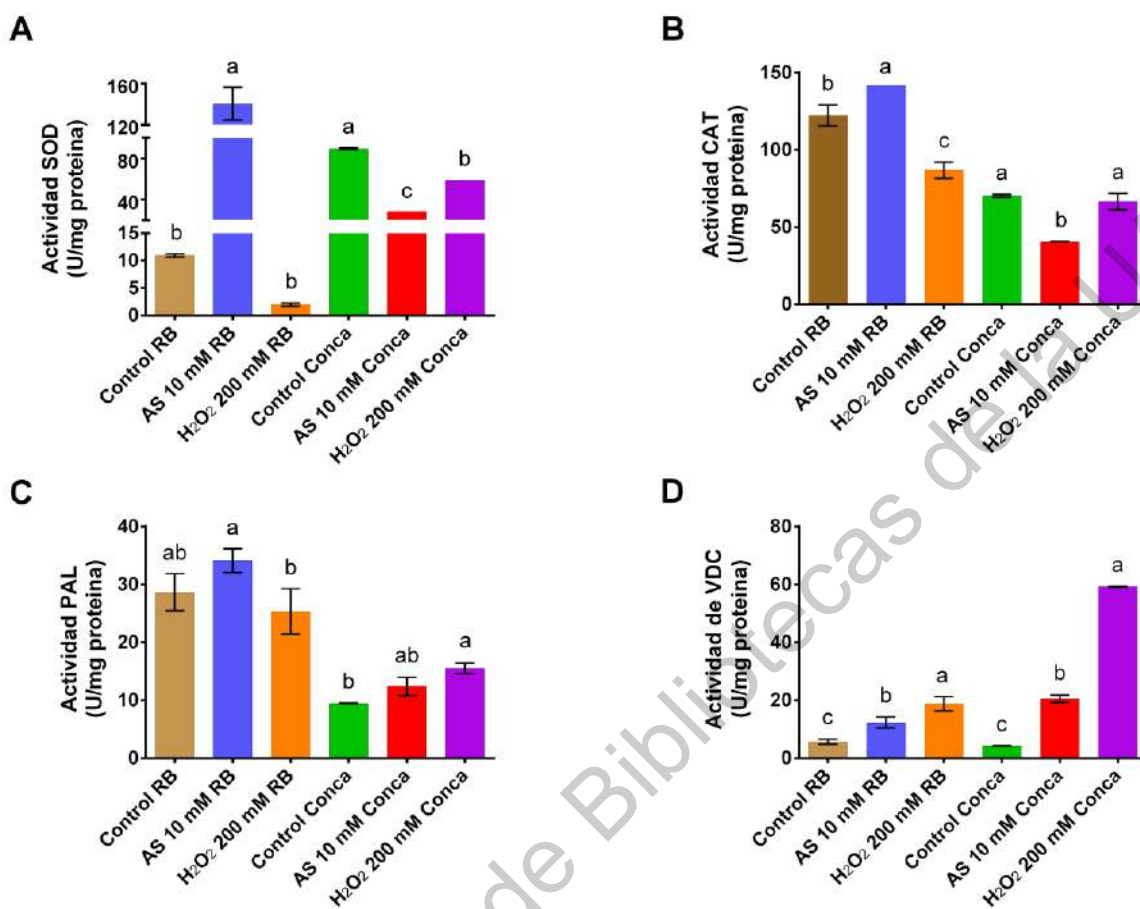
Las plantas colectadas de la población de Conca muestran mayor actividad enzimática de SOD, mientras que Rancho Beltrán (RB) muestra diferencia

significativa en la actividad de CAT. La actividad de PAL es relevante solo en la población de RB. La actividad de VDC es significativa en la población RB en comparación de Conca. Las actividades cuantificadas son indicadores de las enzimas sintetizadas por la planta bajo condiciones silvestres.

Los elicitores como AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podrían aumentar las enzimas antioxidantes involucradas en la defensa de las plantas contra el estrés (POD, CAT, SOD, PAL) (Shanker, A. K., Venkateswarlu, 2012; War et al., 2011). Asimismo, se sabe que AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> minimizan el daño por estrés abiótico y biótico reforzando las actividades enzimáticas de defensa de antioxidantes (SOD, CAT, POD) y también las enzimas relacionadas con la ruta de los fenoles (PAL) (Vijayalakshmi et al., 2016). La medición enzimática de las poblaciones de *H. longipes* después de la producción de acodos y elicitación controlada con AS 10 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM, se muestra en la Figura 6.12.

En general, los resultados mostraron que tanto los tratamientos AS 10 mM como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM aumentaron las actividades enzimáticas de SOD, PAL, CAT y VDC en comparación con los controles. Este resultado fue consistente con el obtenido por Parola-Contreras et al. (2020), lograron incrementos en las actividades enzimáticas de SOD, CAT, PAL y VDC con los tratamientos AS 10 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM en plantas de 164 días de *H. longipes*. Se observó una alta actividad significativa de SOD en las plantas de RB tratadas con SA 10 mM (30.37 veces más) en la primera, pero no cuando se aplica H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM (Figura 6.12A).

Los antioxidantes y prooxidantes están en equilibrio durante el crecimiento de las plantas; cualquier desproporción puede desencadenar el estrés oxidativo que conduce a la destrucción a niveles celulares (Czégény et al., 2016). La SOD es la enzima más importante contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), su función es convertir el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Hernández-Barrera et al., 2015).



**Figura 6.12.** Actividades enzimáticas específicas en las poblaciones RB y Conca de *H. longipes* con acodos y aclimatas por seis meses. A) Superóxido dismutasa (SOD), B) Catalasa (CAT), C) Fenilalanina amonio-liasa (PAL) y D) Valina descarboxilasa (VDC). RB: Rancho Beltrán. Diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo a ANOVA y a la prueba de media Tukey (P=0.05).

La aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM en tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia* línea MAQ2.4) tuvieron una reducción de 67% en la actividad de SOD después de 4 h (Hernández-Barrera et al., 2015), también se observó la inducción de movilizaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>CYT</sub>, que podría inhibir la actividad de SOD (Price et al., 1994). El comportamiento de la actividad SOD puede deberse a que la planta bloqueó la enzima al detectar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno en ambas aplicaciones por la inducción de las movilizaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>CYT</sub> como sugiere Price et al. (1994). Basado en este análisis y los estudios en arroz (*Oryza sativa* L. cv. Yuexiangnian), maíz (*Zea mays*

L. cv. Yuedan 1) y frijol (*Vigna radiate* (Linn.) Wilczek Sulv 1) sobre la inhibición de la actividad SOD por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las concentraciones de 1-15 mM, la variación de este fenómeno dependió de los órganos, la edad de la planta, las especies y probablemente la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada en los experimentos (Cheng and Song, 2006).

El comportamiento de la actividad de CAT se muestra en la Figura 6.12B. La actividad de CAT aumentó significativamente con AS 10 mM y disminuyó significativamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM y en la población de Concá. El comportamiento de la enzima CAT podría deberse al AS exógeno, que inhibe y elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas. Además, esta supresión aumenta las respuestas adaptativas y la resistencia sistémica adquirida (SAR), como un aumento de la actividad PAL (Figuroa Pérez et al., 2014). Mientras que las actividades SOD y CAT podrían mejorarse por la contribución del óxido nítrico disminuyendo la intensificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las hojas. La actividad de CAT podría ser inactivada por AS, seguida por la señalización de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fatma et al., 2016).

Koc et al. (2015) no encontraron actividad enzimática CAT en ninguno de los extractos evaluados de *O. acanthium*, *C. acanthoides*, *C. Arvense* y *C. solstitialis* silvestres pertenecientes a la familia Asteraceae (Koc et al., 2015). Estas diferencias pueden deberse a que las plantas eran silvestres y no recibieron estrés adicional, lo que es motivo por el cual la enzima CAT no presentó actividad (Caprioli et al., 2017). CAT transforma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>, también se ha estudiado CAT como la enzima esencial utilizada para la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dentro de las células. La enzima CAT disminuye el estrés oxidativo, su actividad depende del tiempo del período o de la dosis de exposición al estrés, así como de la edad de la planta (Biczak et al., 2017). Contrariamente, Mejía-Teniente et al. (2013) encontraron que la actividad de CAT aumentó con la elicitación, su actividad fue directamente proporcional a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por aplicación en plantas de chile *Capsicum annum*. Además, ese estudio también mostró que las plantas mostraron una alta actividad de la enzima CAT 4 h después de la aplicación de AS 0.1 mM y 8 h después de la aplicación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 mM. En una segunda aplicación hecha 1 día después, la

actividad de CAT fue significativamente mayor con las concentraciones de AS 6.7- y 10 mM, y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 14 mM en *C. annum* L. var. Don Benito.

Estos resultados concuerdan con algunas de las respuestas obtenidas en el análisis de las plantas de RB de *H. longipes*, lo que sugirió que esta respuesta depende del tipo/dosis de elicitor. En algunos casos, cuando las plantas tuvieron baja actividad de la enzima de CAT y la protección contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estaba comprometida, las plantas activaron otra enzima que también descompone el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de ácido ascórbico y compuestos fenólicos como la actividad de la enzima peroxidasa (POD) para superar la situación (Biczak et al., 2017).

PAL es una enzima crucial del metabolismo fenilpropanoide, la regulación positiva de esta actividad se correlacionó con el aumento de fenilpropanoides utilizados como uno de los principales arsenales bioquímicos de defensa de las plantas contra el estrés ambiental (Mejía-Teniente et al., 2013). El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM y AS 10 mM sobre las poblaciones de *H. longipes* se muestra en la Figura 6.12C. En donde se observó un aumento significativo en la actividad de la enzima PAL con la aplicación de AS 10 mM. Mejía-Teniente et al. (2013) encontraron un incremento significativo después de la aplicación de los elicitores AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y quitosano (QN) y cinco días después encontraron el mayor incremento de la actividad PAL. Tomando en conjunto estos resultados con respecto a las actividades enzimáticas evaluadas relacionadas con las respuestas al estrés de la planta de *H. longipes*, sugirieron que la respuesta dependerá del elicitor usado, así como de la dosis, temporalidad y edad de la planta en las condiciones cultivadas.

La actividad enzimática PAL cataliza reacciones para conformar compuestos protectores. Parola-Contreras et al. (2020) tuvieron aumentos significativos de la actividad PAL a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM y AS 10 mM en la misma especie. Mejía-Teniente et al. (2013) encontraron en *Capsicum annum* L. un incremento en la actividad PAL con AS 0.1 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 14 mM. Toscano et. al. (2018) determinaron en el *asparagus officianalis* L. la disminución de la actividad de PAL con tratamientos de sulfato de amonio; ellos concluyeron que el sulfato de amonio podía inhibir la enzima PAL. Ésta es una enzima clave de las vías de los compuestos fenólicos que produce



antocianinas, flavonoides y lignina. Se descubrió que la baja temperatura y la luz estimulan la actividad PAL (Toscano et al., 2018).

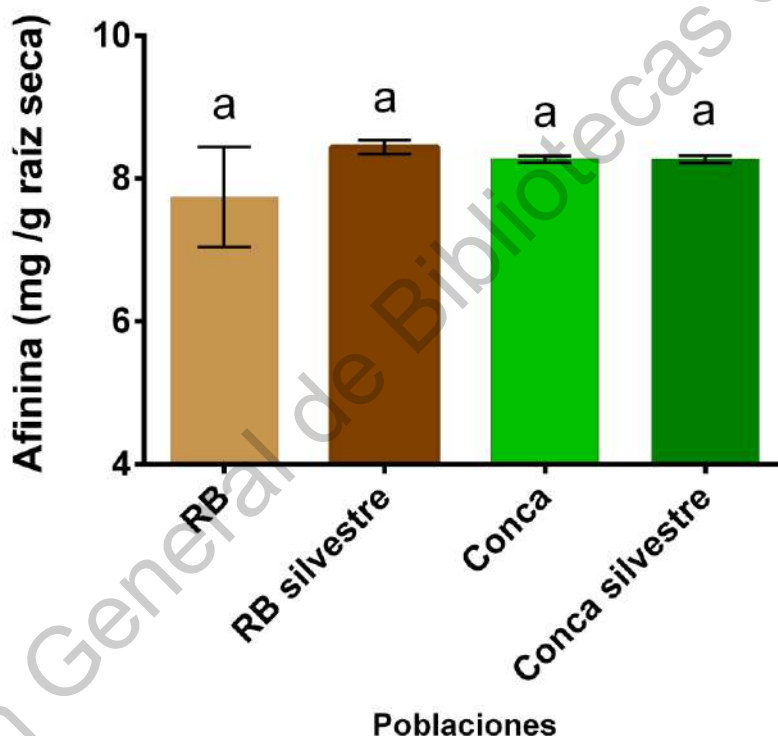
La actividad de la enzima VDC en las poblaciones de *H. longipes* después de la elicitación se muestra en la Figura 6.12D. La aplicación de la elicitación controlada aumentó en todos los tratamientos evaluados la actividad de VDC en comparación con el control. En ambas poblaciones la aplicación de los dos elicitores ( $H_2O_2$  200 mM y AS 10 mM) indujo la actividad de VDC significativamente en comparación con el control. La razón para evaluar los efectos de la elicitación controlada en la enzima VDC en las raíces de *H. longipes* se basó en el hecho de que, se ha sugerido que la actividad de esta enzima podría ser un precursor clave en la canalización de la vía de síntesis de las alcanidas alifáticas como la afinina (Cortez-Espinosa et al., 2011; Rizhsky et al., 2016). Estos resultados en el comportamiento de la enzima VDC fueron obtenidos por Parola-Contreras et al. (2020) en la misma especie con los mismos tratamientos en las plantas de *H. longipes*. Se destaca que la enzima VDC con el tratamiento  $H_2O_2$  200 mM en plantas de la población Conca obtuvo una actividad 3.14 veces más que las plantas de la población RB con el mismo tratamiento.

Se sabe que el resto amina de las alcanidas sintetizadas en *A. radicans* incorpora L-[ $^2H^8$ ] valina, por esta razón se estudió la actividad de la enzima valina descarboxilasa (VDC) (Cortez-Espinosa et al., 2011). Igualmente, Rizhsky et al., (2016) corroboraron que el aminoácido valina en presencia de la enzima valina descarboxilasa y el fosfato piridoxal como cofactor reaccionan entre sí para dar paso a la isobutilamina en plantas de *Echinacea purpurea*. Concluyendo, la enzima VDC es parte de la biosíntesis de los metabolitos especializados como las alcanidas alifáticas. Por lo tanto, si un factor de estrés (elicitor/eustressor) aumenta la actividad de VDC, sería probable que también se detecte un aumento en el contenido de afinina en las raíces de las plantas de *H. longipes*. Esto último, puede aplicarse como un control de calidad o prueba rápida para una estimación del contenido de afinina en las raíces de esta planta.

## OBJETIVO 5

### 6.5 Determinar el contenido de afinina en las colectas de *Heliopsis longipes* sometidas a elicitación controlada.

El patrón de acumulación de las alcaloides depende del crecimiento y desarrollo de las plantas (Minto and Blacklock, 2008). La afinina es el metabolito de interés económico con mayor proporción en las raíces de esta planta medicinal. En la Figura 6.13 se muestra el contenido de afinina en las raíces de estas poblaciones silvestres y en condiciones de invernadero después del crecimiento de acodos.



**Figura 6.13.** Cuantificación de afinina en las poblaciones de *H. longipes* en condiciones silvestres y bajo condiciones de invernadero después de seis meses. RB: Rancho Beltrán. Diferentes letras indican diferencia significativa de acuerdo a ANOVA y a la prueba de media Tukey ( $P=0.05$ ).

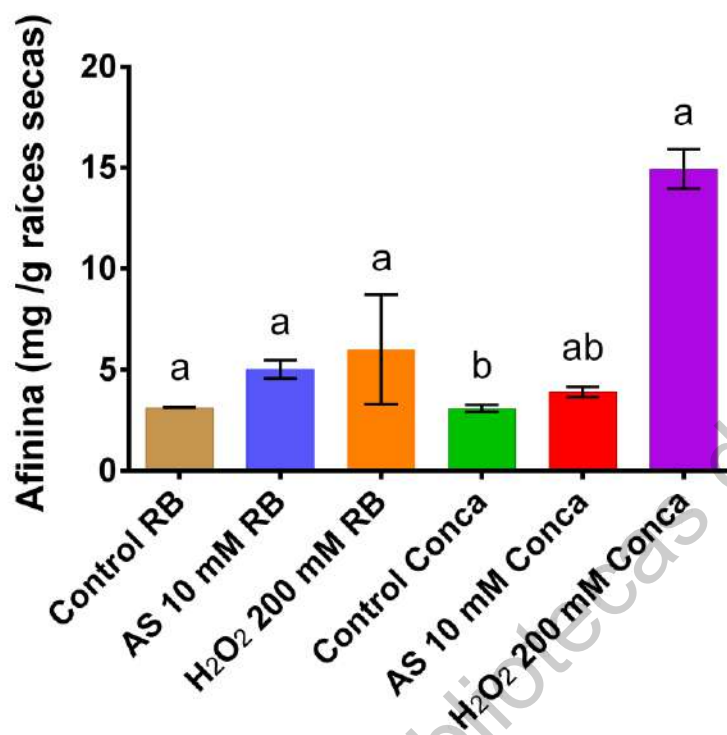
Las poblaciones de RB y Conca no tuvieron diferencia significativa en el contenido de afinina en las raíces de *H. longipes* bajo condiciones de invernadero. Este resultado, puede deberse al tiempo dentro del invernadero y las condiciones del manejo de las plantas. Además, entre el cultivo en invernadero y las plantas en

su hábitat no difieren en contenido de afinina, con el manejo de las plantas en invernadero se mantuvo la síntesis de este compuesto de interés. Adicionalmente, el tamaño comercial de las raíces silvestres tarda hasta tres años en desarrollarse (García-Chávez et al., 2004); mientras que bajo las condiciones descritas en la metodología (sección 5.5) se lograron obtener en un año longitudes de raíces mayores a las comerciales (Figura 6.10).

### **6.5.2 Contenido de afinina en las raíces de las poblaciones de plantas de *Heliopsis longipes* sometidas a elicitación controlada**

La afinina es el metabolito principal en las raíces de *Heliopsis longipes*. Se observó que las concentraciones de afinina aumentaron significativamente con los tratamientos de AS 10 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM en comparación con las raíces de las plantas control para la población de Conca (Figura 6.14).

El tratamiento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM tuvo un contenido de afinina de 4.68 veces mayor en comparación con el control de la misma población y 2.41 veces mayor en comparación con el mismo tratamiento en las plantas de la población RB. Estos resultados concuerdan completamente con la hipótesis del aumento de la actividad de la enzima VDC que también incrementa la concentración de afinina como lo sugiere Cortez-Espinoza et al. (2011) con respecto a que VDC es una enzima clave que canaliza la biosíntesis de las alcanidas alifáticas como afinina probada *in vitro* en plantas de *A. radicans* (Cortez-Espinoza et al., 2011).



**Figura 6.14.** Contenido de afinina en raíces de *Heliosis longipes* elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM y AS 10 mM y producidas por acodos. Letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA y la prueba de Tukey (P = 0.05).

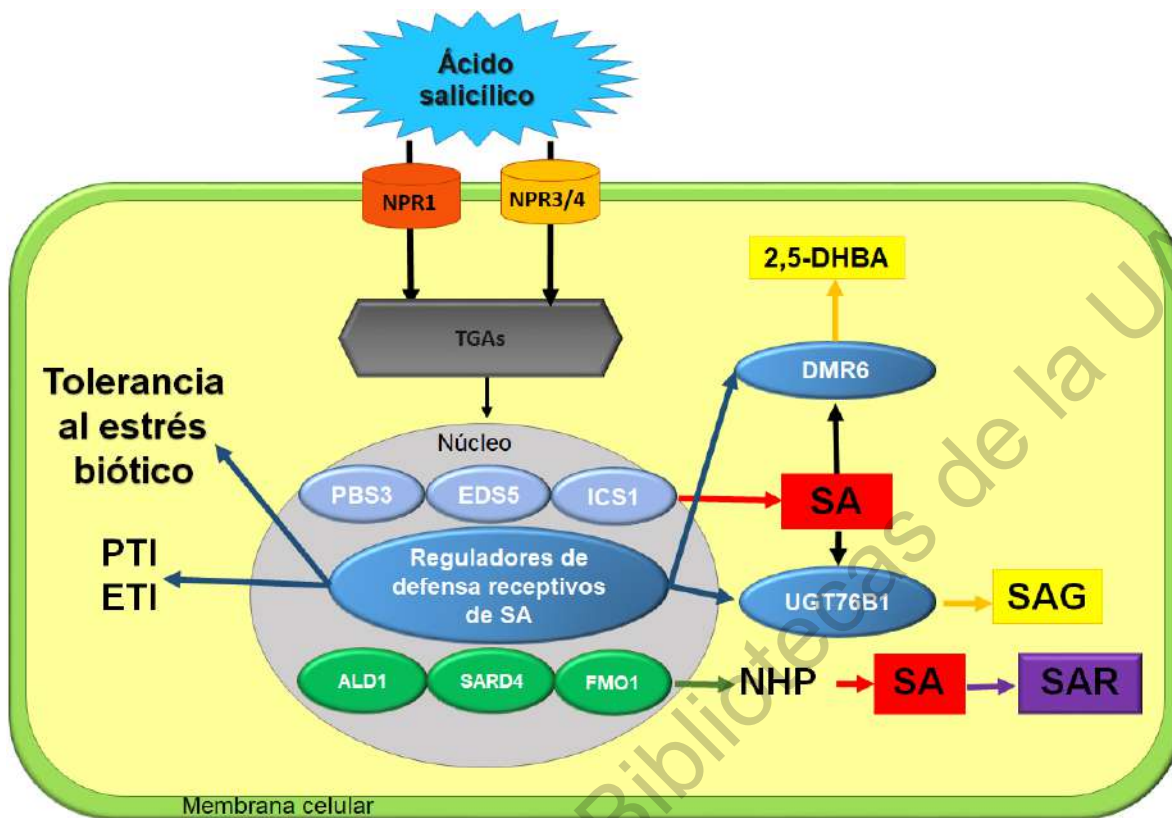
Asimismo, la evidencia apoya este modelo para generar aminas, que también han sido estudiadas las alcaloides de *Echinacea purpurea* por Rizhsky et al. (2016). En esta planta la alcaloide i<sup>4</sup>N-12: 4 $\Delta$ <sup>2E, 4E, 8Z, 10E</sup> es abundante en los floretes de los discos y las raíces, lo que representa un rango de abundancia de 300 veces con respecto a las hojas y también tienen la mayor expresión de BCAA descarboxilasa. Asimismo, los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) son precursores del resto amina de las alcaloides de *E. purpurea* como Val e Ile. De igual manera, el crecimiento de las plántulas y la acumulación de las alcaloides se restauró a niveles cercanos al tipo salvaje suplementando el medio de cultivo con 15 mM de Val y 15 mM de Ile (Rizhsky et al., 2016).

Las plantas de la familia Asteracea en su mayoría segregan ME derivados de la ruta del acetato mevalonato del cual se sintetizan los terpenos, como son sesquiterpenos y lactonas. Sin embargo, la mayoría de las plantas pertenecientes

al género *Heliopsis* segregan alcalmidas (Rizhsky et al., 2016). En el caso específico de *H. longipes*, la alcalmida en mayor proporción es la afinina derivada de las alcalmidas alifáticas (Cilia-López et al., 2014). Por lo que se propone como parte de la ruta de la biosíntesis de afinina la Figura 2.13.

Con la aplicación del elicitor, la inmunidad de la planta respondió aumentando el metabolismo secundario con respecto al control. En este estudio el incremento de la longitud de la raíz no está directamente relacionado con el contenido de afinina en las mismas. La elicitación controlada con la dosis 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no afectó la morfología de las plantas con respecto al control, pero el elicitor AS 10 mM incrementó la biomasa foliar de las plantas. Entonces, las plantas perciben el estrés modificando la forma de las proteínas sintetizadas para adaptarse o aminorar el impacto sufrido. Estas señales químicas cambian respecto del factor de estrés recibido, por lo que el estrés puede ocasionar bienestar o enfermedad (Timperio et al., 2008). Un receptor recibe la señal del factor de estrés, el efector permite la entrada de la señalización al interior de la célula, tanto el receptor como el efector se encuentran en la pared celular; las señales son mandadas por otras enzimas en una cascada de señales al núcleo, el cual al llegar a la proteína reguladora en el cromosoma permite que se mueva, lee, activa y copia la sección del ADN para generar las proteínas necesarias. Cuando la señal se retira, la proteína reguladora vuelve a cubrir el ADN (García-Mier et al., 2015).

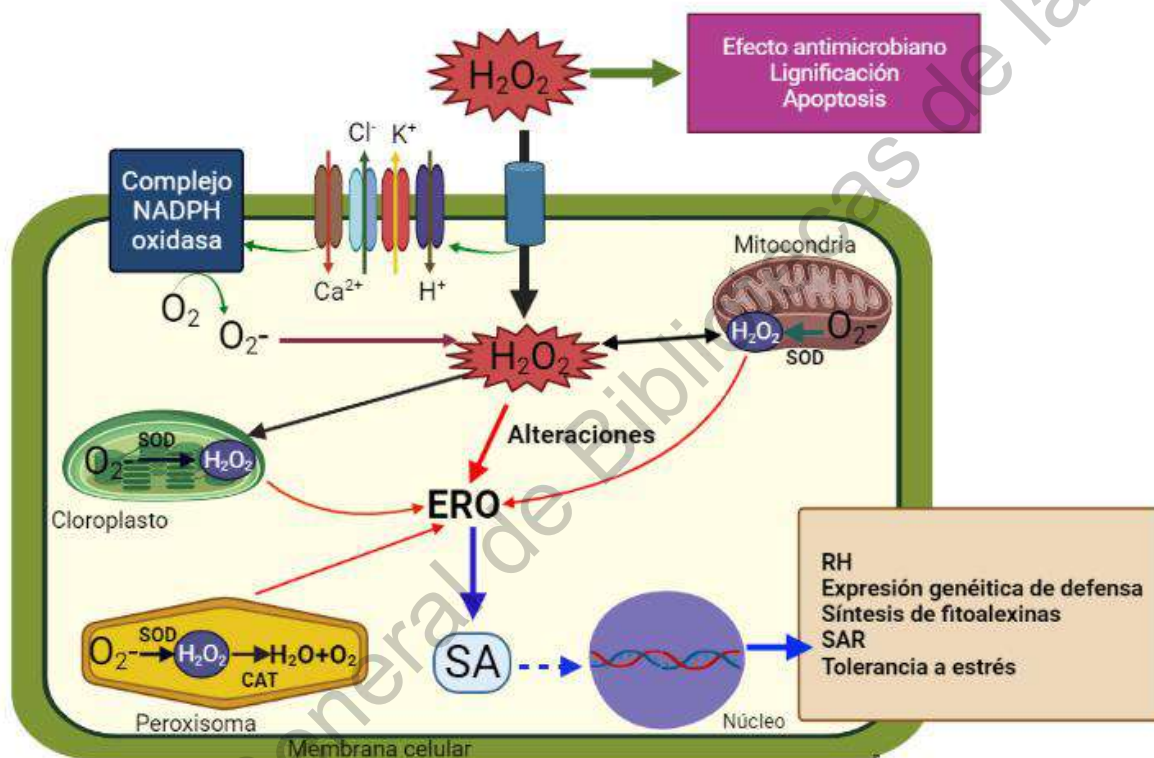
AS al ser aplicado exógenamente tiene efecto sobre el SAR, dispara la resistencia a patógenos, activación de proteínas relacionadas a patogénesis, también ayuda en la regulación de la absorción de los elementos como Ca, Cu, Fe, Mn, P y Zn; adicionalmente, mostró en este estudio disparar el crecimiento de las plantas (Liu et al., 2016). Igualmente, AS tiene un papel importante en la actividad antioxidante y sobre el ERO celular, por lo que las aplicaciones de AS exógeno tienen a incrementar el metabolismo secundario activando la biosíntesis de este tipo de metabolitos (Liu et al., 2020). El mecanismo por el cual las aplicaciones de AS activan la respuesta a estrés se muestra en la Figura 6.15.



**Figura 6.15.** SA es reconocido por dos clases de receptores: NPR1 y NPR3/NPR4. La unión de SA suprime la actividad de represión transcripcional de NPR3/NPR4 y mejora la activación transcripcional de NPR1, lo que desencadena la regulación positiva de los reguladores de defensa que responden a SA. La inducción de genes biosintéticos de SA (ICS1, EDS5 y PBS3) promueve la producción de SA, mientras que la inducción de UGT76B1 y DMR6 estimula la conversión de SA en 2,5-DHBA y SAG, respectivamente. En los tejidos locales, la expresión de reguladores de defensa que responden a SA promueve tanto PTI como ETI y estimula la producción de la señal móvil de SAR, activando la expresión de genes biosintéticos de NHP (ALD1, SARD4 y FMO1). En los tejidos distales, el NHP promueve la biosíntesis de SA y la resistencia inducida por SA (M. I. R. Khan et al., 2015; Liu et al., 2016, 2020).

Las aplicaciones exógenas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disparan el sistema inmune, como se muestra en la Figura 6.16. Debido al ERO generado en los cloroplastos, las funciones fotosintéticas se ven afectadas en las células protectoras que inducen un cierre de estomas. En las mitocondrias, la generación de ERO se produce en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, y la O<sub>2</sub> se controla a

través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la homeostasis mitocondrial se altera generando ERO. Los peroxisomas son el sitio de acumulación de  $O_2$  y  $H_2O_2$  que es desintoxicado por la acción de enzimas como catalasa (CAT), peroxidasas y SOD. Las mitocondrias y los peroxisomas son sensores de estrés y orgánulos esenciales en las vías de señalización que propagan la señalización intracelular (Camejo et al., 2016; Cheeseman, 2007; Guevara-González et al., 2020).



**Figura 6.16.** Esquema de acción del  $H_2O_2$  extracelular como segundo mensajero en sitios como la NADPH oxidasa, peroxidasa de la pared celular, cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas como fuentes importantes de generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las vías de señalización para inducir la respuesta de defensa (Camejo et al., 2016; Cheeseman, 2007; Guevara-González et al., 2020).

Por lo tanto, esta es la primera demostración experimental de que la actividad de VDC está directamente relacionada con el contenido de afinina en las raíces de *H. longipes*. Este resultado también indica la posibilidad de utilizar la actividad VDC como indicador bioquímico del contenido de afinina en las raíces de *H. longipes*. Se

requieren llevar a cabo estudios más detallados a lo largo del ciclo de la planta, utilizando la elicitación controlada o no, para fortalecer esta aseveración. Se propone como sistema de producción de *Heliopsis longipes* que utilizando elicitación controlada logre incrementos en la concentración de afinina por unidad de materia seca el proceso de la Figura 6.17.



**Figura 6.17.** Proceso de disponibilidad de raíz de *H. longipes* con raíces de tamaño comercial en menor tiempo a través de la elicitación controlada, y que además logra niveles iguales o superiores de afinina por unidad de materia seca a los reportes previos por otros autores.

En el cuadro 6.3 se muestra el comparativo de la cuantificación de afinina obtenida en estudios reportados y la cantidad encontrada en este estudio con las dosis de peróxido de hidrógeno y ácido salicílico. Como se observa en el cuadro, el contenido de afinina incrementó con las aplicaciones de  $H_2O_2$  en ambas poblaciones, siendo mayor la cuantificación de afinina en la población de Conca que en la población de RB.



**Cuadro 6.3.** Rendimientos obtenidos de afinina reportados en diversos estudios de *H. longipes*.

Planta	Rendimiento obtenido afinina	Referencia de
<i>H. longipes</i>	7.3 mg/g	(Molina-Torres et al., 1996)
<i>Acamella oppositifolia</i>	0.351 mg/g	(Molina-Torres et al., 1996)
<i>Acamella oppositifolia</i>	0.172 mg/g	(Molina-Torres et al., 1996)
<i>H. longipes</i>	0.01 mg/g	(Cilia-López et al., 2010)
<i>H. longipes</i>	7.84 mg/g	(Buitimea-Cantúa et al., 2020a)
<i>H. longipes</i>	0.019 mg/g	(Castro-Ruiz et al., 2017)
<i>H. longipes</i>	0.017 mg/g	(Castro-Ruiz et al., 2017)
<i>H. longipes</i> *	14.93 mg/g	(Ixchel Parola-Contreras et al., 2020)
<i>H. longipes</i> **	5.99g/g	

\* Aplicación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM

\*\* Aplicación AS 10 mM

El proceso para tener disponible materia prima de calidad y con contenido promedio de afinina en la raíz de *H. longipes* y de tamaño comercial en menor tiempo puede lograrse a través de la elicitación controlada. Esta elicitación puede ser aplicada a partir de los seis meses con el tratamiento de AS 10 mM para incrementar la biomasa de la planta (Parola-Contreras et al., 2020b); mientras que la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM se propone sea aplicada con un día de anticipación a la cosecha de la materia prima (Mejía-Teniente et al., 2013).

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## VII. CONCLUSIONES

La sobreproducción de ME tiene importancia económica para las industrias, que se puede alcanzar mediante la activación de la inmunidad de las plantas. La obtención controlada utilizando eustresores durante alguna etapa de los sistemas de producción, es una estrategia efectiva para aumentar el contenido de SM específico como alcaloides, terpenoides, flavonoides y compuestos fenólicos en las plantas. El desarrollo de nuevos sistemas de producción de plantas, incluida la manipulación de la respuesta al estrés de la planta (búsqueda de condiciones de eustrésicas) debe enfocarse para determinar las dosis de eustressors para plantas medicinales para producir ME de interés en el futuro cercano. El tipo de eustressor que se utilizará en producciones a gran escala debe ser el que cumpla con ser efectivo en la sobre inducción de la síntesis y la calidad de ME específico, bajo costo y fácil implementación en el sistema de producción.

### 7.1 Resumen de resultados

- La aplicación vía foliar de ácido salicílico y peróxido de hidrógeno en concentraciones 10 mM y 200 mM respectivamente, resultaron dosis eustrésicas en las plantas de *H. longipes*.
- La concentración de AS 10 mM fue bio-estimulante.
- El incremento significativo de la actividad enzimática VDC se asoció directamente con el incremento significativo en el contenido de afinina en la raíz de *H. longipes*.

### 7.2 Conclusión

Las plantas colectadas de *H. longipes* pueden ser llevadas a un sistema de cultivo en condiciones de invernadero. La reproducción de la planta puede darse fácilmente por acodos, teniendo como ventajas: la producción de clones, rápida reproducción de la planta, y que, con el sustrato y manejo adecuado, la concentración de afinina en las raíces de estas plantas igualan la concentración de

esta misma sustancia que las plantas silvestres. Por otro lado, cabe señalar que sólo en un año de cultivo bajo Agricultura Protegida y con las condiciones previamente descritas en la metodología pueden ser alcanzados los tamaños comerciales en las raíces.

Asimismo, la elicitación controlada con peróxido de hidrógeno y ácido salicílico potencian el sistema inmune de la planta; así como las actividades enzimáticas relacionadas al estrés y la actividad de valina descarboxilasa. Específicamente, se encontró que la aplicación de ácido salicílico en la dosis de 10 mM tiene un efecto eustresor sobre la concentración de afinina en las plantas de la población de RB con un incremento de 66.67% más sobre las plantas control; y un efecto bioestimulante; es decir, que esta dosis incrementa de manera significativa la biomasa foliar y la longitud de raíz. Por su parte, el peróxido de hidrógeno en la dosis de 200 mM tiene un efecto elicitor sobre la producción de afinina, incrementando 3.66 más que la concentración de afinina en las plantas control y 0.86 más que en las plantas silvestres de la población de Conca.

Adicionalmente, se corrobora que las cuantificaciones de la actividad enzimática de valina descarboxilasa está directamente relacionada con la síntesis de la afinina, y que la medición de esta enzima puede servir como indicador directo del contenido de esta alcaloide en las raíces de esta planta. Este análisis, resulta ser más barato y fácil de implementar que la cuantificación de afinina por HPLC.

## VIII. REFERENCIAS

- Acree, F., Jacobson, M., Haller, H.L., 1945. An amide possessing insecticidal properties from the roots of erigeron affinis DC. Chem. Eng. Sci. 65, 5294. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.06.023>
- Afiyanti, M., Chen, H.J., 2014. Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato. J. Plant Physiol. 171, 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.003>
- Aguilar, M.I., Castillo, N.E., Alvarado-López, C., Duarte-Lisci, G., Ríos-Gómez, R., Rios, M.Y., 2016. HPLC Determination of the Alkamide Affinin in Fresh and Dry Roots of *Heliopsis longipes* (Asteraceae) and HS-SPME-GC-MS-TOF Analysis of Volatile Components. Food Anal. Methods 9, 1807–1813. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0358-5>
- Aharoni, A., Galili, G., 2011. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. Curr. Opin. Biotechnol. 22, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.004>
- Ahmed, S.A., Kadam, J. a., Mane, V.P., Patil, S.S., Baig, M.M.V., 2009. Effect of Different Agrowastes on Yield and Nutritional Contents of *Pleurotus florida*. Nat. Sci. 7, 44–48.
- Ali, B., 2017. Salicylic acid induced antioxidant system enhances the tolerance to aluminium in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants. Indian J. Plant Physiol. 22, 178–189. <https://doi.org/10.1007/s40502-017-0292-1>
- Allen, D., Bilz, M., Leaman, D.J., Miller, R.M., Timoshyna, A., Window, J., 2014. European Red List of Medicinal Plants. <https://doi.org/10.2779/907382>
- Almaguer González, J.A., 2002. Manejo aprovechamiento de *Heliopsis longipes* compositae (chilcuague) por comunidades campesinas del municipio de Xichú, Guanajuato, Desarrollo Rural de Guanajuato CONABIO.
- Alvarado, A.M., Aguirre-Becerra, H., Cristina Vázquez-Hernández, M., Magaña-Lopez, E., Parola-Contreras, I., Caicedo-Lopez, L.H., Contreras-Medina, L.M.,

- García-Trejo, J.F., Guevara-González, R.G., Feregrino-Pérez, A.A., 2019. Influence of elicitors and eustressors on the production of plant secondary metabolites, in: *Natural Bio-Active Compounds: Volume 1: Production and Applications*. pp. 333–388. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7_11)
- Arriaga-Alba, M., Ríos, M.Y., Déciga-Campos, M., 2013. Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. *Pharm. Biol.* 51, 1035–1039. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.775161>
- Aschenbrenner, A.K., Amrehn, E., Bechtel, L., Spring, O., 2015. Trichome differentiation on leaf primordia of *Helianthus annuus* (Asteraceae): morphology, gene expression and metabolite profile. *Planta* 241, 837–846. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2223-y>
- Bae, S.S., Ehrmann, B.M., Etefagh, K.A., Cech, N.B., 2010. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. *Phytochem. Anal.* 21, 438–443. <https://doi.org/10.1002/pca.1215>
- Barata, A.M., Rocha, F., Lopes, V., Carvalho, A.M., 2016. Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. *Ind. Crops Prod.* 88, 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.035>
- Beache, M.B., Chávez, E.C., Ortiz, J.C.D., 2015. Evaluación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* (A. Gray) S. F. Blake sobre ninfas de *Bactericera cockerelli* (Sulc.) (Hemiptera: Triozidae). *Investig. Cienc.* 23, 12–15.
- Bedolla-Cázares, F., Hernández-Marcelo, P.E., Gómez-Hurtado, M.A., Rodríguez-García, G., del Río, R.E., López-Castro, Y., García-Merinos, J.P., Torres-Valencia, J.M., González-Campos, J.B., 2017. Silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>-affinin complex synthesized by an ecofriendly route: chitosan-based electrospun composite production. *Clean Technol. Environ. Policy* 19, 897–906. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1285-x>

- Bermúdez-Guzmán, M.D.J., Guzmán-González, S., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J.J., Buenrostro-Nava, M.T., Michel-López, C.Y., 2016. Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Rev. Mex. ciencias agrícolas* 74, 897–910.
- Biczak, R., Śnioszek, M., Telesiński, A., Pawłowska, B., 2017. Growth inhibition and efficiency of the antioxidant system in spring barley and common radish grown on soil polluted ionic liquids with iodide anions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.016>
- Boonen, J., Bronselaer, A., Nielandt, J., Veryser, L., De Tré, G., De Spiegeleer, B., 2012. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. *J. Ethnopharmacol.* 142, 563–590. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.038>
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sc* 161, 839–851. <https://doi.org/10.1166/jnn.2008.18298>
- Bradford, M.M., 1976. Sistema séptico domiciliario | Rotomoldeo en Colombia Tanques Plásticos En Colombia Rotoplast. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buitimea-Cantúa, G. V., Buitimea-Cantúa, N.E., del Refugio Rocha-Pizaña, M., Rosas-Burgos, E.C., Hernández-Morales, A., Molina-Torres, J., 2020a. Antifungal and anti-aflatoxigenic activity of *Heliopsis longipes* roots and affinin/spilanthol against *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of *alfD* and *aflR* genes of the aflatoxins biosynthetic pathway. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 55, 210–219. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1681818>
- Buitimea-Cantúa, G. V., Marsch-Martinez, N., Ríos-Chavez, P., Méndez-Bravo, A., Molina-Torres, J., 2020b. Global gene expression analyses of the alkamide-producing plant *Heliopsis longipes* supports a polyketide synthase-mediated biosynthesis pathway. *PeerJ* 8, 1–24. <https://doi.org/10.7717/peerj.10074>

- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., Moreno, A., 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol. Biochem.* 103, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.035>
- Campos-García, T., Molina-torres, J., 2021. *Solanum lycopersicum* Seedlings . Metabolic Responses Induced by the Alkamide Affinin. *Metabolites* 11. <https://doi.org/doi.org/10.3390/metabo11030143>
- Caprioli, G., Iannarelli, R., Sagratini, G., Vittori, S., Zorzetto, C., Sánchez-Mateo, C.C., Rabanal, R.M., Quassinti, L., Bramucci, M., Vitali, L.A., Petrelli, D., Lupidi, G., Venditti, A., Maggi, F., 2017. Phenolic acids, antioxidant and antiproliferative activities of Naviglio® extracts from *Schizogyne sericea* (Asteraceae). *Nat. Prod. Res.* 31, 515–522. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1195383>
- Cardenas-Manríquez, G., Vega-Muñoz, I., Villagómez-Aranda, A.L., León-Galvan, M.F., Cruz-Hernandez, A., Torres-Pacheco, I., Rangel-Cano, R.M., Rivera-Bustamante, R.F., Guevara-Gonzalez, R.G., 2016. Proteomic and metabolomic profiles in transgenic tobacco (*N. tabacum xanthi nc*) to CchGLP from *Capsicum chinense* BG-3821 resistant to biotic and abiotic stresses. *Environ. Exp. Bot.* 130, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.005>
- Casida, J.E., 1980. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ. Health Perspect.* VOL.34, 189–202. <https://doi.org/10.1289/ehp.8034189>
- Castro-Ruiz, J.E., Rojas-Molina, A., Luna-Vázquez, F.J., Rivero-Cruz, F., García-Gasca, T., Ibarra-Alvarado, C., 2017. Affinin (Spilanthol), isolated from *heliopsis longipes*, induces vasodilation via activation of gasotransmitters and prostacyclin signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms18010218>
- Cheeseman, J., 2007. Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant Stress* 1, 4–15.
- Cheng, H.Y., Song, S.Q., 2006. Species and organ diversity in the effects of hydrogen peroxide on superoxide dismutase activity in vitro. *J. Integr. Plant Biol.* 48, 672–678. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00266.x>



- Cilia-López, V.G., 2007. Biología y utilización del chilcuague (*Heliopsis longipes* S. F. Blake). Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Cilia-López, V.G., Aguirre-Rivera, J.R., Espinosa-Reyes, G., Flores-Cano, J.A., Reyes-Agüero, J.A., Juárez-Flores, B.I., 2014. Distribución de *Heliopsis longipes* (Heliantheae: Asteraceae), un recurso endémico del centro de México. *Rev. Chapingo, Ser. Ciencias For. y del Ambient.* 20, 47–53. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2013.05.015>
- Cilia-López, V.G., Aguirre-Rivera, J.R., Reyes-Agüero, J.A., Juárez-Flores, B.I., 2008. Etnobotánica de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Bol. la Soc. Bot. Mex.* 83, 81–87. <https://doi.org/10.17129/botsci.1790>
- Cilia-López, V.G., Juárez-Flores, B.I., Aguirre-Rivera, J.R., Reyes-Agüero, J.A., 2010. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. *Pharm. Biol.* 48, 195–200. <https://doi.org/10.3109/13880200903078495>
- Cilia-López, V.G., Reyes-Agüero, J.A., Aguirre-Rivera, J.R., Juárez-Flores, B.I., 2013. Ampliación de la descripción y aspectos taxonómicos de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Polibotánica* 36, 1–13. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240658>
- Cilia López, V., Reyes Agüero, J., Aguirre Rivera, J., Juárez Flores, B., 2013. Ampliación de la descripción y aspectos taxonómicos de *Heliopsis longipes* (Asteraceae: Heliantheae). *Polibotánica* 1–13.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), 2012. La biodiversidad en Guanajuato. Estudio del Estado. II.
- CONABIO, 2012. La biodiversidad en Guanajuato. Estudio de estado, CONABIO.
- Cortez-Espinosa, N., Aviña-Verduzco, J.A., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Ríos-Chávez, P., 2011. Valine and phenylalanine as precursors in the biosynthesis of alkaloids in *Acmella radicans*. *Nat. Prod. Commun.* 6, 857–861. <https://doi.org/10.1177/1934578x1100600625>
- Cuello, J., Yue, L.C., 2008. Ebb-and-Flow Bioreactor Regime and Electrical

- Elicitation: Novel Strategies for Hairy Root Biochemical Production. *Electron. J. Integr. Biosci.* 3, 45–56.
- Czapek, F., 1921. *Spezielle Biochemie, Biochemie der Pflanzen*. G. Fischer Jena.
- Czégény, G., Máta, A., Hideg, É., 2016. UV-B effects on leaves-Oxidative stress and acclimation in controlled environments. *Plant Sci.* 248, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.04.013>
- De Gara, L., Locato, V., Dipierro, S., de Pinto, M.C., 2010. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 173, S13–S19. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.02.007>
- Déciga-Campos, M., Arriaga-Alba, M., Ventura-Martínez, R., Aguilar-Guadarrama, B., Rios, M.Y., 2012. Pharmacological and toxicological profile of extract from *Heliopsis longipes* and affinin. *Drug Dev. Res.* 73, 130–137. <https://doi.org/10.1002/ddr.21002>
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., Klessig, D.F., 2011. Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *Arab. B.* 9, e0156. <https://doi.org/10.1199/tab.0156>
- Dewick, P.M., 2009. *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*, Third. ed, John Wiley & Sons. Chippingham.
- Dewick, P.M., 2002. Secondary Metabolism: the Building Blocks and. Cycle 0471496405.
- Di, D.W., Zhang, C., Guo, G.Q., 2015. Involvement of secondary messengers and small organic molecules in auxin perception and signaling. *Plant Cell Rep.* 34, 895–904. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1767-z>
- Diao, Q., Song, Y., Shi, D., Qi, H., 2017. Interaction of polyamines, abscisic acid, nitric oxide, and hydrogen peroxide under chilling stress in tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.) seedlings. *Front. Plant Sci.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00203>
- Dominguez, E., 1999. El sistema nacional de Áreas Naturales Protegidas. *Biodiversitas* 27, 9–11.

- Domínguez, J.A., Leal, D.G., Viñales, D.M.A., 1958. Síntesis de N-isopropil y N-isobutilamida de algunos ácidos y comparación de su acción insecticida con la afinina. *Ciencia* 17.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* (Madison).
- du Jardin, P., 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Ebrahimi, M., Mokhtari, A., 2017. Engineering of Secondary Metabolites in Tissue and Cell Culture of Medicinal Plants: An Alternative to Produce Beneficial Compounds Using Bioreactor Technologies, in: *Crop Improvement: Sustainability Through Leading-Edge Technology*. pp. 137–167. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-65079-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-65079-1_7)
- European Food Safety Authority, 2011. Use of the EFSA Comprehensive European Food Consumption Database in Exposure Assessment. *EFSA J.* 9, 2097. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2097>
- Fan, D., Hodges, D.M., Zhang, J., Kirby, C.W., Ji, X., Locke, S.J., Critchley, A.T., Prithiviraj, B., 2011. Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. *Food Chem.* 124, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.008>
- Farhangi-Abriz, S., Ghassemi-Golezani, K., 2018. How can salicylic acid and jasmonic acid mitigate salt toxicity in soybean plants? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 1010–1016. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.070>
- Fatma, M., Masood, A., Per, T.S., Rasheed, F., Khan, N.A., 2016. Interplay between nitric oxide and sulfur assimilation in salt tolerance in plants. *Crop J.* 4, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.009>
- Ferrusquía-Jiménez, N.I., Chandrakasan, G., Torres-Pacheco, I., Rico-García, E., Feregrino-Perez, A.A., Guevara-González, R.G., 2020. Extracellular DNA: A

Relevant Plant Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) for Crop Protection Against Pests—A Review. *J. Plant Growth Regul.* <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10129-w>

Figuroa Pérez, M.G., Rocha-Guzmán, N.E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., Reynoso-Camacho, R., 2014. Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food Chem.* 156, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.101>

García-Chávez, A., Ramírez Chávez, E., Molina-Torres, J., 2004. El género *Heliopsis* (Heliantheae; Asteraceae) en México y las alcamidas presentes en sus raíces. *Acta Bot. Mex.* 115. <https://doi.org/10.21829/abm69.2004.983>

García-Mier, L., Jiménez-García, S.N., Chapa-Oliver, A.M., Mejía-Teniente, L., Ocampo-Velázquez, R. V, Rico-García, E., Feregrino-Pérez, A.A., Guevara-Gonzalez, R., Torres-Pacheco, I., 2014. Strategies for Sustainable Plant Food Production: Facing the Current Agricultural Challenges—Agriculture for Today and Tomorrow BT - Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI, in: Guevara-Gonzalez, R., Torres-Pacheco, I. (Eds.), . Springer International Publishing, Cham, pp. 1–50. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-03880-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03880-3_1)

García-Mier, L., Jiménez-García, S.N., Guevara-González, R.G., Feregrino-Pérez, A.A., Contreras-Medina, L.M., Torres-Pacheco, I., 2015. Elicitor mixtures Compounds Significantly Increase Bioactive compounds, Antioxidant Activity, and Quality Parameters in Sweet Bell Pepper. *J. Chem.* 2015, 1–8.

Gorelick, J., Bernstein, N., 2014. Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites, 1st ed, *Advances in Agronomy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800138-7.00005-X>

Gorni, P.H., Pacheco, A.C., 2016. Growth promotion and elicitor activity of salicylic acid in *Achillea millefolium* L. *African J. Biotechnol.* 15, 657–665.

<https://doi.org/10.5897/ajb2016.15320>

Greger, H., 2016. Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. *Phytochem. Rev.* 15, 729–770. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9418-0>

Guevara-González, R.G., Aranda, A.L. V., Jiménez, N.I.F., Roséndiz, M.M., 2020. *Elicidores en la agricultura: bases teóricas y algunas aplicaciones*, 1°. ed. Universidad de Almería.

Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M., 2012. Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biol. Trace Elem. Res.* 149, 248–261. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9419-4>

Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Ren, K., Cheng, Z., 2018. Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Sci. Hortic.* (Amsterdam). 240, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.011>

Hayes, S., Sharma, A., Fraser, D.P., Trevisan, M., Cragg-Barber, C.K., Tavidou, E., Fankhauser, C., Jenkins, G.I., Franklin, K.A., 2017. UV-B Perceived by the UVR8 Photoreceptor Inhibits Plant Thermomorphogenesis. *Curr. Biol.* 27, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.004>

He, H., Yajing, N., Huawen, C., Xingjiao, T., Xinli, X., Weilun, Y., Silan, D., 2012. CDNA-AFLP analysis of salt-inducible genes expression in *Chrysanthemum lavandulifolium* under salt treatment. *J. Plant Physiol.* 169, 410–420. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.013>

Hernández-Barrera, A., Velarde-Buendía, A., Zepeda, I., Sanchez, F., Quinto, C., Sánchez-Lopez, R., Cheung, A.Y., Wu, H.M., Cardenas, L., 2015. Hyper, a hydrogen peroxide sensor, indicates the sensitivity of the *Arabidopsis* root elongation zone to aluminum treatment. *Sensors (Switzerland)* 15, 855–867. <https://doi.org/10.3390/s150100855>

- Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J.-L.L., Gómez-Luna, B.-E.E., Ramírez-Chávez, E., Abraham-Juárez, M. del R., Martínez-Soto, G., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., Abraham-Juárez, M. del R., Martínez-Soto, G., Molina-Torres, J., 2012. Determinación de la actividad insecticida de *Heliopsis longipes* A. Gray Blake, una planta endémica del estado de Guanajuato. *Ra Ximhai* 8, 111–118. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e1.2012.12.ah>
- Hernández-Morales, A., Arvizu-Gómez, J.L., Carranza-Álvarez, C., Gómez-Luna, B.E., Alvarado-Sánchez, B., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., 2015. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. *J. Asia. Pac. Entomol.* 18, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.09.004>
- Hungarica, A.B., 2016. Exogenous low-dose hydrogen peroxide enhances drought tolerance of soybean (*Glycine max* L.) through inducing ... <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.2.5>
- INE, SEMARNAP, 1998. Programa de Manejo de la Reserva de la Biosfera El Triunfo, 1a ed. Instituto Nacional de Ecología, México.
- INEGI, 2017a. Anuario estadístico y geográfico de Guanajuato 2017.
- INEGI, 2017b. Anuario estadístico y geográfico de Querétaro 2017.
- Islam, S., Mia, M., Apu, A.I., Halder, J., Rahman, M.F., Islam, M., Jahan, N., 2015. A comprehensive review on region based traditional Ayurvedic practitioner's plants secondary metabolites and their phytochemical activities in Bangladesh. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 3, 202–216.
- Jacobson, M., Agree, F., Haller, H.L., 1947. Correction of the source of "affinin" (n-isobutyl-2,6,8-decatrienoamide). *J. Org. Chem.* 12, 731–732. <https://doi.org/10.1021/jo01169a007>
- Jamwal, K., Bhattacharya, S., Puri, S., 2018. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 9, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2017.12.003>
- Johansson, O.N., Nilsson, A.K., Gustavsson, M.B., Backhaus, T., Andersson, M.X.,

- Ellerström, M., 2015. A quick and robust method for quantification of the hypersensitive response in plants. *PeerJ* 2015, e1469. <https://doi.org/10.7717/peerj.1469>
- Johns, T., Graham, K., Towers, G.H.N., 1982. Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the asteraceae. *Phytochemistry* 21, 2737–2738. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(82\)83110-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(82)83110-5)
- Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R., He, X., 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2, 377–392. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)82199-7](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)82199-7)
- Kaciene, G., Žaltauskaite, J., Milče, E., Juknys, R., Kaciene, G., Milče, J.Ž.E., Juknys, R., 2014. Role of oxidative stress on growth responses of spring barley exposed to different environmental stressors. *J. Plant Ecol.* 8, 605–616. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtv026>
- Khalil, N., Fekry, M., Bishr, M., El-Zalabani, S., Salama, O., 2018. Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. *Plant Physiol. Biochem.* 123, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.007>
- Khan, J., Bashir, Z., Ahmad, A., Tariq, W., Yousaf, A., Gohar, M., 2015. Mathematical modeling of cotton leaf curl virus with respect to environmental factors. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 5, 172–176. <https://doi.org/10.1556/1886.2015.00012>
- Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., Khan, N.A., 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* 6, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462>
- Kikowska, M., Kedziora, I., Krawczyk, A., Thiem, B., 2015. Methyl jasmonate, yeast extract and sucrose stimulate phenolic acids accumulation in *Eryngium planum* L. shoot cultures. *Acta Biochim. Pol.* 62, 197–200. [https://doi.org/10.18388/abp.2014\\_880](https://doi.org/10.18388/abp.2014_880)

- Koc, S., Isgor, B.S., Isgor, Y.G., Shomali Moghaddam, N., Yildirim, O., 2015. The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharm. Biol.* 53, 746–751. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.942788>
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Štokr, F., Bačkor, M., 2009. Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Soil* 320, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9889-0>
- Kranner, I., Minibayeva, F. V., Beckett, R.P., Seal, C.E., 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol.* 188, 655–673. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>
- Kumar, V., Sharma, A., Kaur, R., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Ahmad, P., 2017. Differential distribution of amino acids in plants. *Amino Acids* 49, 821–869. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2401-x>
- Kuźniak, E., Urbanek, H., 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plant.* 22, 195–203. <https://doi.org/10.1007/s11738-000-0076-4>
- León-López, L., Escobar-Zúñiga, Y., Salazar-Salas, N.Y., Mora Rochín, S., Cuevas-Rodríguez, E.O., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., 2020. Improving Polyphenolic Compounds: Antioxidant Activity in Chickpea Sprouts through Elicitation with Hydrogen Peroxide. *Foods* 9, 1791. <https://doi.org/10.3390/foods9121791>
- Liu, H., Gale, S.W., Cheuk, M.L., Fischer, G.A., 2019. Conservation impacts of commercial cultivation of endangered and overharvested plants. *Conserv. Biol.* 33, 288–299. <https://doi.org/10.1111/cobi.13216>
- Liu, H., Gale, S.W., Cheuk, M.L., Fischer, G.A., 2018. Conservation impacts of commercial cultivation of endangered and overharvested plants. *Conserv. Biol.* 0, 1–12. <https://doi.org/10.1111/cobi.13216>
- Liu, L., Sonbol, F.M., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., Yao, J., He, S.Y.,



- Dong, X., 2016. Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nat. Commun.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms13099>
- Liu, Y., Sun, T., Sun, Y., Zhang, Yanjun, Radojičić, A., Ding, Y., Tian, H., Huang, X., Lan, J., Chen, S., Orduna, A.R., Zhang, K., Jetter, R., Li, X., Zhang, Yuelin, 2020. Diverse roles of the salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/ NPR4 in plant immunity. *Plant Cell* 32, 4002–4016. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00499>
- López-Martínez, S., Aguilar-Guadarrama, A.B., Rios, M.Y., 2011. Minor alkaloids from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochem. Lett.* 4, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.04.014>
- Malik, N.A.A., Kumar, I.S., Nadarajah, K., 2020. Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>
- Marques, A.M., Lima, M.C.H.P., Araújo Filho, H.C., Esteves, R.L., Kaplan, M.A.C., 2012. Evaluation of the volatile components and the seasonal variation of the methyl salicylate from *Stiffia chrysantha* Mikan by HS-SPME/GC-MS. *Bol. Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromat.* 11, 413–419.
- Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, B.A., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Rivera-Bustamante, R.F., Feregrino-Perez, A.A., Pérez-Ramírez, I., Rocha-Guzmán, N.E., Reynoso-Camacho, R., Guevara-González, R.G., 2019. Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annuum* L.) against pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 106, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2018.11.008>
- Mejía-Teniente, L., Duran-Flores, F. de D., Chapa-Oliver, A.M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M.M., Ocampo-Velázquez, R. V., Guevara-González, R.G., 2013. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10178–10196. <https://doi.org/10.3390/ijms140510178>

- Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M.M., Ocampo-Velazquez, R. V., Herrera-Ruiz, G., Chapa-Oliver, A.M., Guevara-González, R.G., 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African J. Biotechnol.* 9, 9155–9162. <https://doi.org/10.5897/AJB2010.000-3340>
- Méndez-Bravo, A., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Raya-González, J., Ramírez-Chávez, E., Molina-Torres, J., Guevara-García, A.A., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., 2011. Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to botrytis cinerea in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027251>
- Michal, G., Schomburg, D., 2012. *Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Minto, R.E., Blacklock, B.J., 2008. Biosynthesis and Function of Polyacetylenes and Allied Natural Products. *Prog. Lipid Res.* 47, 233–306. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Miura, K., Tada, Y., 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00004>
- Mohammad Yusuf, Shamsul Hayat, Mohammed Nasser Alyemeni, Q.F. and A.A., 2013. Salicylic Acid: Physiological Roles in Plants. *Salicylic Acid* 1–16. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6428-6>
- Molina-Torres, J., García-Chávez, A., Ramírez-Chávez, E., 1999. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol.* 64, 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00134-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00134-2)
- Molina-Torres, J., Salazar-Cabrera, C.J., Armenta-Salinas, C., Ramírez-Chávez, E., 2004. Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and Reduced Amides. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4700–4704.
- Molina-Torres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramirez-Chavez, E., del Rio, R.E., 1995. Presence of the bornyl ester of deca-2e,6z,8e-trienoic acid in *heliopsis longipes*

- roots. *J. Nat. Prod.* 58, 1590–1591. <https://doi.org/10.1021/np50124a018>
- Molinatorres, J., Salgado-Garciglia, R., Ramirez-Chavez, E., Del Rio, R.E., 1996. Purely olefinic alkaloids in *Heliopsis longipes* and *acmella* (*Spilanthes oppositifolia*). *Biochem. Syst. Ecol.* 24, 43–47. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(95\)00099-2](https://doi.org/10.1016/0305-1978(95)00099-2)
- Montesinos-Navarro, A., Verdú, M., Querejeta, J.I., Valiente-Banuet, A., 2017. Nurse plants transfer more nitrogen to distantly related species. *Ecology* 98, 1300–1310. <https://doi.org/10.1002/ecy.1771>
- Morales, S.G., Parasitología, D. De, Dpa, A., Autónoma, U., Antonio, A., Uaaan, N., Flores, M.L., Mexicana, B., Industrial, C.P., Arizpe, R., Mendoza, A.B., Horticultura, D. De, Olivas, A.F., 2011. Actividad Inhibitoria del Extracto de *Heliopsis longipes* Sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Inhibitory Activity of *Heliopsis longipes* Extract on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 29, 146–153.
- Mustafavi, S.H., Naghdi Badi, H., Şekara, A., Mehrafarin, A., Janda, T., Ghorbanpour, M., Rafiee, H., 2018. Polyamines and their possible mechanisms involved in plant physiological processes and elicitation of secondary metabolites. *Acta Physiol. Plant.* 40, 1–19. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2671-2>
- Nakatani, N., Nagashima, M., 1992. Pungent Alkaloids from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 759–762. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.759>
- Naranjo, S.E., Ellsworth, P.C., Frisvold, G.B., 2015. Economic Value of Biological Control in Integrated Pest Management of Managed Plant Systems. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 621–645. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021005>
- Núñez-Colín, C.A., Valadez-Moctezuma, E., 2010. Análisis Estadístico de Huellas Genómicas, un Uso Práctico de los Paquetes Computacionales más Populares. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Celaya.
- ONU, 1992. Convenio sobre la Diversidad Biológica, Organización de las Naciones

Unidas.

Pacheco, A.C.C., Cabral, S., Sabrina, É., Cabral, C. da S., Fermino, E.S. da S., Aleman, C.C., 2013. Salicylic acid-induced changes to growth, flowering and flavonoids production in marigold plants. *J. Med. Plants Res.* 7, 3158–3163. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5208>

Parola-Contreras, I., Guevara-González, R.G., Feregrino-Pérez, A.A., Reynoso-Camacho, R., Pérez-Ramírez, I.F., Ocampo-Velázquez, R. V., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F., Tovar-Pérez, E.G., 2020a. Phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from leaves and flowers of chilcuague (*Heliopsis longipes*, Asteraceae). *Bot. Sci.* 99, 149–160. <https://doi.org/10.17129/botsoci.2671>

Parola-Contreras, I., Tovar-Perez, E.G., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F.J., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velazquez, R. V., Guevara-González, R.G., 2020b. Changes in affinin contents in *Heliopsis longipes* (chilcuague) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions. *Ind. Crops Prod.* 148. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112314>

Parola-Contreras, I., Valencia-Hernández, J.A., Solano-Álvarez, N., Guevara-González, R.G., 2019. Efecto del extracto etanólico de diferentes órganos de la planta del chilcuague (*Heliopsis longipes*) en gorgojos (*Sitophilus granarius*ngrese). *Perspect. la Cienc. y la Ing.* 2, 100–108.

Peña, A., Durand, L., Álvarez, C., 1998. Conservación, La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998.

Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Price, A.H., Taylor, A., Ripley, S.J., Griffiths, A., Trewavas, A.J., Knight, M.R., 1994. Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6, 1301–1310. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.9.1301>

Prince, D.C., Drurey, C., Zipfel, C., Hogenhout, S.A., 2014. The Leucine-Rich

- Repeat Receptor-Like Kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED KINASE1 and the Cytochrome P450 PHYTOALEXIN DEFICIENT3 Contribute to Innate Immunity to Aphids in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 164, 2207–2219. <https://doi.org/10.1104/pp.114.235598>
- Ramakrishnan, R., Periyasamy, R., Lakkakula, S., Subramani, P., Arockiam, S., Manikandan, R., 2017. In Vitro Propagation and Conservation of Useful Endangered Medicinal Plants with Anticancer Activity Abstract Conservation The Current Status of Anticancer. *J. Mol. Biol. Biotechnol.* 2017 2, 1–8.
- Ramírez-Chávez, E., López-Bucio, J., Herrera-Estrella, L., Molina-Torres, J., 2004. Alkamides isolated from plants promote growth and alter root development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134, 1058–1068. <https://doi.org/10.1104/pp.103.034553>
- Ramírez-Chávez, E., Lucas-Valdez, L., Virgen-Calleros, G., Molina-Torres, J., 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia* 34, 207–215.
- Raomai, S., Kumaria, S., Kehie, M., Tandon, P., 2014. Plantlet regeneration of *Paris polyphylla* Sm. via thin cell layer culture and enhancement of steroidal saponins in mini-rhizome cultures using elicitors. *Plant Growth Regul.* 75, 341–353. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9957-1>
- Rios, M.Y., Aguilar-Guadarrama, A.B., Gutiérrez, M. del C., 2007. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 110, 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.041>
- Rivas-San Vicente, M., Plasencia, J., 2011. Salicylic acid beyond defence: Its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62, 3321–3338. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
- Rivera, G., Bocanegra-García, V., Monge, A., 2010. Traditional plants as source of functional foods: A review. *CYTA - J. Food* 8, 159–167. <https://doi.org/10.1080/19476330903322978>
- Rizhsky, L., Jin, H., Shepard, M.R., Scott, H.W., Teitgen, A.M., Perera, M.A.,

- Mhaske, V., Jose, A., Zheng, X., Crispin, M., Wurtele, E.S., Jones, D., Hur, M., Góngora-Castillo, E., Buell, C.R., Minto, R.E., Nikolau, B.J., 2016. Integrating metabolomics and transcriptomics data to discover a biocatalyst that can generate the amine precursors for alkamide biosynthesis. *Plant J.* 88, 775–793. <https://doi.org/10.1111/tpj.13295>
- Rohlf, F.J., 1992. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Applied Biostatistics*.
- Rowe, H.C., Ro, D. kyun, Rieseberg, L.H., 2012. Response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaf surface defenses to exogenous methyl jasmonate. *PLoS One* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037191>
- Rzedowski, J., Calderón de Rzedowski, G., Zamudio, S., 2012. La flora vascular endémica en el estado de Querétaro. I. Análisis numéricos preliminares y definición de áreas de concentración de las especies de distribución restringida. *Acta Bot. Mex.* 99, 91–104.
- Rzedowski, P.J., 2008. flora del bajío y de regiones adyacentes 1–166.
- Saini, R.K., Harish Prashanth, K. V., Shetty, N.P., Giridhar, P., 2014. Elicitors, SA and MJ enhance carotenoids and tocopherol biosynthesis and expression of antioxidant related genes in *Moringa oleifera* Lam. leaves. *Acta Physiol. Plant.* 36, 2695–2704. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1640-7>
- Salgado-Garciglia, R., Molina-torres, J., López-meza, J.E., Loeza-lara, P.D., 2008. Effect of crude extract and bioactive compounds of *Heliopsis longipes* on anthracnose incidence, mycorrhization, and nodulation of bean. *Agrociencia* 42, 679–688.
- Sánchez-Pujante, P.J., Borja-Martínez, M., Pedreño, M.Á., Almagro, L., 2017. Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant in vitro cultures. *Planta* 246, 19–32. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2705-9>
- Santos, A. da S., Araújo, R.H.C.R., Nobre, R.G., Sousa, V.F. de O., Rodrigues, M.H.B.S., Formiga, J.A., Gomes, F.A.L., Santos, G.L. dos, Onias, E.A., 2018. Effect of Hydrogen Peroxide in the Growth of Yellow Passion Fruit Seedlings

Under Salinity Stress. *J. Agric. Sci.* 10, 151.  
<https://doi.org/10.5539/jas.v10n10p151>

Sathiyaraj, G., Srinivasan, S., Kim, Y.J., Lee, O.R., Parvin, S., Balusamy, S.R.D., Khorolragchaa, A., Yang, D.C., 2014. Acclimation of hydrogen peroxide enhances salt tolerance by activating defense-related proteins in *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Mol. Biol. Rep.* 41, 3761–3771. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3241-3>

Schlüter, A., Ruiz-Trillo, I., Pujol, A., 2011. Phylogenomic evidence for a Myxococcal contribution to the Mitochondrial Fatty Acid Beta-Oxidation. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021989>

Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L., Franklin, G., 2019. Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. *J. Pharm. Pharmacol.* 71, 70–82. <https://doi.org/10.1111/jphp.12743>

Shanker, A. K., Venkateswarlu, B., 2012. Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations, *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. <https://doi.org/10.5772/895>

Sidhu, Y., 2010. In vitro micropropagation of medicinal plants by tissue culture, *The Plymouth Student Scientist*.

Singh, M., Chaturvedi, R., 2012. Evaluation of nutrient uptake and physical parameters on cell biomass growth and production of spilanthol in suspension cultures of *Spilanthes acmella* Murr. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 943–951. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0679-3>

Smirnoff, N., Arnaud, D., 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol.* 221, 1197–1214. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>

Subramanian, V., Dubini, A., Seibert, M., 2012. Metabolic Pathways in Green Algae with Potential Value for Biofuel Production 399–422. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5110-1\\_22](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5110-1_22)

Sudhamoy, M., al, Mandal, S., 2010. Induction of phenolics, lignin and key defense

- enzymes in eggplant (*solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African J. Biotechnol.* 9, 8038–8047. <https://doi.org/10.5897/ajb10.984>
- Sun, Y., Wang, H., Liu, S., Peng, X., 2016. Exogenous application of hydrogen peroxide alleviates drought stress in cucumber seedlings. *South African J. Bot.* 106, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.05.008>
- Tanoori, A., Ghasemnezhad, A., Alizadeh, M., 2015. In vitro estimation of antioxidant compounds of artichoke (*Cynara scolymus* L.) as affected by methyl jasmonate and salicylic acid. *J. Chem. Pharm. Res.* 7, 991–996.
- Timperio, A.M., Egidì, M.G., Zolla, L., 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics* 71, 391–411. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.07.005>
- Toscano, S., Ferrante, A., Leonardi, C., Romano, D., 2018. PAL activities in asparagus spears during storage after ammonium sulfate treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 140, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.010>
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R.G., Romero-Gomez, S. de J., Rico-García, E., Ocampo-Velazquez, R. V., Alvarez-Arquieta, L. de L., Torres-Pacheco, I., 2017. Plant hormesis management with biostimulants of biotic origin in agriculture. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01762>
- Vargas-Hernández, M., Torres-Pacheco, I., Gautier, F., Álvarez-Mayorga, B., Cruz-Hernández, A., García-Mier, L., Jiménez-García, S.N., Ocampo-Velázquez, R. V., Feregrino-Perez, A.A., Guevara-Gonzalez, R.G., 2017. Influence of hydrogen peroxide foliar applications on in vitro antimicrobial activity in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Biosyst.* 151, 269–275. <https://doi.org/10.1080/11263504.2016.1168494>
- Vázquez-Hernández, M C, Feregrino-Perez, A.A., Perez-Ramirez, I., Ocampo-Velazquez, R. V., Rico-García, E., Torres-Pacheco, I., Guevara-Gonzalez, R.G., 2019. Controlled elicitation increases steviol glycosides (SGs) content and



gene expression-associated to biosynthesis of SGs in *Stevia rebaudiana* B. cv. Morita II. Ind. Crops Prod. 139, 111479. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111479>

Vázquez-Hernández, Ma C., Parola-Contreras, I., Montoya-Gómez, L.M., Torres-Pacheco, I., Schwarz, D., Guevara-González, R.G., 2019. Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production. Sci. Hortic. (Amsterdam). 250, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.053>

Vega-Muñoz, I.E. fragmented D. acts as a damage-Associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*, Feregrino-Pérez, A.A., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R.G., 2018. Exogenous fragmented DNA acts as a damage-Associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*. Funct. Plant Biol. 45, 1065–1072. <https://doi.org/10.1071/FP18011>

Vélez-Terranova, M., Gaona, R.C., Sánchez-Guerrero, H., 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. Trop. Subtrop. Agroecosystems.

Verma, N., Shukla, S., 2015. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants 2, 105–113.

Vijayalakshmi, T., Vijayakumar, A.S., Kiranmai, K., Nareshkumar, A., Sudhakar, C., 2016. Salt Stress Induced Modulations in Growth, Compatible Solutes and Antioxidant Enzymes Response in Two Cultivars of Safflower (<i>Carthamus tinctorius</i> L. Cultivar TSF1 and Cultivar SM) Differing in Salt Tolerance. Am. J. Plant Sci. 07, 1802–1819. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.713168>

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. Van De, Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23, 4407–4414.

<https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>

War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y., Ignacimuthu, S., 2011. Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*cicer arietinum* l). *Plant Signal. Behav.* 6, 1787–1792. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17685>

Woelkart, K., Bauer, R., 2007. The role of alkamides as an active principle of Echinacea. *Planta Med.* 73, 615–623. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981531>

Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M.H., Bahadar, K., 2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* 124, 198–202. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>

Zhou, L., Hou, H., Yang, T., Lian, Y., Sun, Y., Bian, Z., Wang, C., 2018. Exogenous hydrogen peroxide inhibits primary root gravitropism by regulating auxin distribution during Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol. Biochem.* 128, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.014>

Zipfel, C., 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.11.003>

Zlesak, D.C., 2007. Factors affecting seed germination of *Heliopsis helianthoides* (L.) Sweet. *Seed Sci. Technol.* 35, 577–594. <https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.3.06>

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

**IX. ANEXOS**

**ANEXO 1** Fraccionamiento del extracto de diclorometano obtenido de raíces de *H. longipes* y purificación de afinina

El material vegetal seco y molido (7 kg) se extrae con diclorometano. Cien gramos del extracto de diclorometano se fraccionaron mediante cromatografía en columna en fase normal utilizando una columna de gel de sílice abierta (1 kg, Kiesegel 60 Merck malla 100-230, 8x110 cm). Se utilizaron hexano y acetato de etilo como eluyentes en proporciones de 100:0 a 40:60. A partir de este procedimiento, se recogieron 472 fracciones (250 mL), se controlaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se agruparon en 21 combinaciones de acuerdo con su similitud cromatográfica. El análisis de TLC de los grupos 8-17 reveló la presencia de una mancha gris oscura principal ( $R_f=0.3$ , hexano: acetato de etilo 3:2), visualizado con una lámpara ultravioleta a 254 nm. La pulverización de placas de TLC con una solución de pulverización de anisaldehído / ácido sulfúrico (0.5 ml de anisaldehído en 50 mL de ácido acético glacial y 1 mL de ácido sulfúrico al 97%) desarrolló una mancha púrpura brillante, como se informó para otras isobutil-amidas olefínicas. Los grupos 8-17 se combinaron (45 g) y se analizaron adicionalmente mediante cromatografía en columna abierta (450 g, Kiesegel 60 Merck 100-230 mesh, 4.5 120 cm) usando un gradiente escalonado de hexano y acetato de etilo 100:0 a 90:10. Basándose en su similitud cromatográfica, determinada por TLC, las fracciones eluidas con hexano: acetato de etilo 97:3 se combinaron y se evaporaron a sequedad al vacío dejando un residuo de 28.5 g de un compuesto aparentemente puro. La pureza del compuesto aislado se confirmó mediante HPLC-PDA, usando un cromatógrafo de HPLC (Waters 600 Associates, Milford, MA, EE.UU.) acoplado a un detector de matriz de fotodiodos (Waters 2998). Este análisis se llevó a cabo en una columna X Bridge C18 (4.6 x 100 mm 3.5  $\mu$ m). El caudal de la fase móvil (acetonitrilo/agua 44:56 v/v) fue de 0.5 mL/min con una temperatura de columna de 30  $\mu$ C y una longitud de onda de detección de 229 nm (Castro-Ruiz et al., 2017).

## ANEXO 2 Preparación de las soluciones para la cuantificación de las actividades enzimáticas

### Soluciones para el ensayo de la actividad Superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1)

1. *Búfer de extracción (Fosfato de potasio 0.05 M, pH 7.8).* Se disolvieron 0.7054 g de fosfato de potasio monobásico y 3.46 g de fosfato de potasio dibásico en 150 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.8 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, se aforó a un volumen final de 250 mL con agua destilada.
2. *Búfer de reacción (Fosfato de potasio 0.05 M, pH 7.8).* Se disolvieron 0.7054 g de fosfato de potasio monobásico y 3.46 g de fosfato de potasio dibásico en 150 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.8 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, se aforó a un volumen final de 250 mL con agua destilada.
3. *Solución de EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 mM.* Se disolvió 3.72 mg en 60 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 100 mL.
4. *Solución de Metionina 0.13 M.* Se disolvió 1.94 g de metionina en 60 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 100 mL.
5. *Solución de NBT 0.75 mM.* Se disolvió 61.3 mg de NBT en 60 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 100 mL (se almacenó en frasco oscuro y 4 °C).
6. *Solución de Riboflavina 0.02 mM.* Se disolvió 1.88 mg de metionina en 150 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 250 mL (se almacenó en frasco oscuro y 4 °C).

### **Soluciones para el ensayo de la actividad Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)**

1. *Búfer de extracción (Tris-HCl 100 mM, Glicerol 20 % v/v, 2-Mercaptoetanol 30 mM, pH 8.0).* Se disolvió 1.575 g de Tris-HCl en 60 mL de agua destilada. Se añadió 20 mL de glicerol y 210  $\mu$ L de 2-Mercaptoetanol. Se ajustó el pH a 8.0 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
2. *Búfer de reacción (Fosfato de potasio 50 mM, pH 8.0).* Se disolvieron 0.0965 g de fosfato de potasio monobásico y 0.749 g de fosfato de potasio dibásico en 60 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 8.0 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
3. *Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 mM.* Se añadió 0.566 ml de peróxido (al 50 % de pureza) y se aforó a 100 mL con agua destilada (Esta solución se preparó el mismo día del ensayo).

### **Soluciones para el ensayo de la actividad Fenilalanina-amonio liasa (PAL) (EC 4.3.1.5)**

1. *Búfer de extracción (Borato 0.1 M, 0.1% v/v de 2-Mercaptoetanol, pH 8.8).* Se disolvieron 0.451 g de ácido bórico y 1.029 g de borato de sodio en 60 mL de agua destilada. Posteriormente, se añadió 100  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Se ajustó el pH a 8.8 (con ácido o base, según sea el caso) y se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
2. *Búfer de reacción (Borato 0.1 M, L-Fenilalanina 10 mM, pH 8.8).* Se disolvieron 0.451 g de ácido bórico, 1.029 g de borato de sodio y 0.1652 g de L-Fenilalanina en 60 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 8.8 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
3. *Solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 N.* En un matraz aforado de 100 ml, se colocaron 20 mL de agua destilada. Posteriormente se añadió 8.3 mL de HCl (por las paredes del matraz con precaución) y se aforó a un volumen final de 100 mL con agua destilada.

4. *Solución Stock de ácido cinámico [3 mg/mL].* Se disolvió 0.075 g de ácido cinámico en 20 mL de agua destilada. Posteriormente, se aforó a un volumen final de 25 mL con agua destilada.

#### **Soluciones para el ensayo de la actividad Valina descarboxilasa (VDC) (EC 4.1.1.14)**

1. *Búfer de extracción (Fosfato de potasio 50 mM, Fosfato de piridoxal 50  $\mu$ M, 2-Mercaptoetanol 1 mM, pH 8.0).* Se disolvieron 0.344 g de fosfato de potasio monobásico, 1.742 g de fosfato de potasio dibásico, 3.089 mg de fosfato de piridoxal en 150 mL agua destilada. Posteriormente, se añadió 17.5  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Se ajustó el pH a 8.0 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, se aforó a un volumen final de 250 mL con agua destilada.

2. *Búfer de reacción (Fosfato de potasio 50 mM, Fosfato de piridoxal 1 mM, L-Valina 1 mM, pH 7.5).* Se disolvieron 0.586 g de fosfato de potasio monobásico, 1.437 g de fosfato de potasio dibásico, 0.0617 g de fosfato de piridoxal y 0.5857 g de L-Valina en 150 mL de agua destilada. Se ajustó el pH a 7.5 (con ácido o base, según sea el caso). Posteriormente, se aforó a un volumen final de 250 mL con agua destilada.

#### **Soluciones para la determinación de proteína**

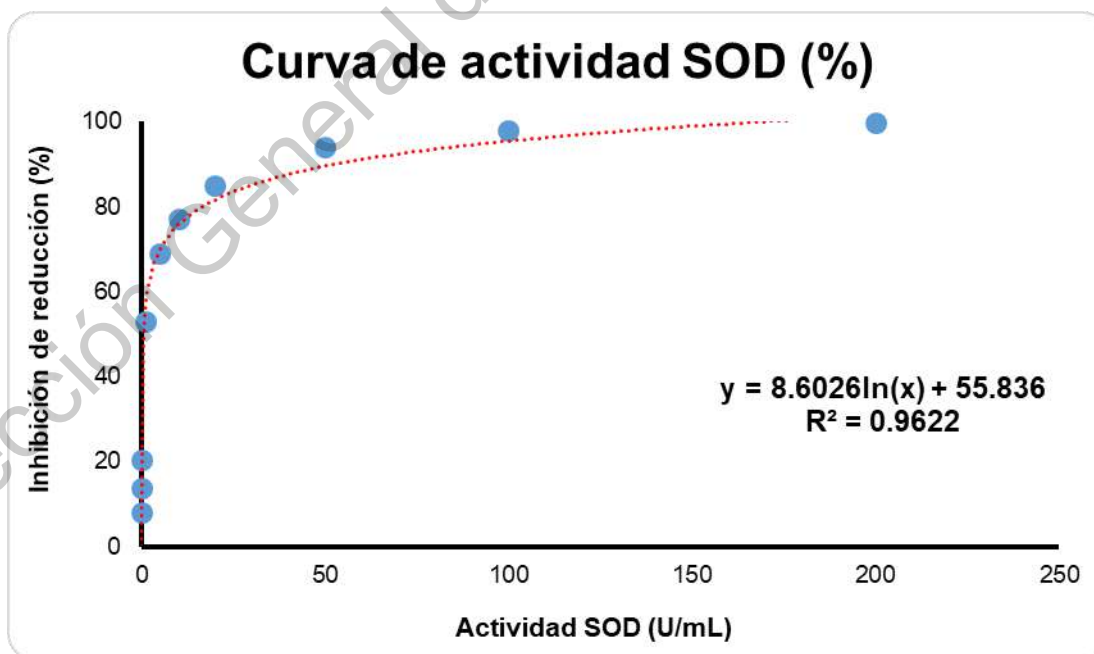
1. *Solución de cloruro de sodio 0.15 M.* Se disolvió 0.87g de NaCl en 60 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 100 mL.

2. *Solución Stock de albúmina de suero bovino [1 mg/mL].* Se disolvió 0.01 g de albúmina de suero bovino en 30 mL de agua destilada y se aforó a un volumen final de 50 mL.

**ANEXO 3** Curvas patrón usadas en la cuantificación de las actividades enzimáticas

A. Curva patrón de actividad de superóxido dismutasa (SOD)

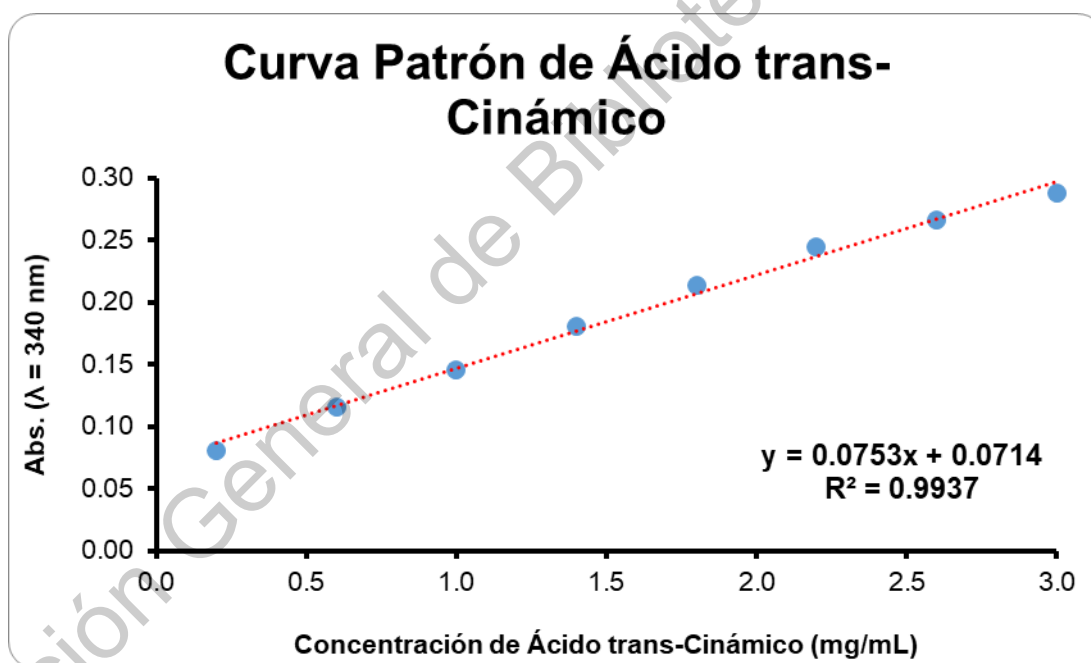
Actividad de SOD (U/mL)	Inhibición de reducción de NBT (%)
200	99.7
100	98
50	94
20	85
10	77
5	69
1	53
0.1	20.3
0.01	13.7
0.001	8



B. Curva patrón de ácido cinámico

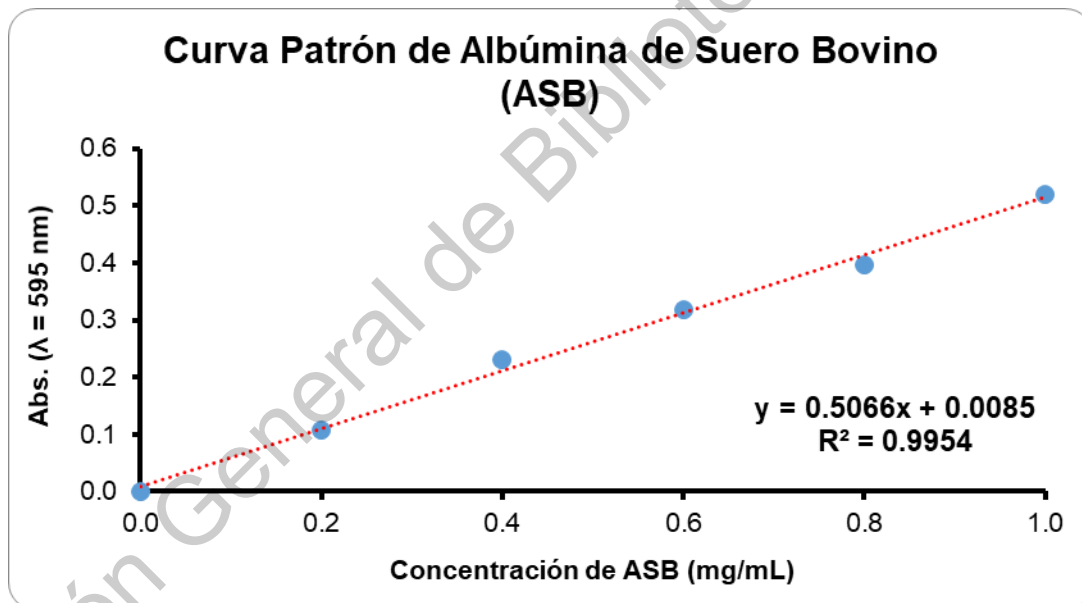


Acido Cinámico Concentración (mg/mL)	Absorbancia ( $\lambda_{340\text{nm}}$ )
0.2	0.081 ± 0.010
0.6	0.116 ± 0.011
1	0.146 ± 0.003
1.4	0.180 ± 0.002
1.8	0.214 ± 0.003
2.2	0.245 ± 0.003
2.6	0.266 ± 0.001
3	0.288 ± 0.003



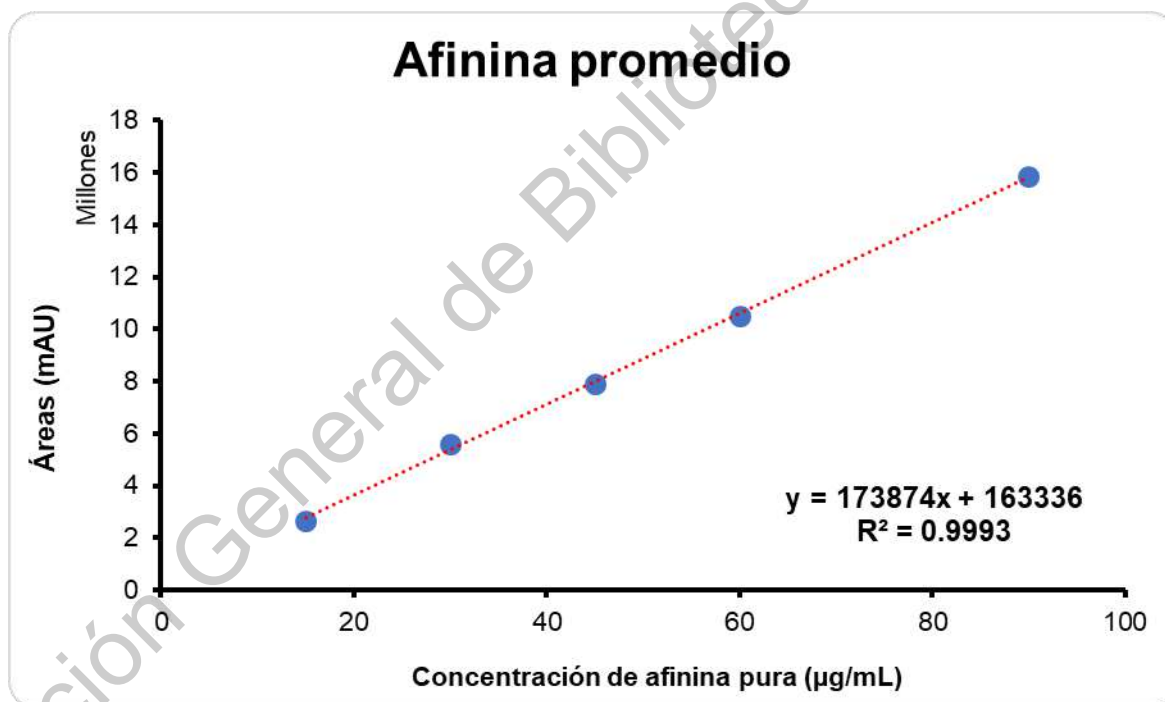
C. Curva patrón de albúmina de suero bovino

<b>Albúmina de suero bovino</b> <b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Absorbancia</b> <b>(<math>\lambda_{595\text{nm}}</math>)</b>
0	0
0.2	0.108 $\pm$ 0.006
0.4	0.231 $\pm$ 0.037
0.6	0.318 $\pm$ 0.020
0.8	0.396 $\pm$ 0.024
1	0.519 $\pm$ 0.048



D. Linealidad del sistema para la cuantificación de afinina

Afinina pura Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	HPLC Áreas (mAU)
15	2676348
30	5597194
45	7907247.667
60	10518898
75	13203886
90	15846779.67



#### **ANEXO 4** Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs)

El Comité de Expertos sobre Especificaciones para Productos Farmacéuticos de la OMS adoptó en 1999 las guías tituladas Buenas prácticas para laboratorios nacionales de control farmacéutico de la OMS, que fueron publicadas como Anexo 3 de la Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 902, 2002. El cumplimiento de las recomendaciones previstas en estas guías ayudará a promover la armonización internacional de prácticas de laboratorio y facilitará la cooperación entre laboratorios y el reconocimiento mutuo de los resultados.

Para el uso adecuado del laboratorio es necesario considerar las siguientes condiciones de trabajo experimental: es obligatorio el uso de bata en el laboratorio para la realización de análisis genómicos y manejo de reactivos, así como el uso de guantes y gafas de seguridad durante el experimento; los residuos generados se deben disponer de acuerdo a su grado de toxicidad en los recipientes adecuados y posteriormente confinados; anotar en bitácora el uso de los equipos y la fecha en la cual se utilizaron; mantener limpia el área de trabajo (OMS-BPL, 2016).

#### **ANEXO 5** Disposición de residuos

Durante la realización del proyecto se realizarán pruebas químicas para la determinación de afinina, presentes en extracto de raíces de *H. longipes* y análisis genómico que se expresan en diferentes estadios fenológicos de la planta con la aplicación de Factores Modificadores del Metabolismo (Peróxido de hidrógeno, Ácido salicílico y Quitosan) en el laboratorio de biología molecular a cargo del Dr. Ramón G. Guevara González, se cuenta con medidas de seguridad y de almacenamiento de desechos químicos peligrosos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-083-SEMARNAT-2003.

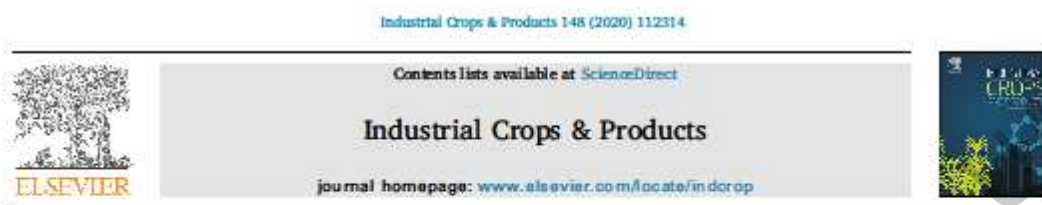
Todos los desechos son recuperados en frascos previamente rotulados y adecuados para la recolección de sustancias tóxicas, posteriormente son confinados (RESIDUOS, 2016).

## **ANEXO 6 Recursos Humanos**

Para la elaboración de esta investigación se contará con el apoyo del personal del Invernadero a bajo la supervisión del Ing. Daniel Arriaga estudiante de la Maestría en Ciencias de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería del Campus Amazcala, y del laboratorio de Biología Molecular a cargo del Dr. Ramón G. Guevara González.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## ANEXO 7 Artículos como Primer autor



### Changes in affinin contents in *Heliopsis longipes* (chilcuague) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions

Ixchel Parola-Contreras<sup>a</sup>, Erik G. Tovar-Perez<sup>a,c</sup>, Alejandra Rojas-Molina<sup>b</sup>,  
Francisco J. Luna-Vazquez<sup>b</sup>, Irineo Torres-Pacheco<sup>a</sup>, Rosalia V. Ocampo-Velazquez<sup>a</sup>,  
Ramon G. Guevara-González<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biocistema Engineering Group, School of Engineering, Autonomous University of Querétaro, Campus Amacualco, Carr. Chichimoguilas-Amacualco Km 1.5/N Amacualco, El Marqués, Querétaro, C.P. 76265, México

<sup>b</sup> Laboratorio de Investigación Química y Farmacología De Productos Naturales, Facultad De Química, Universidad Autónoma De Querétaro, Cerro De Las Campanas S/N, C.P. 76010 Querétaro, Querétaro, México

<sup>c</sup> CONACYT-Autonomous University of Querétaro, School of Engineering - Campus Amacualco, El Marqués, Querétaro, México

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Secondary metabolites  
Affinin  
Elicitation  
Enzyme activity

#### ABSTRACT

*Heliopsis longipes* (*H. longipes*) is an endemic plant of the Sierra Gorda, Mexico, whose root crude extract is used as an analgesic, anti-inflammatory and anti-ulcerative. Affinin is the main substance that provides these properties. Affinin concentrations have been seen to vary depending on the time of the year in which it is collected. Controlled cultivation of *H. longipes* may reduce the synthesis of affinin but using elicitation technique it might be possible to increase and standardize the biosynthesis of this specialized metabolite. The aim of this research was to determine the changes in the affinin contents in *H. longipes* roots after controlled elicitation using salicylic acid and hydrogen peroxide as elicitors under greenhouse conditions. After a period of acclimation of 150 days for chilcuague plants, both elicitors were foliarly sprayed for two weeks. Besides affinin contents, changes on the biomass production, catalase, superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase and valine decarboxylase enzymatic activities in *H. longipes* were evaluated. The results showed that low doses of both elicitors significantly increased affinin contents in roots in comparison with controls without affecting morphological variables. This increase in affinin was correlated with concomitant increases in enzymatic activities related to stress responses as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), as well as the increase in valine decarboxylase activity (VDC), an enzyme related with biosynthesis of aliphatic alkaloids as affinin. Thus, controlled elicitation might be an interesting strategy to increase affinin contents in chilcuague cultivated under greenhouse conditions.

#### 1. Introduction

*Heliopsis longipes* is an endemic plant from Sierra Gorda in Central Mexico used in alternative medicine. *H. longipes* is commonly known as chilcuague, golden root, pelitre, and Artec root (Cilia-López et al., 2014). The roots of this species are consumed as culinary condiment and flavouring alcoholic beverages, and also are used to health toothache, respiratory diseases and muscular aches (Ríos, 2012). The leaves of *H. longipes* are rich in sterols, terpenes and flavonoids and in the roots are sugars, flavonoids, terpenes and alkaloids (García-Chávez et al., 2004). One of these alkaloids is affinin, that is synthesized in the roots, and displays properties as analgesic, antimutagenic, anaesthetic, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antinociceptive, arthritic and

vasodilator (Arriaga-alba et al., 2013; Castro-Ruiz et al., 2017; Escobedo-Martínez et al., 2017). Affinin has also shown biological activities such as antimicrobial, bacteriostatic, fungicide and larvicide (Hernández Morales et al., 2015; Molina-Torres et al., 2004; Salgado-Garciglia et al., 2008).

The extraction of this compound involves collecting the wild plant material in huge quantities thus reducing their native population (Aguilar et al., 2016; Castro-Ruiz et al., 2017). Wild medicinal plants have a wide genetic diversity useful for developing more productive, nutritious and disease resistant crops. However, the conservation status of wild plants in their environment and their availability for their pharmacological, construction, nutritional, culinary, industrial and medicinal uses are still under development (Lubbe and Verpoorte,

\* Corresponding author.

E-mail address: ramon.guevam@uaq.mx (R.G. Guevara-González).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112314>

Received 24 September 2019; Received in revised form 26 January 2020; Accepted 5 March 2020  
0926-6690/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

2011). To safeguard the genetic diversity of wild species as *H. longepedunculata* in their natural habitat, strategies such as sustainable crops in greenhouses that can provide biomass and quality in specialized metabolites should be evaluated (Barrón et al., 2016; Jaramel et al., 2016).

Controlled elicitation is a method that uses hormones in a dose and periodic applications to raise phytochemical contents without negative effects on plant performance (Vazquez-Hernandez et al., 2019a). An activator is a stress factor of biological (also called "elicitor"), physical or chemical nature that in adequate dose, triggers the immune system of the plant (Vazquez-Hernandez et al., 2019a). Controlled elicitation using salicylic acid and hydrogen peroxide has been applied in several plant species to increase specialized metabolites demonstrating effectiveness in vivo and in vitro (Arriga-Medici et al., 2017; Ávila-Jafar et al., 2017; Cardenas-Monroy et al., 2016; Mejía-Yanamoto et al., 2013; Vazquez-Hernandez et al., 2016; Vazquez-Hernandez et al., 2019b). Thus, the aim of this research was to determine the changes in the effluents systems in *H. longepedunculata* after controlled elicitation using salicylic acid and hydrogen peroxide as elicitors under greenhouse conditions.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and growth conditions

Wild plants of *H. longepedunculata* were collected in Xichú, Guanajuato (Central Mexico). *H. longepedunculata* is growing in the undergrowth of *Quercus Fries* forest, at an altitude of 1284 m above sea level located in "Wanahu de Delicias" of the municipality of Xichú, Gto., Mexico. The climate recorded in this area is temperate, temperate sub-humid with rains in summer, the average annual temperature is 18–20 °C, and 608–820 mm of annual average rainfall. The lithology in the soil where chitocarpous plants were collected is mainly igneous (71.48%), and sedimentary (28.52%), with soil type lithic, ferralic and luvic, moderately acidic and rich in organic matter (a layer of leaf litter 18–40 cm deep) according to a previous report (Siles-López et al., 2014).

The biological material was placed in plastic bags of 50 kg with peat moss, compost and perlite (1:2:1). After transplant, the seedlings were kept in a greenhouse of 16 m<sup>2</sup> for five months for acclimatization; plants with homogeneous height were used. Weather conditions during acclimation and experimentations were 28 °C, photoperiod of 14 h light/10 h dark and relative humidity of 43%. Plants were watered with the Steiner nutritive solution at 80% (Mejía-Yanamoto et al., 2013). Plant morphological variables determined were basal stem width (W) in mm (measured with digital Vernier Multimeter Abometric), stem height (H) in mm (measured with a graduated ruler) and root length (L) in mm (measured with a graduated ruler) (See Fig. 1 for a timeline visualization of the experimentation carried out in this study).

### 2.2. Elicitation treatments

After an acclimatization period of 180 days within a greenhouse (Fig. 1), the elicitors SA (5 mM and 10 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 mM and 400 mM) were foliarly applied by spraying to drop water onto the plants. The application of both elicitors was carried out weekly, for 2 weeks. The control plants were treated with distilled water (Vazquez-Hernandez et al., 2019b). The concentrations of the elicitors evaluated were 5 and 10 mM for salicylic acid SA (J. T. Baker), and 200 mM and 400 mM for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chelone Biol) (Mejía-Yanamoto et al., 2013; Vazquez-Hernandez et al., 2019b). Both elicitors were applied at day 150 and 157 after transplanting (Fig. 1). Plant samples (leaves, stems and roots) were collected 2 h post-elicitation in each case and immediately frozen in liquid nitrogen and storage at -80 °C until further analysis (Mejía-Yanamoto et al., 2013).

### 2.3. Enzyme activity assays

#### 2.3.1. Sample preparation for enzymatic assays

The *H. longepedunculata* root dried samples (0.3 g) from individual plants were homogenized with 1 mL of cold extraction buffer and the slurry was centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C. The supernatants were used to determine the enzyme activities. Protein concentration in enzymatic extracts was determined according to the method reported by Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

#### 2.3.2. Superoxide dismutase (SOD) activity assay

The activity of superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assessed spectrophotometrically by the inhibition of the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) according to the method described by Hays et al. (2018). The reaction was carried out by adding 1.5 mL 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.3 mL 0.1 mM EDTA, 0.3 mL 0.18 M methionine, 0.3 mL 0.75 mM NBT, 0.3 mL 0.01 mM riboflavin, 0.05 mL enzymatic extract and 0.25 mL distilled water. The mixture was exposed to fluorescent light (85.86 μmol/m<sup>2</sup>s) for 20 min. Subsequently, the solution absorbance was measured at 560 nm. One unit of SOD inhibits reduction of NBT by 50% at pH 7.8 and 25 °C. The SOD activity was expressed as U/mg protein.

#### 2.3.3. Catalase (CAT) activity assay

The activity of catalase (CAT; EC 1.11.1.6) was assessed spectrophotometrically by measuring the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decrease at 240 nm according to the method described by Alfaro and Cien (2014). The reaction was carried out by adding 950 μL 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0), 80 μL enzymatic extract and 100 μL 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The change in absorbance at 240 nm was measured for 1 min and used to

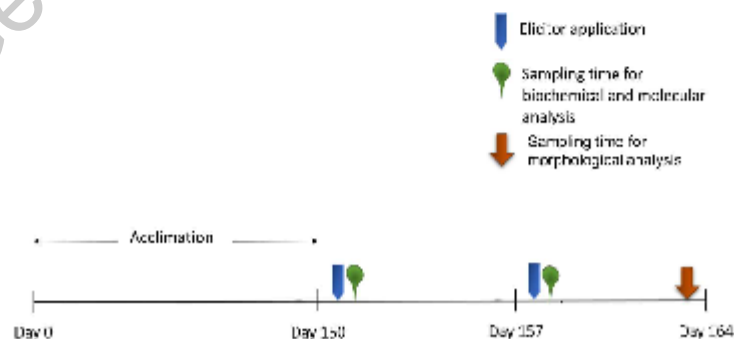


Fig. 1. Time line of the experiment carried out during this research.

**Table 1**  
Effect of salinities on morphological variables in *H. longipes* cultivated during 164 days after transplanting under greenhouse conditions.

Treatment	W <sup>a</sup> (mm)	L <sup>b</sup> (mm)	L <sup>c</sup> (mm)
Control	0.807 ± 0.04 <sup>a</sup>	75.90 ± 08.0 <sup>a</sup>	191.44 ± 1.7 <sup>a</sup>
200 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.837 ± 0.14 <sup>a</sup>	66.38 ± 20.0 <sup>a</sup>	79.694 ± 6.6 <sup>a</sup>
400 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.837 ± 0.03 <sup>a</sup>	37.38 ± 0.8 <sup>b</sup>	36.088 ± 7.9 <sup>b</sup>
5 mM SA	0.698 ± 0.03 <sup>b</sup>	59.53 ± 39.1 <sup>a</sup>	191.78 ± 1.1 <sup>a</sup>
10 mM SA	0.403 ± 0.05 <sup>c</sup>	30.06 ± 20.1 <sup>b</sup>	17.648 ± 0.2 <sup>b</sup>

Different letters in each column means significant differences according to the ANOVA with Tukey's multiple comparisons test ( $P = 0.05$ ).

<sup>a</sup> Width width.

<sup>b</sup> Ht plant height.

<sup>c</sup> Lt root length.

describe the rate of decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by CAT. One unit of CAT decomposes 1  $\mu$ mol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per min at pH 6.0 and 25 °C. The CAT activity was expressed as U/mg protein.

#### 2.3.4. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity

The activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) was assayed spectrophotometrically according to the method described by Tascano et al. (2018) with slight modifications. L-Phenylalanine was used as the substrate, and the released cinnamic acid was quantified by absorbance at 290 nm. The reaction by adding 250  $\mu$ l 0.1 M borate buffer (pH 8.8 containing 10 mM L-phenylalanine) and 20  $\mu$ l enzymatic extract was carried out. The mixture was incubated at 40 °C for 1 h and the reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ l 1 N HCl. Subsequently, the solution absorbance was measured at 290 nm. One unit of PAL release 1  $\mu$ mol of cinnamic acid per min at pH 8.8 and 40 °C. The PAL activity was expressed as U/mg protein.

#### 2.3.5. Valine decarboxylase (VDC) activity assay

The activity of valine decarboxylase (VDC; EC 4.1.1.14) was assayed spectrophotometrically according to the method described by Carim-Espinoza et al. (2011). L-Valine was used as the substrate, and the released isobutyramine was quantified by absorbance at 450 nm. The reaction was carried out by adding 200  $\mu$ l 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8 containing 1 mM pyridoxal phosphate and 20 mM L-valine) and 40  $\mu$ l enzymatic extract. The mixture was incubated at 42 °C for 1 h and the reaction was stopped by the addition of 18  $\mu$ l acetone. Subsequently, the solution absorbance was measured at 450 nm. One unit of VDC release 1  $\mu$ mol of isobutyramine per min at pH 7.8 and 42 °C. The VDC activity was expressed as U/mg protein.

#### 2.4. Sample processing for affinin determinations

The *H. longipes* root extracts for affinin determinations were prepared as follows: root samples from individual plants were freeze-drying for three days, ground to a fine powder homogenized. Sample (10 mg) was macerated with 1 mL ethanol (reagent grade), sonicated for 15 min, centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C and removed the supernatant. The extracts were concentrated in a Savant SpeedVac<sup>®</sup> at 4 °C for two days. Finally, the samples were resuspended in 1 mL ethanol (HPLC grade), the solutions were filtered in a syringe of 0.45  $\mu$ m pore mesh and 85  $\mu$ m diameter (Agilent Technologies) (Aguilar et al., 2019; Wu et al., 2019).

#### 2. Quantification of affinin in *H. longipes* extracts by HPLC-DAD

A standardized method developed in our lab was used for the quantification of affinin. This analysis was performed using a Waters HPLC system (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), composed of a 600E mobile solvent delivery system and a 2996 PDA detector. The column used was SHERAK HILICPER XHR-2H

(4.5 × 150 mm, 5  $\mu$ m particle size, 120 Å pore size). An isocratic system was achieved where mobile phase composition was 80 % of 1% acetic acid in HPLC-grade water and 20 % HPLC-grade acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min. The injection volume was 20  $\mu$ l, and the total analysis time was 8.5 min. Affinin content was obtained using a calibration curve of pure affinin (15–90  $\mu$ g/mL). Five points were obtained, each one corresponding to the mean of three replicates. The areas under the curves (A) obtained for each point were plotted versus the respective concentrations used (C) and a linear correlation established as  $Y = aX + b$  (Wu et al., 2019; Aguilar et al., 2019).

#### 2.1. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism 6.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA). A completely randomized experimental design was used to evaluate the effect of the foliar application of both salinities on affinin content and morphological and enzymatic activities studies. The arrangement of the experiment was 5 treatments with an experimental unit of 12 plants for triplicate. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the differences between means were compared using Tukey's multiple comparisons test ( $P = 0.05$ ).

#### 4. Results and discussion

##### 4.1. Effect of salinities on plant morphology

After two weeks of salinities (day 164 according to Fig. 1), *H. longipes* leafy plants were evaluated in morphological variables (Table 1). In regards to stem width and root length, a significant increase was observed with 10 mM SA (1.46-fold); the rest of the treatments did not show differences with control. Moreover, no significant changes were observed for plant height with all the treatments evaluated in comparison with control (Table 1). Additionally, on one hand, the typical morphological aspect of *H. longipes* after salinities at day 164 after transplanting showed that treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 400 mM, caused a significant reduction in plant performance (31-fold in comparison with control); on the other hand, SA 10 mM displayed a significant increase of (1.82-fold) in root length and (2.8-fold) in plant performance (Fig. 2 and Table 1). These results suggest that treatment with SA 10 mM displayed a significant improvement in morphological variables and plant performance (similar to biocontrol activity) under the conditions evaluated in this study for *H. longipes* plants. To our knowledge, these data are the first obtained about the effects of controlled salinities strategies on performance of *H. longipes* under greenhouse conditions. In similar studies using SA or salinity in other plant species, Gerri et al. (2016) found a significant increase in biomass accumulation in *Achillea millefolium* L. plants at 0.5 mM SA. Also, exogenous applications of SA at (0.25, 0.5 and 1 mM) resulted in biomass accumulation in marigold plants (*Tagetes officinalis* L.) (Pacheco et al., 2015). Likewise, it had been suggested that exogenous applications of SA influenced growth plant over photosynthesis, altering water relations, stomatal regulation and nutrient uptake (Wu et al., 2011). Moreover, it is likely that SA it is inducing changes in the balance of phytohormones (e.g. gibberellins, auxins, etc) within chilean plants permitting the biocontrol phenotype observed, in similar way as suggested in recent reports (Vasquez-Hernandez et al., 2019).

##### 4.2. Effect of salinities on enzyme activity of SOD, CAT, PAL and VDC

Enzymes such as SA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> might increase catalytic enzymes involved in plant defense against stress (POD, CAT, SOD, PAL) (Chen and Vankar, 2012; Wu et al., 2011). The enzymatic measurement of the 5 mM SA and 400 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations were omitted from the study since 5 mM SA had no better responses in *H. longipes* in comparison with 10 mM SA treatment, and 400 mM significantly



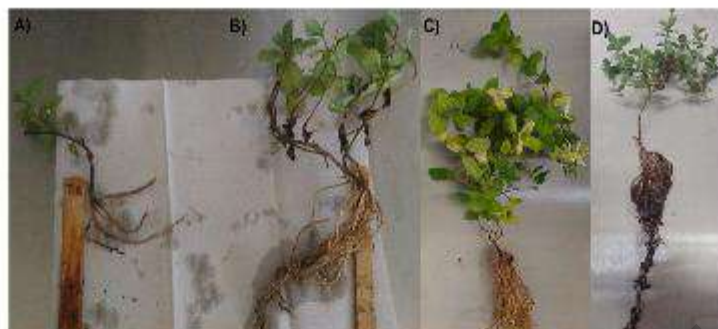


Fig. 3. Typical morphological aspect at day 164 post-transplanting of *H. longipes* treated with  $H_2O_2$  and SA. A) 200 mM  $H_2O_2$ , B) 200 mM  $H_2O_2$ , C) 10 mM SA and D) Control (distilled water).

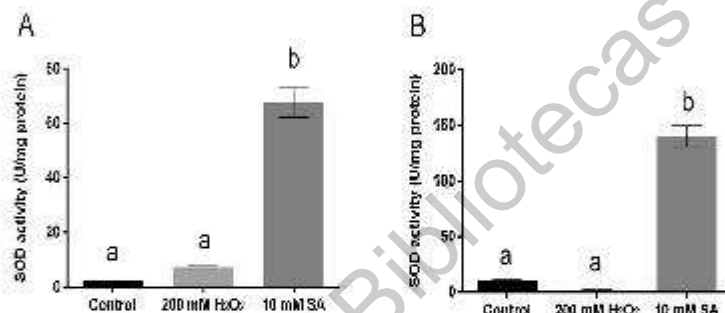


Fig. 3. Superoxide dismutase (SOD) specific activity in *H. longipes* as a result of two applications of  $H_2O_2$  200 mM and 10 mM SA: A) First application (day 150), B) Second application after eight days (day 157). Different letters indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test ( $P = 0.05$ ).

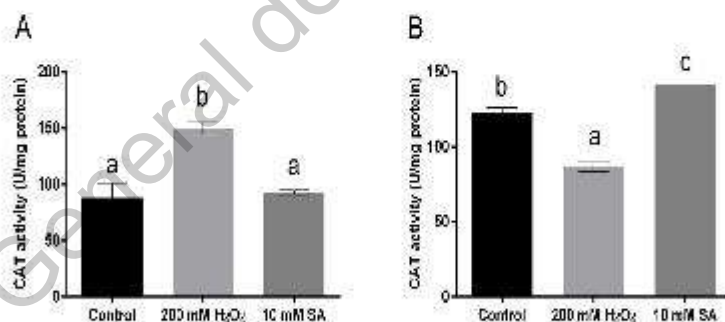


Fig. 4. Catalase (CAT) specific activity in *H. longipes* as a result of two applications of  $H_2O_2$  200 mM and 10 mM SA: A) First application (day 150), B) Second application (day 157). Different letters indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test ( $P = 0.05$ ).

affected in a negative manner the morphology and biomass of the plant in the leaf area and in the root length (Table 1 and Fig. 3). In general, the results displayed that both 10 mM SA and  $H_2O_2$  200 mM treatments increased the enzyme activities of SOD, PAL, CAT and VDC in comparison with controls depending on the time in which the elicitation was carried out (Figs. 3–5). Significant high activity of SOD was observed in *H. longipes* plants treated with 10 mM SA (98.37-fold) in the first (day 150) and second (day 157) applications (12.83-fold), but not when using  $H_2O_2$  200 mM (Fig. 3). During their growth plants are in

balance of antioxidants and pro-oxidants, any disruption may trigger oxidative stress leading destruction at cellular levels (Caldley et al., 2016). SOD is the most important enzyme against reactive oxygen species (ROS), its function is disrupting the superoxide radical ( $O_2^-$ ) into  $H_2O_2$  and  $O_2$  (Elsomidou-Savva et al., 2018). A possible explanation might be that the plant blocked the SOD enzyme by detecting exogenous  $H_2O_2$  in both applications as suggested Trinc et al. (1994). They used tobacco (*Nicotiana glauca* L. cv. MAQ2.4) and seedlings were grown in vitro. Hydrogen peroxide was added at 10 mM, and

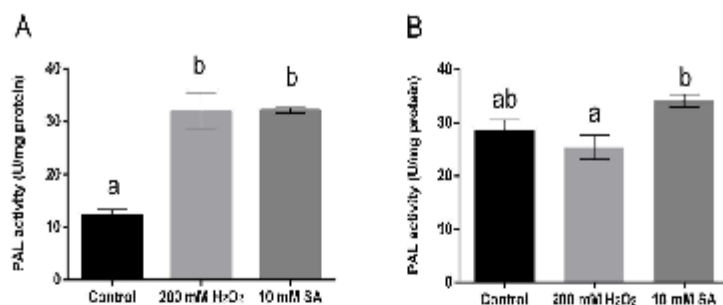


Fig. 5. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) specific activity in *H. longepedunculata* as a result of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM and 10 mM SA: A) First application (day 160), B) Second application (day 187). Different letters indicates significant differences according to ANOVA and Tukey's test ( $P = 0.05$ ).

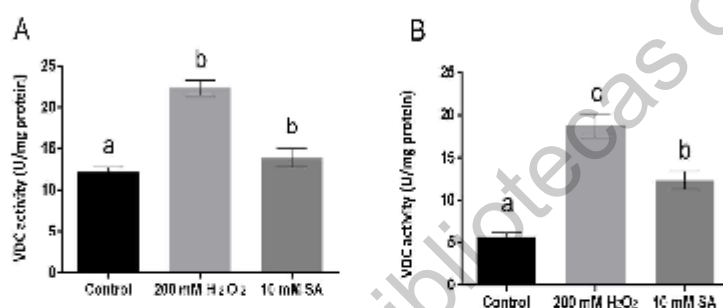


Fig. 6. Volatile decarboxylase (VDC) specific activity in *H. longepedunculata* as a result of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM and 10 mM SA: A) First application (day 150), B) Second application (day 167). Different letters indicates significant differences according to ANOVA and Tukey's test ( $P = 0.05$ ).

they observed a 48 and 67 % reduction in SOD activity after 1 h and 4 h, also it was observed that exogenous application of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced [O<sub>2</sub><sup>•-</sup>]<sub>cyt</sub> mobilization, that might inhibit the SOD activity (Ojeda et al., 1994). Based on the present work and the studies on rice (Ojeda et al., 2010), maize (*Zea mays* L. cv. Tuxtepán 1) and mung bean (*Vigna radiata* (Linn.) Wilczek sub 1) on the inhibition of SOD activity by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 1–15 mM, the variation of this phenomenon depended on the organs, plant age, species and likely the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> used in the experiments (Chang and King, 2006).

The behaviour of CAT activity is shown in Fig. 4. CAT activity was significantly increased at 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the first application (day 150). After the second application, CAT increased significantly in 10 mM SA and significantly diminished in 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 3). Koc et al. (2018) did not find CAT enzymatic activity in some of the extracts evaluated in *C. coronata*, *C. coronata*, *C. arvensis*, and *C. rotundifolia* wild belonging to Asteraceae family. These differences may be due to the plants were wild, and did not receive additional stress, which is native that CAT enzyme did not present activity (Caprioli et al., 2017). CAT converts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub>, also it has been studied CAT as the essential enzyme used for the elimination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within the cells. CAT enzyme decreases oxidative stress, its activity depends on period time or the high dose of the exposure to stress as well as plant age (Bismak et al., 2017). Otherwise, Mujib-Tamanda et al. (2018) found that CAT activity rose with elicitation, its activity was directly proportional to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by elicitation in chili pepper. Moreover, that study also showed that chili peppers displayed high CAT activity 4 h after application with 0.1 mM SA and 8 h after application with 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In a second application, CAT activity was significantly higher 1 d after at 6.7- and 10-mM SA, and at 1.4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *C. annua* L. var. Don Juan. These results agree with some of the responses obtained in the present

work with *H. longepedunculata*, strongly suggesting that plant age is important in order to be responsive to an elicitation treatment, and also this response seems to be dependent on the elicitor. In some cases when plants had low CAT activity and the protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was compromised, plants activate another enzyme that also break down H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presence of ascorbic acid and phenolic compounds or peroxidase (POD) activity to overcome the situation (Bismak et al., 2017).

PAL is a crucial enzyme of phenylpropanoid metabolism, up-regulation of this activity correlated with the increase of phenylpropanoids such as one of the main biochemical aspect of plant defense against environmental stresses (Mujib-Tamanda et al., 2018). The effect of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM and SA 10 mM on *H. longepedunculata* is shown in the Fig. 5. Significant increase in PAL activity was observed in the first application with 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10 mM SA, whereas in the second application significant differences were detected only with 10 mM SA (Fig. 5). Mujib-Tamanda et al. (2018) found significant increment after the application of elicitors SA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and chitosan (CH) and five days later found the higher increment of PAL activity. Taking together these results regarding the enzyme activities evaluated related to plant stress responses, suggest that the response will depend on the elicitor used, as well as the plant age under the conditions studied in the present work.

VDC activity in *H. longepedunculata* after elicitation is shown in Fig. 6. On one hand, the first application induced significant VDC activity at 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10 mM SA in comparison with control (Fig. 6A). On the other hand, in the second application a similar result was displayed showing significant increases in both elicitation treatments in comparison with control (Fig. 6B). Controlled elicitation increased in all of the treatments evaluated the VDC activity (Fig. 6). The reason to evaluate effects of controlled elicitation on VDC in *H. longepedunculata* in this work was based on the fact that, it has been suggested that VDC activity might be a key

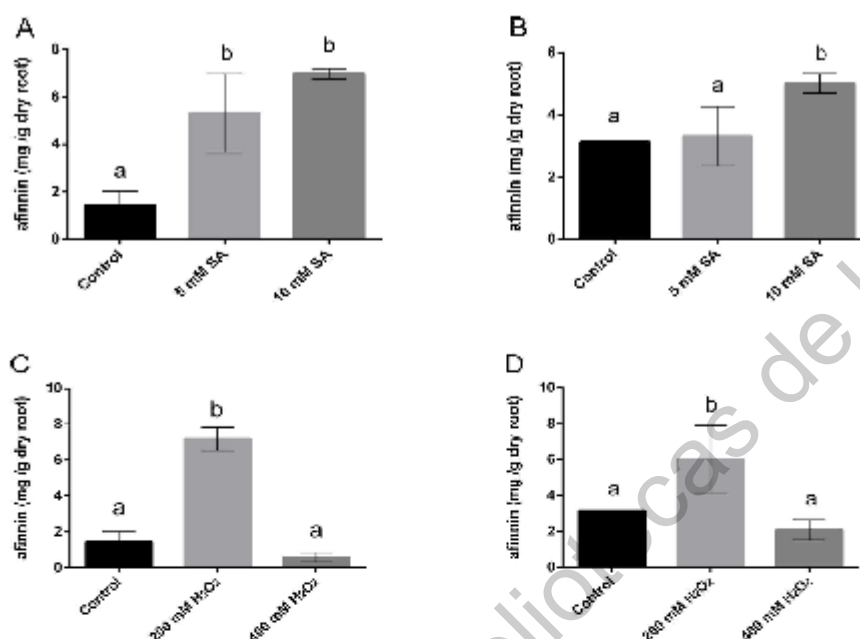


Fig. 7. Affinin contents in *Helipetal longipes* treated with  $H_2CO_3$  or SA at day 150 (panels A and C) or day 157 (panels B and D). Different letters indicate significant differences according to ANOVA and Tukey's test ( $P = 0.05$ ).

enzyme in the channeling of the pathway of synthesis of aliphatic alkaloids such as affinin (Cortés-Hipólito et al., 2011). Thus, whether a stress factor (salinity/nutrient) increases VDC activity, it would be probable that also an increase in affinin contents might be detected within the plants.

#### 4.3. Concentration of affinin in *H. longipes*

In this study, it was observed that affinin concentrations increased significantly with treatments 10 mM SA and 200 mM  $H_2CO_3$  in comparison with control root plants in both the first and second applications (Fig. 7). These results completely agree with the hypothesis of rise in VDC activity also increment the affinin concentration as suggested by the association of Cortés-Hipólito et al. (2011) regarding that VDC is a key enzyme channeling the biosynthesis of aliphatic alkaloids as affinin. Thus, this is the first experimental demonstration that the VDC activity might be directly related with affinin contents in roots of *H. longipes*. This result also indicates the possibility of using VDC activity as biochemical indicator of affinin contents in *H. longipes* roots. More detailed studies throughout the whole plant cycle using controlled salination or not, should be carried out in order to verify this association.

#### 5. Conclusions

Based on the aforementioned results, controlled salination using SA 10 mM or  $H_2CO_3$  200 mM applied as showed in this study are constructive doses of these elicitors for increasing affinin contents in *H. longipes* grown under the greenhouse conditions evaluated in the present work. Controlled salination strategy might increase the industrial potential of *H. longipes* as well as might serve to protect this species of possible extinction based on traditional exploitation for industrial purposes.

#### Credit author statement

Iris Ferrás-Cabrera: Methodology and conceptualization. Jeff G. Torres-Fernán: Methodology and checking the manuscript. Alejandro Rojas-Molina: Methodology and checking the manuscript. Francisco J. Lora-Yanguas: Methodology in affinin contents. Inés Torres-Facheco: Conceptualization and checking the manuscript. María V. Quintana-Valderrama: Methodology and checking the manuscript. Ramón G. Quaveira-Sernaflor: Conceptualization, checking, writing and editing the manuscript.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

We would like to acknowledge to Dr. Fernando García Trujillo, M.C. Cristina Vázquez, M.C. Oliver Haring for their critical reading of the manuscript. Moreover, authors agree to CONACYT for the retributions granted. Additionally, authors thank to SEP-CUNACYT (200259) for partially support this research. J.F.-C. also acknowledges to CONACYT for grant support for PhD studies.

#### References

- Miyoshi, M., Chen, H.J., 2014. Catalase activity is correlated by oxidant and antioxidant in detached mature leaves of sweet potato. *J. Plant Physiol.* 171, 46–57. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.008>.
- Agüero, M.J., Carilla, R.R., Álvarez-More, C., Torres-Fer, J., Cortés-Hipólito, R., 2014. M.T., 2014. HPLC Determination of the Alkaloid Affinin in Tuber and Dry Root of





PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF METHANOLIC EXTRACTS FROM LEAVES AND FLOWERS OF CHILCUIAGUE (*HELIOPSIS LONGIPES*, ASTERACEAE)  
COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE HOJAS Y FLORES DE CHILCUIAGUE (*HELIOPSIS LONGIPES*, ASTERACEAE)

MICHEL PAROLA-CONTRERAS<sup>1</sup>, RAMÓN G. GUERRA-GONZÁLEZ<sup>2</sup>, ANA A. FERRERINO-PÉREZ<sup>3</sup>, ROSALÍA REYNOSO-CAMACHO<sup>3</sup>, IZA F. PÉREZ-RAMÍREZ<sup>3</sup>, ROSALÍA V. OCMPO-VELÁZQUEZ<sup>3</sup>, ALEJANDRA ROMA-MOLINA<sup>4</sup>, FRANCISCO LUNA-VAZQUEZ<sup>4</sup>, ENRIQ. G. TOMAR-PÉREZ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amozoc, El Merqués, Querétaro, México

<sup>2</sup>Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Querétaro, México

<sup>3</sup>CONACYT-Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Campus Amozoc, El Merqués, Querétaro, México

\*Author for correspondence: [mlparola@uaq.mx](mailto:mlparola@uaq.mx)

Abstract

**Background:** *Helioopsis longipes* root is the widely used organ from the plant due to its culinary and medicinal importance. Nevertheless, during its collection the foliage is discarded. Therefore, it is required to perform studies about the phytochemical content with biological activity present in the different plant organs of the foliage, for a better exploitation of the plant.

**Hypothesis:** The concentration of phenolic compounds with antioxidant activity varies according to the type of plant organ and the geographic location of the plant collection.

**Study species:** *Helioopsis longipes*

**Site and years of study:** The *H. longipes* plants were collected in three locations (Cuicatlan, San Juan Buenavista and Beltrán) from Sierra Gorda of Mexico, between 2017 and 2018.

**Methods:** In this study, they were analyzed the methanolic extracts from *H. longipes* leaves and flowers, in order to determine the content of the phenolic compounds and scavenging of radicals activity (DPPH and ABTS<sup>•+</sup>). Further characterization of the extracts was carried out by chromatography (HPLC).

**Results:** The total content of polyphenols, flavonoids and condensed tannins varied in depending on the type of plant organ and the origin site of *H. longipes*, being the leaves of Beltrán those that represent the best source of phenolic compounds with scavenging activity of the radicals DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>. In the extracts, phenolic acids and flavonoids were identified.

**Conclusions:** The geographical climatic conditions influence the phenolic content and antioxidant activity of the methanolic extracts from leaves and flowers of *H. longipes*.

**Key words:** Asteraceae, free radicals, foliage, phytochemicals, polyphenolic extracts.

Resumen

**Antecedentes:** La raíz de *Helioopsis longipes* es el órgano de la planta que se usa ampliamente debido a su importancia culinaria y medicinal. Sin embargo, durante su recolección el follaje es descartado. Por lo tanto, se requiere realizar estudios acerca del contenido de fitoquímicos con actividad biológica presentes en los distintos órganos vegetales del follaje, para un mejor aprovechamiento de la planta.

**Hipótesis:** La concentración de compuestos fenólicos con actividad antioxidante varía de acuerdo con el tipo de órgano vegetal y la ubicación geográfica de recolección de la planta.

**Especies de estudio:** *Helioopsis longipes*.

**Site y años de estudio:** Las plantas de *H. longipes* se recolectaron en tres localidades (Cuicatlan, San Juan Buenavista y Beltrán) de la Sierra Gorda de México, entre 2017 y 2018.

**Métodos:** En este estudio, se analizaron los extractos metanólicos de hojas y flores de *H. longipes* para determinar el contenido de compuestos fenólicos y la actividad reductora de radicales (DPPH y ABTS<sup>•+</sup>). Adicionalmente, la caracterización de los extractos se realizó mediante cromatografía (HPLC).

**Resultados:** El contenido total de polifenoles, flavonoides y taninos condensados varió en función del tipo de órgano vegetal y sitio de origen de *H. longipes*, siendo las hojas de Beltrán las que representan la mejor fuente de compuestos fenólicos con actividad reductora de radicales DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>•+</sup>. En los extractos, se identificaron ácidos fenólicos y flavonoides.

**Conclusiones:** Las condiciones geográficas climáticas influyen en el contenido fenólico y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de hojas y flores de *H. longipes*.

**Palabras clave:** Asteraceae, radicales libres, follaje, fitoquímicos, extractos polifenólicos.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CCBY-NC) (4.0) International.

<https://doi.org/10.1016/j.bsc.2020.09.021>



Oxidative stress is the process resultant from an imbalance between the generation of free radicals and the antioxidant defenses. This oxidative stress can induce cell damage and trigger physiologic alterations involved in the origin of pathologic processes like aging, inflammation, carcinogenesis, diabetes, neurodegenerative and autoimmune diseases among others (Sindhi *et al.* 2013). In such a way, when the endogenous antioxidant system cannot protect the body against the damage caused by free radicals, it is necessary an external supply of antioxidants (Sarmadi *et al.* 2011). Therefore, the use of natural antioxidants may contribute to the prevention of several diseases and be applied as promising therapeutic agents (Tobona *et al.* 2017).

Plants are an important source of phytochemicals, among which stand out the phenolic compounds (Mayoral *et al.* 2019). These compounds are considered secondary metabolites that are produced as a defense mechanism against an attack to the vegetal tissue, the aggression of pathogens and a stressful environment (unfavorable conditions of light, temperature, pH, among others) (Dias *et al.* 2016). Generally their concentrations depend on the type of organ, the condition of the crops and the stage of development of the plant (García-Mir *et al.* 2015). Likewise, they are largely responsible from the sensory characteristics of the fruit and vegetable products, such as the color, astringency, flavor and aroma (Gómez-Rosario *et al.* 2019). Additionally, it has been demonstrated that the phenolic compounds possess antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant and anticongulant properties (Savarni *et al.* 2018). For the above, the recovery of these phytochemicals from the different tissues or plant organs may generate functional ingredients and/or therapeutic agents with potential application in the design of nutraceuticals, functional foods, cosmetics and phytomedicines (Yu *et al.* 2018).

*Heliopsis longipes* (commonly known as chilacaguan) is a perennial herbaceous plant endemic of Sierra Gorda, comprising regions of the states of Guanajuato, Querétaro and San Luis Potosí in the center of Mexico (García-Chávez *et al.* 2004). This species belongs to the Asteraceae family and is the species with the most economic importance of its genus, as its root is widely used by the traditional Mexican, Central and South American medicine for its anesthetic, analgesic, antitumor, anti-inflammatory and antiparasitic properties; furthermore it is also used as a culinary seasoning and insecticide (Hernández *et al.* 2009). Up to date, the studies realized with extracts obtained from the *H. longipes* root, have demonstrated that the diverse pharmacological effects are due to the presence of a bioactive alkaloid, called affinin (Bacabedo-Martínez *et al.* 2017, Wülfel *et al.* 2019). This diverse traditional uses of the root, as well as the affinin extraction imply the collection of wild plants and the total destruction of the plant, which has

caused the reduction in its native populations (Cilia-López *et al.* 2014). So that in regions of Guanajuato and Querétaro plots are found exclusively dedicated to the *H. longipes* crops (Bacabedo-Martínez *et al.* 2017). Likewise, there is an effort of the government for the establishment of crops of this species in the aforementioned regions (García-Chávez *et al.* 2004). Besides, it has been achieved to establish its crop under greenhouse conditions (Cecilia-Castorena *et al.* 2020). Because the utility of the *H. longipes* plant has been limited to the use of the root as the main raw material, it is necessary to focus studies that show that other organs of the plant can represent an important source of phytochemicals. It is known that the leaves of this species contain sterols, terpenes and flavonoids (Cilia-López *et al.* 2003); however, its bioactivity is still unknown. Therefore, the aim of this study was to determine the total content of polyphenols, flavonoids and tannins of methanolic extracts from leaves and flowers of *H. longipes* collected in different regions of Sierra Gorda and their relationship with the antioxidant effect.

#### Materials and methods

**Plant material.** Wild plants of *H. longipes* with homogeneous height were randomly selected and collected during the spring (April 2017 and May 2018) in three locations of Sierra Gorda, in the center of Mexico: Coaco and San Juan Buenaventura (SJB) located in the municipality of Arroyo Seco of the State of Querétaro and Beltrán located in the municipality of Jilotepec from the State of Guanajuato (Table 1). The voucher specimens were identified and deposited in the Botanical collection of the Herbarium of Querétaro "Jozef Handowski" (QMBX) with catalog numbers 1084, 1114 and 1113 for samples from Coaco, SJB and Beltrán, respectively. Soil samples from the three locations were collected simultaneously with the biological material. The chemical analysis of the soil (Table 2) was performed according to the methods of the Official Mexican Norm (NORMA 2002).

**Preparation of methanolic extracts.** Fifty grams of fresh leaves and flowers of the *H. longipes* plant from each locality were separated (Figure 1). Subsequently, some leaves and flowers of every locality were randomly selected and were crushed in liquid nitrogen. Then, crushed samples of leaves and flowers were macerated with methanol in a 1:10 ratio (w/v). The suspensions were collected in a separator (Beckman M2800-CPX-HB, Beckman, Brea, CA, USA) for 3 h and centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4 °C. The resultant supernatants (soluble phenolic extracts) were decanted methanolic extracts of leaves (LME) and flowers (FME) and stored in vials at 4 °C in dark.

Table 1. Geographic location of the wild plants of *Helipopsis longipes* collected in the Sierra Gorda, Mexico.

Municipality	Location	Longitude	Latitude	Altitude (m asl)	Climate classification	Average annual temperature (°C)
Atlixo	Oaxaca	-99.63 °	21.44 °	560	Warm sub-humid with rains in summer (Aw)	23.8
Atlixo	SJB	-99.47 °	21.35 °	1,400	Hot-warm sub-humid with rains in summer (ACw)	23.3
Xicla	Baltan	-100.88 °	21.27 °	1,394	Warm semi-arid (BSh)	16.8

SJB (San Juan Buenaventura); msl (meters above sea level).

**Total polyphenol content (TPC).** The total polyphenol content (TPC) of LME and FME obtained from each locality was determined spectrophotometrically by the Folin-Ciocalteu method according to [Yamora-Castellanos et al. 2010](#), using gallic acid as standard. Briefly, 140  $\mu$ L of the LME or FME extract (0.5 mg/mL) were mixed with 460  $\mu$ L of distilled water and 250  $\mu$ L of the Folin-Ciocalteu (1 N) reagent. After 5 min, 1,250  $\mu$ L of 20 % (w/v) sodium carbonate were added. The mixture was shaken in the vortex and incubated for 2 h in darkness. The absorbance was measured at 760 nm. The results were expressed as mg equivalent of gallic acid per gram of fresh weight (mg GAE/g).

**Total flavonoid content (TFC).** The total flavonoid content (TFC) of LME and FME obtained from each locality was determined spectrophotometrically according to the method described by [García-Mor et al. 2015](#), using rutin as standard. A 50  $\mu$ L aliquot of the LME or FME extract (0.5 mg/mL) was mixed with 180  $\mu$ L distilled water and 20  $\mu$ L of a 1 % (w/v) 2-aminostyrylphenylborate solution. The absorbance was measured at 404 nm. The results were expressed as mg equivalents of rutin per gram of fresh weight (mg RE/g).

**Condensed tannin content (CTC).** The condensed tannin content (CTC) of LME and FME obtained from each locality was determined spectrophotometrically according to the method described by [Ramos-Lirio et al. 2000](#), using (+)-catechin as standard. Briefly, 30  $\mu$ L of the LME or FME extract (0.5 mg/mL) were mixed with 200  $\mu$ L of

vanillin reagent (0.5 % vanillin, 4 % HCl in methanol). The absorbance was measured at 495 nm. The results were expressed as mg of (+)-catechin equivalents per gram of fresh weight (mg CE/g).

**Determination of antioxidant activity (AOA).** The antioxidant activity (AOA) of LME and FME obtained from each locality was evaluated through the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azobis(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) assays.

**DPPH radical scavenging activity (DRSA).** The DPPH radical scavenging activity (DRSA) of LME and FME was determined according to the method described by [Ramos-Lirio et al. 2011](#). A 20  $\mu$ L aliquot of extract (LME or FME) was added to 200  $\mu$ L of DPPH radical (0.1 mM) in methanol solution. The mixture was shaken vigorously and incubated for 30 min in the darkness at room temperature; the absorbance was measured at 515 nm. Methanol was used instead DPPH for the blank, while distilled water was used instead of extract for the control. The DRSA was calculated through the following equation:

$$DRSA (\%) = [1 - (A_{\text{extract}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (1)$$

where A is the absorbance value at  $\lambda_{\text{max}}$ .

**ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity (ARSA).** The ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity (ARSA) of LME and FME was determined according to the method described by [Ramos-Lirio et al. 2011](#). Initially, the cationic radical

Table 2. Chemical parameters and texture of soil from different collection sites of *Helipopsis longipes*.

Location	Calcium	Potassium	Phosphorus	Magnesium	Sulfur	Electrical conductivity	Organic matter	pH	Soil texture
	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(%)			
Oaxaca	548.3	149.20	5.35	204.37	4.85	0.192	1.93	7.92	Clay
SJB	9278.23	216.83	1.71	172.76	4.21	0.258	3.99	8.35	Clay
Baltan	3219.86	67.73	16.34	276.80	6.58	0.867	1.14	7.65	Loam

SJB (San Juan Buenaventura); CS - Coahuila.

The phenolic composition of each extract was assessed in an Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to a Diode Array Detector (DAD) and a Quadrupole Time-of-Flight (Q-ToF) mass spectrometer (MS) with an electrospray ionization (ESI) interface (Vion IMS, Waters Co). The sample solutions were filtered (0.45 µm) and directly injected into a BEH Angility C18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 µm) at 35 °C. For the chromatographic separation, water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) were used as mobile phase at a flow of 0.5 mL/min. The gradient conditions were 0 % B/0 min, 15 % B/2.5 min, 21 % B/10 min, 90 % B/12 min, 95 % B/13 min, 0 % B/15 min and 0 % B/17 min. The absorbance was measured at 214, 280, 320 and 360 nm. The following commercial standards were used for quantification: chlorogenic acid, caffeic acid, coumaric acid, hydroxybenzoic acid, epigallocatechin, gallic acid, quercetin, rutin and naringenin. Results were expressed as µg/g. The following MS conditions were used: capillary voltage, 2.0 kV; cone voltage, 40 eV; low collision energy, 6 V; high collision energy, 15-45 V; source temperature, 120 °C; cone gas flow, 50 L/h; desolvation gas, N<sub>2</sub> at 450 °C and 800 L/h. Data acquisition was carried out at negative ionization mode (ESI-) within a 100-1,200 Da mass range. Locking-methoxylation solution (50 µg/mL) was used for lock mass correction at 10 µL/min. Identification was carried out by analysis of the exact mass of the pseudomolecular ion (mass error < 5 ppm), isotope distribution, and fragmentation pattern.

**Statistical analysis.** The results were reported as mean ± standard deviations. Significant differences among the collection site and plant organs were determined by variance analysis and Fisher's least significant difference (LSD) tests ( $P < 0.05$ ) using the Statgraphics® Centurion XVI statistical software (StatPoint Technologies Inc., Bedford, MA, USA, 2010).

## Results

**Total phenolic compounds.** Figure 2A represents the TPC of LME and FME obtained from the plants *H. longipes* collected in Conos, SJB and Beltrán. The TPC values varied widely from 17.59 to 98.1 mg GAE/g, observing the highest values in LME (98.1 mg GAE/g) and FME (78.17 mg GAE/g) obtained from the plants of Beltrán. The statistical analysis showed significant differences ( $P < 0.05$ ) between the collection sites and the plant organs, being the extracts coming from Beltrán leaves and flowers, the ones that showed the highest TPC, followed to the extracts coming from plants from the Conos and SJB regions. The obtained values were found in the reported range (17.6-188 mg GAE/g) in leaves and flowers extracts from other species of

*Tricostema* L. (Arbuckle et al. 2016), *Schizogyne sericea* (L.f) DC (Carrillo et al. 2017) and *Viburnum olivaceum* Hermal (Pretti et al. 2018) that belong to the Asteraceae family.

Figure 2B represents the TPC of LME and FME from the different collection sites. The TPC values were found between 0.24-1.16 mg RE/g. It was observed that in the three locations, the LME presented a major flavonoid concentration in comparison to the FME. Furthermore, the TPC was significantly different ( $P < 0.05$ ) in all the extracts, with a similar behavior observed for polyphenols, which is, between the collection sites, the extracts coming from leaves and flowers of the plants of Beltrán, are those that contain the highest flavonoid concentration. These results are similar to the reported (0.02-1.27 mg RE/g) in leaves and flowers of *Viburnum plumbifolium* Jacq. ex Andrews from the family *Orchidaceae* (Andrade-Andrade et al. 2018), as well as some species from the family *Asteraceae* (Jurnal & Arroyo 2018).

On the other hand, the presence of condensed tannins was only observed in LME coming from plants from Conos and Beltrán, with values of  $0.64 \pm 0.05$  mg CE/g and  $1.09 \pm 0.07$  mg CE/g, respectively. In LME of SJB and FME from the three locations, tannins were not detected. In this case, as for polyphenols and flavonoids, the LME coming from Beltrán showed the highest CTC. Furthermore, the CTC values, were found in the reported range (0.02-5 mg CE/g) for leaves and flowers extracts of *Crataegus arvensis* L. (Boschin et al. 2016) and *V. olivaceum* (Pretti et al. 2018) from the family *Asteraceae*, or in extracts of *V. plumbifolium* (Andrade-Andrade et al. 2018).

Therefore, the results indicate that under the methanol extraction conditions, the leaves and flowers of *H. longipes* from Beltrán are those that represent the highest total content of phenolic compounds (polyphenols, flavonoids and tannins).

**AOx of LME and FME.** As shown in Figure 3, all the extracts showed AOx, with values ranging from 32.98 to 48.0 % DRBA. Besides, all the extracts obtained from leaves showed a higher DRBA, obtaining the major percentage in LME of Beltrán. Similarly, the FME from Beltrán showed a DRBA significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the found for the extracts coming from Conos and SJB. These results were similar to the reported in methanolic and ethanolic extracts of other *Asteraceae* genera as *Tricostema* L. (Arbuckle et al. 2016) and *Crataegus* L. (Boschin et al. 2016), as well as in *Asphodelus nervosus* (Meyen et al. 2019) and *Beta vulgaris* (Edriri et al. 2019) belonging to *Liliaceae* and *Amaranthaceae*, respectively. Respect to the total equivalent antioxidant capacity (TEAC-DPPH) of the extracts, values from 368.73 to 545.62 µmol TE/g were obtained (Table 3). These TEAC-DPPH values were higher



Phenolic antioxidant extracts from chiloangus (*H. longipes*)

than those reported for ethanolic and aqueous extracts obtained from aerial parts of *S. sericea* (121-283 µmol TE/g) (Caprioli et al. 2017). It is worth mentioning that a TEAC value higher corresponds to a greater capacity of radical removal.

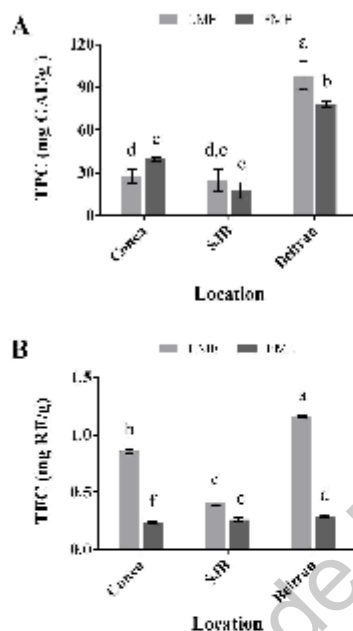


Figure 2. Phenolic compounds content of methanolic extracts from leaves (LME) and flowers (FME) of *Helipate longipes*. (A) Total polyphenol content (TPC, mg GAE/g). (B) Total flavonoid content (TFC, mg RE/g). Results are plotted as mean  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). GAE (Gallic acid equivalents); RE (Rutin equivalents).

Figure 4 shows that all the extracts, as for leaves and flowers exhibited a higher ABSA, reaching values between 88-89 %. Therefore, the values of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC-ABTS) were between 735.83 and 744.79 µmol TE/g (Table 3). These results indicate that LME and FME obtained from the different locations, presented a strong ABSA, which was comparable to the reported for the extracts obtained from the aerial part of *S. sericea* (Caprioli et al. 2017). In general, the methanolic extracts from both leaves and flowers showed free radicals scavenging capacity (DPPH y ABTS<sup>•+</sup>), which indicates that the phenolic compounds present in the extracts confer an antioxidant effect.

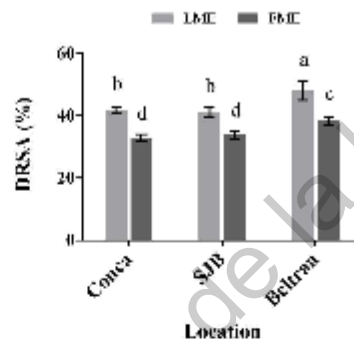
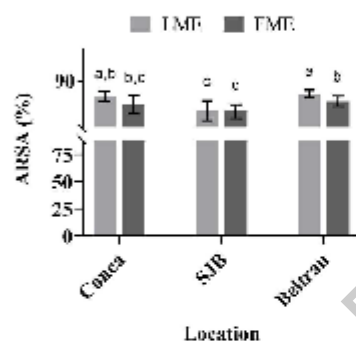


Figure 3. DPPH radical scavenging activity (DRSA, %) of methanolic extracts from leaves (LME) and flowers (FME) of *Helipate longipes*. Results are plotted as mean  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Furthermore, the antioxidant potential of the extracts was determined by their  $EC_{50}$  value, which is a parameter of high significance since it establishes the necessary concentration of an antioxidant compound to achieve 50 % inhibition of the radical activity. In other words, a lower  $EC_{50}$  value indicates a higher antioxidant capacity of the extract. The values of  $EC_{50}$  that were obtained in LME and FME ranges between 741.89 and 1343.55 µg/mL for DPPH assay and between 609.76 and 3389.13 µg/mL for ABTS<sup>•+</sup> assay (Table 3). These  $EC_{50}$  values were similar to those previously found by Freil et al. (2018) when evaluating the antioxidant activity of ethanolic extracts of leaves from *T. abrotanifolia* (Asteraceae), but does not coincide with the findings of Bobiri et al. (2019) and Maroufi et al. (2019) in methanolic extracts of *H. vulgare* (Asteraceae) and *A. microcarpum* (Liliaceae), respectively. As seen in Table 3, the extracts from the Beltrán region had the lowest  $EC_{50}$  values, noticing the same behaviour for both radicals (DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup>). Nevertheless, the  $EC_{50}$  of the reference compound trolox was significantly lower than those obtained in LME and FME of Beltrán, therefore, it requires a higher concentration of extracts *H. longipes* to achieve 50 % elimination of free radicals.

**Characterization by UPLC.** In the chromatographic profiles (UPLC) of LME and FME of *H. longipes* collected in three different regions of the Sierra Gorda, a total of nine phenolic compounds were identified: hydroxybenzoic, chlorogenic, caffeic and coumaric acids, as well as rutin, quercetin, apigenin, genistein and naringenin (supplementary material 1). The type of phenolic compound and its concentration in the extracts are shown in Table 4. In

general, the main compounds identified in LME were hydroxybenzoic acid and chlorogenic acid, highlighting that rutin ( $120.86 \pm 13.29 \mu\text{g/g}$ ) and quercetin ( $24.43 \pm 3.01 \mu\text{g/g}$ ) existed only in the extracts of Betrán and Coesa, respectively. On the other hand, in FME the presence of all the identified compounds was observed, with the exception of rutin in the SJB extracts. Thus, for each extract a particular phenolic composition was obtained, chlorogenic acid is the only compound that exists in all the extracts and the most abundant in Betrán's LME. Similar phenolic compositions have been described by [Hossain et al. \(2016\)](#) and [Cavalioli et al. \(2017\)](#) in extracts obtained from *C. arvensis* and *S. verticillata*, species that belong to the same family of *H. longipes*.



**Figure 4.** ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity (ARSA, %) of methanolic extracts from leaves (LME) and flowers (FME) of *Helipetis longipes*. Results are plotted as mean  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

In the present study, similarities were found in the phenolic compounds content in the extracts (LME and FME) from *H. longipes* with other traditional medicinal plants found in the same botanical family (Asteraceae), as in species from other families such as Amaranthaceae, Liliaceae and Umbelliferae. This last demonstrated that the maceration (assisted by ultrasound) using methanol, is an efficient method in the phenolic compounds extraction, just like it has been documented in the scientific literature ([Goussard et al. 2017](#), [Rodríguez-Méndez et al. 2018](#), [Edairi et al. 2019](#), [Meyroff et al. 2019](#)).

Diverse studies have reported that the phytochemical composition of the plants is influenced by numerous factors as the soil, altitude, environmental conditions of growth, stress (biotic and abiotic), phenological stage, among others ([Prati et al. 2018](#), [Quirós-Sosa et al. 2018](#), [Li et al. 2020](#)). In this study, it was demonstrated that the phenolic compounds content (TPC, TFC and CTC) in the methanolic extracts of *H. longipes* varies considerably among the collection sites (Coesa, SJB and Betrán) and the organ (leaf and flower) of the plant. Based on the results, the greatest content of polyphenols, flavonoids and tannins was observed in LME and FME from Betrán, location found in a different municipality, at a higher altitude and with different climatic conditions, respect to the other locations (Coesa and SJB). In this sense, the plants *H. longipes* from Betrán are exposed to a higher ultraviolet (UV) radiation, lower mean temperature and minor accumulated precipitation, environmental factors that may generate stress in the plants and favor the production of secondary

**Table 3.** TEAC and EC<sub>50</sub> values of methanolic extracts from leaves and flowers of *Helipetis longipes*.

Location	Methanolic extract	DPPH assay		ABTS assay	
		TEAC (μmol TE/g)	EC <sub>50</sub> (μg/mL)	TEAC (μmol TE/g)	EC <sub>50</sub> (μg/mL)
Coesa	LME	430.53 $\pm$ 10.31 <sup>b</sup>	1,343.55 $\pm$ 94.01 <sup>b</sup>	743.71 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	3,389.13 $\pm$ 237.19 <sup>b</sup>
SJB		472.26 $\pm$ 16.19 <sup>b</sup>	949.20 $\pm$ 49.3 <sup>b</sup>	736.28 $\pm$ 5.21 <sup>a</sup>	1,394.57 $\pm$ 17.71 <sup>b</sup>
Betrán		545.63 $\pm$ 51.10 <sup>a</sup>	754.58 $\pm$ 12.15 <sup>a</sup>	744.79 $\pm$ 2.82 <sup>a</sup>	609.76 $\pm$ 9.82 <sup>a</sup>
Coesa	FME	366.75 $\pm$ 11.70 <sup>b</sup>	1,309.21 $\pm$ 59.70 <sup>b</sup>	739.50 $\pm$ 4.39 <sup>a</sup>	1,112.88 $\pm$ 46.17 <sup>b</sup>
SJB		394.52 $\pm$ 12.33 <sup>b</sup>	848.22 $\pm$ 31.39 <sup>b</sup>	733.83 $\pm$ 3.83 <sup>a</sup>	894.31 $\pm$ 66.37 <sup>b</sup>
Betrán		443.77 $\pm$ 13.33 <sup>b</sup>	741.89 $\pm$ 30.78 <sup>b</sup>	741.11 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>	847.29 $\pm$ 38.87 <sup>b</sup>
Reference compound					
Trolox			145.38 $\pm$ 5.81 <sup>a</sup>		116.11 $\pm$ 3.79 <sup>a</sup>

Values are shown as mean  $\pm$  standard deviation.

Means with different superscripts, in the same column, are significantly different ( $P < 0.05$ ).

TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity); EC<sub>50</sub> (sample concentration needed to scavenge 50% of DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals' activity); SJB (San Juan Buenaventura); LME (Leaves methanolic extract); FME (Flowers methanolic extract).

Phenolic antioxidant extracts from chiliungan (*H. longipes*)

Table 4. Phenolic profile of methanolic extracts from leaves and flowers of *H. longipes*.

No.	Compound	Retention time (min)	Methanolic extract					
			LME (µg/g)			FME (µg/g)		
			Concepcion	SJB	Baltiran	Concepcion	SJB	Baltiran
<b>Phenolic acids</b>								
1	Hydroxybenzoic acid	2.48	1,141.91 ± 191.90	418.76 ± 45.18	nd	333.23 ± 36.66	1,489.01 ± 118.37	313.97 ± 43.55
2	Chlorogenic acid	2.68	139.34 ± 14.63	127.82 ± 14.06	508.41 ± 55.37	400.82 ± 51.31	433.08 ± 33.84	177.46 ± 35.49
3	Caffeic acid	4.28	nd	nd	nd	1,764.37 ± 184.88	2,924.86 ± 238.77	97.25 ± 19.41
4	Coumaric acid	4.88	nd	nd	nd	56.73 ± 4.84	32.81 ± 5.78	46.87 ± 9.97
<b>Flavonoids</b>								
5	Rutin	4.64	nd	nd	120.86 ± 13.29	1,354.64 ± 149.81	nd	492.54 ± 72.18
6	Apigenin	7.37	nd	nd	nd	148.58 ± 15.79	104.18 ± 1.79	129.09 ± 12.97
7	Quercetin	7.78	24.45 ± 3.01	nd	nd	371.08 ± 48.82	507.91 ± 1.27	349.33 ± 31.36
8	Quercetin	8.97	nd	nd	nd	44.31 ± 4.87	71.68 ± 1.75	47.61 ± 7.14
9	Flavonoid	10.95	nd	nd	nd	42.66 ± 4.69	30.57 ± 3.47	87.86 ± 4.39

SJB (San Juan Buenaventura), nd – not detected.

metabolites. [Mansch et al. \(2004\)](#) point that the phenolic compounds are secondary metabolites mainly involved in the adaptive response of the plants to the UV radiation. Meanwhile, [Vélez-Hernández et al. \(2019\)](#) describe that the UV radiation, temperature and hydric stress are factors representing an inductor effect on the secondary metabolites of the plants. Additionally, previous studies performed in traditional medicinal plants have reported positive correlations between the decrease in temperature and altitude increase with a major production of phenolic compounds ([Sánchez et al. 2011](#), [Fruel et al. 2018](#)). Therefore, the differences in the environmental factors (altitude, climatic classification and temperature) among the locations of *H. longipes* significantly influenced in the phenolic compounds biosynthesis. It has been documented that some metabolic and physiologic processes of the plants are related with the chemical composition of the soil, nutrient availability and salinity conditions ([Tapia et al. 2019](#)). The soil in the Baltiran location highlighted for its high content of calcium, phosphorus and magnesium, essential compounds in the growth and development regulation of the aerial part of the plant ([Li et al. 2018](#)). Likewise, the soil in this location presented a higher sodium content, which functions as osmotic agent that favors the efficient water absorption ([Bouz et al. 2020](#)). Additionally,

the soil in this location is loam type, different to Concepcion and SJB that is clayey type. [Tapia et al. \(2019\)](#) report that the loam soils favor the water retention in the prolonged periods, facilitating to the plants the nutrient and water absorption, allowing in this manner the good development of this. On the other side, the soil in these locations showed a pH mildly alkaline and low electric conductivity, classifying them as soils with imperceptible effects of salinity. [Zhou et al. \(2020\)](#) describe that high salinity conditions in the soil may cause effects in the growth of the plant due to an imbalance in the nutrient absorption. In this study, the loam type soil with high presence of calcium, phosphorus, magnesium and potassium suggests a positive influence on the phenolic compounds metabolism in *H. longipes*, mainly polyphenols and flavonoids.

As previously mentioned, the LME from *H. longipes* (from the three locations) presented a higher content of phenolic compounds, being the flavonoids and tannins, the compounds that differ the most. These metabolites are usually transported from the roots to the stems and leaves, via xylem or phloem, and store in reproductive structures, such as flowers, so that they can be found in different parts of the plant ([Li et al. 2018](#)). In this context, flavonoids confer color to the leaves and flowers, although they tend to focus mainly in leaves, while the tannins accumulate mainly

in the root, leaves, fruits and seeds (Manach et al. 2004). Studies performed have demonstrated that climatic factors (type of soil, temperature, solar exposition and precipitation) may affect the presence and accumulation of phenolic compounds in the plant organs (Li et al. 2020). The concentration of flavonoids is affected directly for the sun exposition, due to its biosynthesis is coupled to the photosynthesis. It should also be remembered that the polyphenols and flavonoids have an antioxidant function that protects the plant from the presence of free radicals (Dias et al. 2016). On the other hand, both the polyphenols and tannins may contribute in the tissue protection when they are exposed to pathogen, predators and UV radiation, as to favor the tissue healing (Brilke et al. 2013). It is known that the phenolic phytochemicals perform important functions during growth, development and reproduction of the plant (González-Aguilar et al. 2014), in this way before the presence of different types of abiotic stress, its biosynthesis and accumulation is altered in the different plant organs (Vikanes-Heroldsen et al. 2019).

Assays that evaluate the free radicals reduction have been widely used as a first valid and important parameter of potential antioxidant compounds (Borrelli et al. 2011, Brulini et al. 2012). In our study, LME and FMB from *H. longipes* presented AOR through the reduction of DPPH and ABTS<sup>•+</sup> radicals, being the electrons transferred the mechanism by which the phenolic compounds present in the extracts neutralize the free radicals. Naba et al. (2019) describe that free radicals are continuously produced through biochemical reactions, which occur as a part of aerobic cellular metabolism and are associated with the formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). An excessive amount of these radicals leads to oxidative damage of lipids, proteins and DNA, causing oxidative stress. In the human body, oxidative stress plays an important role by being the initiator of chronic degenerative and neurodegenerative diseases along with some types of cancer (Bilal et al. 2013, Naba et al. 2019). In this sense, an effective antioxidant complex can remove free radicals and ROS at different cell sites, limiting the harmful effects on cells and tissues (Adegbola et al. 2020). Therefore, the phenolic compounds existing in the extracts of *H. longipes* could contribute towards the protection against oxidative damage triggered by overproduction of free radicals.

According to the results, the DRSA may associate the total phenolic content of the extracts, instead ARSA suggests being influenced to a greater extent for the chemical composition of the phenolic compounds, indicating that the molecular characteristics of the polyphenols, flavonoids and tannins present in the extracts

of the different locations contribute in the anti-radical capacity. LME and FMB of Beltrao exhibited the greatest radical DPPH and ABTS<sup>•+</sup> scavenging effect, showing the lowest EC<sub>50</sub> values, which suggests that it may be related to the higher content of phenolic compounds (TPC, TPC and CTC) in the extracts, mainly with TPC. Pretti et al. (2018) found high correlations between the total content of phenolic compounds (polyphenols, flavonoids and tannins) with the reducing capacity of DPPH and ABTS of extracts from *T. diversifolia* (species belonging to the same family of *H. longipes*). On the other hand, in extracts obtained from other botanical families (Amaranthaceae and Liliaceae), the anti-radical effect was correlated mainly with the high content of flavonoids (Babini et al. 2019, Mansour et al. 2019).

The phenolic compounds possess biological activity and have been related to the prevention of cardiovascular disease, some types of cancer and the oxidative damage that suffers the organism (Borrelli et al. 2011). These properties of the phenolic compounds have been attributed to the antioxidant effect exerted in direct manner as free radical scavengers (Lin et al. 2018). González-Aguilar et al. (2014) mention that the AOR of the phenolic compounds depend on their structure, particularly the hydroxylation degree of the aromatic rings and the position of the hydroxyl groups. Other studies have also proposed that exists a correlation between AOR and the polyphenols, flavonoids and tannins content in the different parts of the plants (Capaldi et al. 2017, Pretti et al. 2018, Mansour et al. 2019).

According to the UPLC analysis, in LME the main classes of identified phenolic compounds were hydroxybenzoic acid and chlorogenic acid, which were existing in the extracts from the three locations; in addition to flavonols (rutin) and isoflavones (genistein) existing only in the extracts of Beltrao and Camoa, respectively. On the other hand, in FMB of all locations, in addition to the compounds identified in LME, there was also the presence of other phenolic acids (caffeic and coumaric), apigenin (flavone), marigannin (flavonone) and quercetin (flavonol). The differences between LME and FMB can be attributed both to the type of organ and the growth conditions of *H. longipes*, as described above. Both phenolic acids and flavonoids represent secondary metabolites that intervene in defense mechanisms of plants (Manach 2004). In this sense, rutin and genistein could be characteristic flavonoids of Beltrao and Camoa leaves, respectively. Andrade-Andrade et al. (2018) mentioned that this type of flavonoids helps to fight oxidative stress and act as a growth regulator. On the other hand, the flowers presented greater diversity of metabolites, which may suggest that in *H. longipes* this organ has high metabolic activity due to the growth conditions. In addition, flowers contain flavonoid pigments

in their structure. The phenolic acids and flavonoids identified in LME and FME have been previously reported as bioactive metabolites responsible for the reduction of the level of harmful free radicals and consequently for a high antioxidant effect (García-Miller et al. 2015). In particular, chlorogenic acid has proven to be a powerful antioxidant, since it inhibits carcinogenesis and has protective effects against oxidative stress (Caccioli et al. 2017). For their part, caffeic acid, epigallocatechin, and quercetin have been shown to have anticarcinogenic and protective effects against photoaging of the skin, due to their antioxidant properties (Lorenzini et al. 2014). Therefore, in the present study, the phenolic composition existing in the extracts (LME and FME) of *H. longipes* is the one that provided its AOX.

So far, and to the best of our knowledge, this is the first study focused in the obtaining of antioxidant phenolic extracts of leaves and flowers of *H. longipes*. The obtaining of the extracts provides added value to the chilacangus plant for the use of foliage (specifically leaves and flowers), so that currently is discarded and with no significant use. It is necessary to perform more studies related to the extraction process optimization, characterization and purification of phenolic substances and evaluation *in vivo* of their antioxidant potential for its possible application as ingredients in functional foods, cosmetics products and so on.

#### Acknowledgements

Authors thank to Autonomous University of Querétaro for partially support this research through the FOPHE project #0930-2019. IPC acknowledges to CONACyT for student scholarship for PhD studies.

#### Supplementary material

Supplementary material for this article can be accessed here: <https://doi.org/10.17125/biotaxa.2671>.

#### Literature cited

Adegbola FI, Tumbaga AA, Olaniyi TD. 2020. Antioxidant activity of Amaranthus species from the Amaranthaceae family - A review. *South African Journal of Botany* 133: 11-117. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.002>

Andrade-Andrade G, Delgado-Alvarez A, Herrera-Cabrera BR, Arévalo-Galvez L, Caso-Barra L. 2018. Variación de compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos en *Favilla pinnatifida* Jacq. ex Andrews de la Bahía de los Angeles, México. *Agrobiología* 31: 55-66.

Azharık ZC, Cankaya IT, Oskan AMG. 2016. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of some *Yucca* spp. (*Asteraceae*) taxa growing in Turkey. *EBAD Journal of Pharmaceutical Sciences* 41: 17-25.

Erghani F, Mached B, Draboua B, Dhilli M, Hammami M. 2012. The efficacy of phenolic compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products* 38: 146-152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.01.023>

Erilouet JM, Roudeu C, Schmitt B, Solymosi K, Cheynier V, Fukremont H, Vardil J, Comajero G. 2013. The tannocyanin is an organoleptic forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of *Epacroplytes*. *Annals of Botany* 112: 1003-1014. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mct169>

Caccioli G, Iannarelli R, Segretini G, Vitoci S, Zecchetto C, Marchetti-Molina CC, Rahmani RM, Quaresimi L, Bonaccini M, Vitelli LA, Petrelli D, Lupidi G, Vardilli A, Maggi R. 2017. Phenolic acids, antioxidant and antiproliferative activities of Naviglio® extracts from *Helicopsis verticosa* (*Asteraceae*). *Natural Product Research* 31: 515-522. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1195383>

Cilia-López VG, Aguirre-Rivera IR, Espinosa-Rayas G, Flores-Cano JA, Reyes-Agüero IA, Juárez-Flores HL. 2014. Distribución de *Helicopsis longipes* (Helianthaceae: Asteraceae), un recurso endémico del centro de México. *Revista Científica Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 38: 47-54. DOI: <https://doi.org/10.5154/rms-cs.2013.05.015>

Cilia-López VG, Aguirre-Rivera IR, Reyes-Agüero IA, Juárez-Flores HL. 2006. Distribución de *Helicopsis longipes* (Asteraceae: Helianthaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 83: 81-87. DOI: <https://doi.org/10.17125/botol.1790>

Dias MI, Sousa MJ, Alves RC, Ferreira ICFR. 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products* 82: 9-22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.016>

Edairi H, Jaadi R, Haddad O, Antonissen R, Acouzi M, Mastouri M, Verheijde L. 2019. Phytochemical analysis, antioxidant, anticongulant and *in vitro* toxicity and genotoxicity testing of methanolic and juice extracts of *Beta vulgaris* L. *South African Journal of Botany* 126: 170-179. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.01.017>

Escobedo-Martínez C, Guzmán-Guillén SL, Hernández-Méndez MM, Casami J, Trujillo-Valderrama A, Orozco-Castellanos LM, Rodríguez BG. 2017. *Helicopsis longipes*: anti-arthritic activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27: 214-219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2016.09.003>

- Feregino-Pérez, AA, Berumen, LC, García-Alcober G, Guerrero-González RG, Ramos-Gómez M, Reynoso-Camacho E, Acosta-Gallegos JA, Loarca-Piña G. 2006. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on mucinase-induced colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8757-8764. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf050716z>
- Feregino-Pérez AA, Torres-Pacheco I, Vargas-Hernández M, Mangola-Fragoso PV, Loarca-Piña GE, Méndez-Díaz BO, Ocampo-Velázquez RV, Rico-García B, Guerrero-González RG. 2011. Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia peruviana* pods. *Journal of Scientific and Industrial Research* 79: 859-864.
- García-Chávez A, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres I. 2004. El género *Helleboris* (Helleboraceae; Asteraceae) en México y las silíceas presentes en sus raíces. *Acta Botánica Mexicana* 69: 115-131. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm69.2004.953>
- García-Márquez I, Jiménez-García RN, Guerrero-González RG, Feregino-Pérez AA, Centrosam-Molina LM, Torres-Pacheco I. 2015. Elicitor mixture compounds significantly increase bioactive compounds, antioxidant activity, and quality parameters in sweet bell pepper. *Journal of Chemistry* 3815: 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/268286>
- Gómez-Romero M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. 2010. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanolic extracts of tomato fruit. *Phytochemistry* 71: 1848-1864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.002>
- González-Aguilar GA, González-Cárdenas AE, Vallejo-Córdova B, Álvarez-Parrilla B, García HB. 2014. *Los Alimentos Funcionales: Un nuevo reto para la industria de alimentos*. México, DF: AYT Editor, ISBN: 978-607-7551-37-9
- Hernández I, Márquez L, Martínez I, Diegues E, Delporto C, Prieto S, Molinas-Torres J, Garrido C. 2009. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and silicified-derived from *Helleboris longipes* roots. *Journal of Ethnopharmacology* 124: 649-652. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.060>
- Hossain ML, Moutar-Al-Hossain ASM, Sedik SK. 2016. HPLC Profiling and evaluation of in-vitro antioxidant activity of *Crinum arvense* L. (Family: Amaryllidaceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5: 272-277.
- Jaraci B, Axverdi D. 2018. Evaluation of antioxidant capacity and phenolic content in ethanolic extracts of leaves and flowers of some asteraceae species. *Recent Advances on Food, Nutrition & Agriculture* 3: 42-49. DOI: <https://doi.org/10.2174/2212798409666171023150601>
- Jovanović AA, Borošević VB, Zecović GM, Pjevljaković DB, Šavikin KP, Godevac DM, Bugarski BM. 2017. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllus* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology* 179: 369-380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>
- Li FR, Liu LL, Liu JL, Yang K. 2019. Abiotic and biotic controls on dynamics of labile phosphorus fractions in calcareous soils under agricultural cultivation. *Science of the Total Environment* 681: 163-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.091>
- Li Y, Kong D, Fu Y, Susman MB, Wu H. 2020. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 148: 80-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plphys.2020.01.006>
- Lin HY, Chang TC, Chang ST. 2018. A review of antioxidant and pharmacological properties of phenolic compounds in *Acacia confusa*. *Journal of Traditional and Complementary Medicines* 8: 443-450. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2018.05.002>
- Lorenzini M, Broholm CA, Dlesman GC, Zanobia NIT, Maithech HL. 2014. Active ingredients against human epidermal aging. *Ageing Research Reviews* 13: 100-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.03.002>
- Masoch C, Sealbert A, Morand C, Hérold C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Mbayouf N, Charaf N, Souidi S, Baghizini A, Khannouf S, Azzar L. 2019. Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Azobolus nitrocarpus* methanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 239: 11914. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111914>
- Nata E, Helder MGR, Pothak A, M. Yeo S. 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 178: 687-704. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Parala-Centrosam I, Tovar-Pérez BG, Rojas-Molina A, Luna-Vázquez FI, Torres-Pacheco I, Ocampo-Velázquez RV, Guerrero-González RG. 2020. Changes in affinin contents in *Helleboris longipes* (chilacangua) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions. *Industrial Crops and Products* 148: 112314. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112314>
- Pretti IR, de Lencastre AC, Jardim CM, Bettencourt MCP. 2018. Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Thibaudia diversifolia* Hamel. (Asteraceae) populations. *Industrial Crops & Products* 121: 241-249. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.080>
- Quintanilla-Solís M, Méndez-Díaz B, Hernández-Sandoval I, Carrillo-Ángeles I. 2018. Characterization of the secondary metabolites in the seeds of nine native bean varieties (*Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*) from Querétaro, México. *Botanical Sciences* 96: 650-661. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1950>

- Rodríguez-Méndez AJ, Carmen-Sandoval W, Lomas-Soria C, Guerrero-González RG, Reynoso-Camacho R, Villagran-Herrera ME, Salazar-Olivo L, Torres-Padua I, Feregrino-Pérez AA. 2018. Timbo (*Acetella saguandana*) pods extracts reduce the levels of glucose, insulin and improved physiological parameters, hypolipidemic effect, oxidative stress and renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules* 23: 2812. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23112812>
- Sampaio BL, Bara MTF, Facci PH, da Costa Santos S, de Paula JR. 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lepanota pacari*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21: 1127-1137. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0162-694X2011005000177>
- Semadi HH, Ismail A, Hamid M. 2011. Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of cocoa (*Theobroma cacao* L.) nutolytes. *Food Research International* 44: 290-296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.017>
- SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2002. Normas Oficiales Mexicanas NOM-021-RECNAT-2000, Especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos, Estrada, México y Análisis. *Diario Oficial de la Federación*. 2da Sección, 31 de diciembre de 2002.
- Sinelli V, Gupta V, Sharma K, Hastnager S, Kansari R, Dhaka N. 2013. Potential applications of antioxidants-A review. *Journal of Pharmacy Research* 7: 828-835. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>
- Song B, Liang H, Sun R, Peng F, Jiang Y, Shi D. 2020. Hydrogel synthesis based on lignin/sodium alginate and application in agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules* 144: 219-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.033>
- Soyratal SA, Soutey JP, Lopo MP. 2016. Nutraceuticals: A Review. *Dermatology and Therapy* 8: 5-16. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13585-016-0221-x>
- Tapia RF, Patricia M, Sánchez O, Pedro J, Marguz F, Martínez R, Alvarez B. 2019. Efecto de la salinidad y nitrógeno inorgánico del suelo en los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de *Lycium berlandieri*. *Terra Latinoamericana* 37: 81-90. DOI: <https://doi.org/10.28243/ta.v37i1.388>
- Tohma H, Gulcin I, Bursal E, Gören A, Alwaseel SE, Kolmal I. 2017. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosm.) determined by HPLC-MS/MS. *Food Measure* 11: 556-566. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9423-x>
- Vázquez-Hernández MC, Paula-Castro I, Mestoye-Gómez LM, Torres-Padua I, Schwach D, Guerrero-González RG. 2019. Biotransform: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetable production. *Scientia Horticulturae* 250: 223-229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.053>
- Vergara-Castellón HA, Guerrero-González RG, Ramos-Gómez M, Reynoso-Camacho R, Guzmán-Maldonado H, Feregrino-Pérez AA, Oumeh BD, Louro-Pita G. 2010. Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo México suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food and Function* 1: 294-300. DOI: <https://doi.org/10.1039/c0fo600130a>
- Vu HT, Soudist CJ, Vuong, QV. 2018. Phenolic compounds within banana peel and their potential uses: A review. *Journal of Functional Foods* 40: 238-248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.006>
- Willig IB, Salomón JLGO, Vienna DRB, Moore S, Pilger DA, Buffon A, Konradt KL. 2019. *Heliparis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) extract causes cell cycle arrest and induces caspase dependent apoptosis against cancer cell lines. *South African Journal of Botany* 125: 251-260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.035>
- Zhao C, Zhang H, Song C, Zou JK, Stehals S. 2020. Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *The Innovation* 1: 100017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.inno.2020.100017>

Associate editor: Edith Buzdita

Author contributions: IPC performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. RGGO designed the experiments, participated in the interpretation of results and critically reviewed the manuscript. AAFP collaborated in the determination of antioxidant activity and EC<sub>50</sub> values. RBC collaborated in the determination of phenolic compounds. DFFR collaborated in the characterization of the extracts. KYOV collaborated in obtaining and identifying of plant material. ARM and FLV collaborated in the preparation of the extracts for their characterization. RGTP designed the experiments, analyzed the data, wrote and edited the manuscript.

<https://www.botanicalsciences.com.mx/index.php/botanicalSciences/article/view/2671/4183>

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ



**EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE  
DIFERENTES ÓRGANOS DE LA PLANTA  
DEL CHILCUAGUE (*Heliopsis longipes*) EN  
GORGOJO (*Sitophilus granarius*)**

Effect of the ethanolic extract of different organs of the chilcuague plant  
(*Heliopsis longipes*) on weevil (*Sitophilus granarius*)

Isabel Parola-Contreras, Juan Antonio Valencia-Hernández,  
Nallely Solano-Álvarez, Ramón G. Guevara-González

Universidad Autónoma de Querétaro

Autor de correspondencia  
ix.parola@gmail.com

<http://perspectivaciencia.uaq.mx/index.php/ojs/article/view/43/41>



# Timbe methanolic pod extract *Acaciella angustissima*'s Properties

Formulation of seed pods *Acaciella angustissima* methanolic extract

I. Perola-Contreras, Ana A. Fecragino-Pérez, Ramón G. Goevata-González,  
Facultad de Ingeniería  
Universidad Autónoma de Querétaro  
México  
ix.perola@gmail.com

María C. García-Barcena  
Facultad de Química  
Universidad Autónoma de Querétaro  
México

**Abstract**— The acquisition of new anticancer products is a way of innovation for the pharmaceutical industry. Due to phenolic compounds in medicinal plants, *Acaciella angustissima* is a promising candidate for use in canceric treatments. Interest in the use of this species is due to its rapid growth, ability to fix nitrogen and restoration of the soil in high densities [1]. Flavonoids of this genus have been reported by Fecragino-Pérez [2] and by Vargas-Hernández [3]. Flavonoids are responsible for antioxidant activity in the crude methanolic extract, and are known to have the ability to trap free radicals and antioxidant activities. For this reason the methanolic extract of Timbe pods is the ideal compound to be part of various formulations and applications.

**Keywords**—*Acaciella angustissima*; *sumosoy*; *medicinal*; *antioxidant* and *antitumor activity*

## I. INTRODUCTION

Until a few years ago the scientific knowledge of the chemical and biological activities of medicinal plants [4]. *A. angustissima* is a species found from the southern United States to Argentina, where it occupies a wide range of habitats from sea level up to 2500 m [5]. This tree has been reported as a promising source of bioactive compounds such as phenolic compounds; the pods being a sustainable exploitation [2].

## II. MATERIALS AND METHODS

### A. Plant material

Fig. 1 The Timbe pods (*A. angustissima*) was collected in February 2017 from the trees located in the Amozteca campus of the UAQ Engineering Faculty 100 ° 15 '33.87" west longitude at 2,272 mean with the geostatistical key 220110005 (INEGI, 2017).



Figure 1 The Timbe pod.

### B. Extracts preparation

Reported the procedure the extraction with methanol by maceration. The methanolic extract from *A. angustissima* (MEA) should be evaporated to dryness in vacuum. The extract should be stored at 4°C in sealed amber jars [6].

### C. Total phenolic compounds

Vargas-Hernández [3] describe this method for MEA. Total phenolics of MEA were determined according to Folin-Ciocalteu colorimetric method [7] and flavonoids were determined as reported Liu [8]. They found in MEA using maceration extraction method: total phenolics, 38.87 mg equivalent of gallic acid/g extract; and total flavonoids, 127.19 mg equivalent of (+)-catechin/g extract. And according to statistical test, the extraction method did not affect the phenolic compounds content ( $p < 0.05$ ). The flavonoids content found in the work of Vargas-Hernández [3] is higher to those reported in *A. pennata* pods by Fecragino-Pérez [2].

### D. HPLC analysis

The data obtained by Vargas-Hernández [3] showed MEA contain various phenolic compounds from Timbe pods, among which can mention: gallic acid, (+)-catechin and luteolin in high concentrations.



# Management of stress factors (eustressors) in medicinal plants as an alternative for production of secondary metabolites

I. Parola-Contreras, L. M. Montoya-Gómez, B. A. Delis Hechavarría, A. Escamilla García, R. G. Guevara-González\*

Facultad de Ingeniería  
Universidad Autónoma de Querétaro  
Querétaro, México  
\*rmonoggg66@gmail.com

**Abstract**— This review briefly describes the concept of eustressor, the history of the use of the metabolite reserves of plants to cope pathogens and diseases. The review deals with a general overview of the systemic resistance and how it is synthesized through substances that give the plants their medicinal properties. The classification of the eustressors are shown through the definition and examples of the doses and elicitors used in other investigations are given. The objective of this article is to briefly introduce some examples of medicinal plants under induced stress and how is the metabolism of the plant responded in the biosynthesis of secondary metabolites.

**Keywords**— eustressor, medicinal plant, systemic immunity plant, secondary metabolites

## I. INTRODUCTION

Plants are continually being affected by stress factors. These stress factors can affect plants positively (eustress) or negatively (distress) depending the stress perception of the plants. This perception can be classified as 'alarm', 'resistance' and 'exhaustion'. Alarm trigger the stress signalling, the resistance phase refers to adaptation through the post-translational and transcriptional modifications, and finally, the exhaustion phase is the death. Plants activate their defense mechanism to synthesize substances that help them cope with induced stress [1]. These synthesized substances are developed to improve and adapt in the secondary metabolism of plants, these products have been called secondary metabolites (SM) [2]. The SM with medicinal properties gives the plants their therapeutic use. Wild medicinal plants that are taken out of their habitat to produce them in optimal conditions and with high yields usually have high chemical composition variability and low amounts of the SM of interest [3].

An alternative to maintain the production of SM in medicinal plants is through the elicitation technique. These include treatment with various stress factors (eustressors) of biological (elicitors), chemical and physical nature. Many treatments indeed effectively promote the production of a wide range of plant SM, both *in vivo* and *in vitro* [4]. The objective of this review is to show a wide scope on how eustressors can be used

to increase the production of secondary metabolites in medicinal plants.

## II. SYSTEMIC PLANT IMMUNITY

Plants are exposed to a great variety of organisms such as insects, bacteria, fungi and viruses that interaction trigger the metabolism of SM. The SM can reduce growth and outweighed by the increased quality by the stress induced [5]. For instance, recognition of conserved pathogen- or microbe-associated molecular patterns (PAMPs or MAMPs) via cell surface-localized pattern-recognition receptors (PRRs) activates pattern-triggered immunity [6]. Plant-derived damage-associated molecular patterns (DAMPs) that are released upon infection or herbivore feeding are recognized similarly to MAMPs and also trigger immune responses. Plants do not possess adaptive immunity like animals, the absence of an adaptive immune response likely forced plants to evolve a multiplicity of PRRs, whereas animals elaborated only few PRRs for recognizing very highly conserved MAMPs [7].

Localized and systemic disease resistance is induced by the interaction with certain types of pathogen or non-pathogen organisms. The induced plants are capable to resist diseases or pest attacks because of an enhanced ability to rapidly express defenses upon infection and, in some cases, an increase in defenses that are expressed in response to the inducing treatment [8]. Systemic acquired resistance (SAR) is a type of systemic plant immunity that comes when a localized pathogen attack elicits broad-spectrum immunity to reinfection throughout the whole body by the induction of a hypersensitive response or moderate symptoms of disease. Different molecules have been identified that participate as a set of SAR signals to the plant which contain salicylic acid (SA), methyl-SA (MeSA), dehydroabietinal, methyl-jasmmonic acid (MeJA), glycerol 3-phosphate (G3P) or a glycerol 3-phosphate derivative, and/or ascorbic acid (AsA) [6].

Bacteria and fungi, these help the growth and immunity of the host colonize the roots of the plants. The immune response of the plant activated by these organisms is called systemic induced resistance (SIR). The activation of SIR depends on the



# Growth modelling of chilcuague (*Heliopsis longipes*) plant

Chilcuague accession: a mathematical model

I. Parola-Contreras, R. Guzman-Cruz, J. D. Hernandez-Vega, E. A. Delis-Hechavarria, A. E. Jarro-Castañeda, R. G. Guevara-González\*

Facultad de Ingeniería  
 Universidad Autónoma de Querétaro  
 Querétaro, México

\* [ramongz66@gmail.com](mailto:ramongz66@gmail.com)

**Abstract**— The growth of a plant includes from germination until it is adult. These changes are visible and quantifiable leading to confirm that the plant has grown. In parallel, there are qualitative changes that accompany new morphological and functional properties that make them different, as a cell that through certain processes is transformed into another with a different function to the initial one. This set of phenomena contributes to what is called the development of a plant. Growth is a quantitative aspect while development considers qualitative aspects. *Heliopsis longipes* is a medicinal plant, roots are the part used as a condiment and soothing muscle pain, pharmacologically has been proven effective as anti-inflammatory, analgesic, anesthetic and vasodilator. The economic importance that has taken this medicinal plant has reduced its populations when extracted from its habitat. That is the reason for the preservation of their populations to maintain the genetic variability as well as the plant species itself. The aim of this research was to design a model that describes the growth behavior of the *Heliopsis longipes* plant.

**Keywords**—chilcuague; stem length and width, prediction

## I. INTRODUCTION (HEADING 1)

Through the accession monitoring and its corresponding mapping, it can be determined if the plant is growing and fructifying properly, also, the plant growth is influenced by temperature [1]. For that reason, it is important monitoring the growth of wild plants as *Heliopsis longipes*. This is an herbaceous plant, with a mean diameter of 1.9 mm and 8 knots. The leaves are 4 cm long and 2.9 cm wide. The root has a threadlike appearance with mean average of 33 fibrous roots. The roots have average length of 38 cm and 4.1 mm in diameter [2]. Phenological stages of *H. longipes* are: vegetative, appearance of the reproductive structures, ligulate flowers anthesis and the disc; Figure 1 shows presence of achenes and loss of foliage [3]. The representatives of *Heliopsis* species are perennial plants except for five annual species (*H. annua*, *H. anomala*, *H. filifolia*, *H. parviceps* and *H. sinaloensis*) endemic to Mexico [4].

*H. longipes* be considered as economic importance, also it is highly demanded by its medicinal and pharmacological properties [5], and currently domesticated wild plants possess a wide genetic diversity useful to develop more productive,



Fig. 1 *Heliopsis longipes* accession in greenhouse flowering stage.

nutritious and disease resistant crops. However, the state of conservation of these in their environment and their availability for use in various activities are still under development, so it is feasible to identify the growth model that has under greenhouse conditions for propagation and cultivation [6]

Modifications to the root system are given in response to the availability of suitable conditions impact on the plant adaptation to its environment [7]. The root architecture adaptation to the substrate is determinant for the efficient acquisition of nutrients and reflects that development plasticity [8]. The root growth is divided into: i) "indeterminate growth phase" and ii) "growth termination phase" [9]. The root growth and development are an important factors for the establishment and accession survival, these depends on the absorption of water and vital nutrients for various physiological processes [10]. The root growth is distinguished in three zones: meristematic zone, zone of elongation and zone of differentiation [11].

Growth is a constant increase and irreversible in the volume of an organism, tissue or cell depending on processes of morphological characters and cell differentiation [12]. Also, the growth of plant organs is a complete physiological process, which depends on various processes such as respiration and cell division, photosynthesis, elongation, and which is influenced by the abiotic characteristics where it develops [13]. Growth has two directions in space: growth in length and



# Chitosan triggers affinin content in *Heliopsis longipes*

Sucesfull elicitation in a medicinal plant

I. Parola-Contreras, E. G. Tovar-Pérez, E. A. Delis-Hechavarría, A. E. Jarro-Castañeda, L. Félix-Cuencas, A. Escamilla-García, R. G. Guevara-González\*

Facultad de Ingeniería  
 Universidad Autónoma de Querétaro  
 Querétaro, México

\* [ramonggz66@gmail.com](mailto:ramonggz66@gmail.com)

**Abstract**—*Heliopsis longipes* is a medicinal plant that synthesizes specialized compounds. The plant grown in natural conditions and produces affinin in the roots. These conditions function as stress factors (stressors) for the plant. The controlled elicitation is a technique that applied a stressor in dose and periodicity, causing positive (eustressor) or negative impact (distressor) in plants. The eustressors could provoke increasing in growth, performance and yield being called biostimulant. Chitosan is a biotic composite that activates a lot of defensive responses in plants. This study aimed to show the effect of two doses of chitosan (QN) in *H. longipes* plants on plant morphology and affinin content. As results, the affinin content enhanced with QN 1,000 µg/mL (102.01 %) and QN 600 µg/mL (25.51 %) treatments respect to control. Also, QN 670 mg/mL showed biostimulant activity in the roots. The immunity plant activation was given by controlled elicitation using chitosan, and it showed to be a useful tool to trigger the components of specialized metabolites in *H. longipes* plants.

**Keywords**—chilcuague; affinin content, stem length and width, morphology

## I. INTRODUCTION

The habitat in which plants development activates the immune response system. These external stress in a concentration and periodicity triggers the secondary metabolism [1]. These stressors can be positive (eustress) if the effect is positive over quality, yield, growth and tolerance to abiotic stress or negative (distress) [2]. The secondary metabolism biosynthesizes specialized compounds with special characteristics of agro-ecological, medicinal, pharmacological and industrial interest [2]–[4]. In the Sierra Gorda Biosphere Reserve (RBSG), which occupies the first place at the national level in eco-biodiversity, 15 types of vegetation can be found in which 1,718 species of vascular plants composed of gymnosperms, pteridophytes and angiosperms have been recorded; of which 45 species are endemic within the limits of the state of Querétaro. One of these wild plants is *Heliopsis longipes*, in its root is condensed the alkamide called affinin (N-isobutyl-2E, 6Z, 8E-decatrienoamide - C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO) [5]. Controlled elicitation could be another resource to manage plants as *H. longipes* and maintain genetic diversity, as well as rise affinin content [6], [7].



Fig. 1 *Heliopsis longipes* accession in a greenhouse.

A stress factor can induce genetic defence, transcription, tolerance, phytoalexin synthesis and defence gene expression; all of the above leads the plant to resistance, which translates into its survival [8]. Chitosan is a natural compound in agriculture, it has been proved control plant disease as antimicrobial properties, accumulates phytoalexins, lignin synthesis, generation of reactive oxygen species and callose formation [9]. Foliar application of chitosan in maize and soybean affected the photosynthetic rate, increasing stomatal conductance and transpiration rate; however, these applications did not modify leaf area, root length, total dry mass or height [10].

Affinin is the major compound in the *Heliopsis longipes* roots. This alkamide has anti-inflammatory, analgesic, vasodilatation and anti-arthritis [2]. It has been purified by the roots, in fresh and dried, it has been obtained 0.085 g/g [11] and 0.019 g/g (dichloromethane extract) and 0.017 g/g ethanolic extract [2], respectively. Distinct authors are studying the doses/response of eustressors and have shown their effectiveness in the production of specialized metabolites [1], [7], [12]. The aim of this experiment was quantifying the concentration of affinin in roots of *H. longipes* with two chitosan (QN) concentrations without changes in plant morphology.





## Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production

M.C. Vázquez-Hernández<sup>a</sup>, I. Ferrás-Contreras<sup>a</sup>, L.M. Montoya-Gómez<sup>a</sup>, J. Torres-Pacheco<sup>a</sup>,  
D. Schwanz<sup>b</sup>, R.G. Guevara-González<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Mezquites Engineering Group, School of Engineering, Autonomous University of Querétaro, Campus Amatepec, Car. Chihuahuita-Querétaro km 1.5 200 Amatepec, Q. J. 76046, El Mirador, Querétaro, México*

<sup>b</sup> *Lahnstein Institute of Vegetable and Ornamental Crops, Theaterstrasse/Weg 1, D-24873, Südfeld, Germany*

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Plant taxonomy  
Stressors  
Plant quality  
Distress  
Eustress

### ABSTRACT

Worldwide plants are exposed to different biotic and abiotic stress factors limiting yield, growth, quality and performance. Agricultural and horticultural practices for food production aim at plant cultivation at suboptimal stress using different production systems either under protected or open field conditions. However, it is also possible to stress plants to enhance horticultural production. The theory of stress indicates a dose/response relationship between the strength and length of the stress factor (stressor) and the plant response. Plant responses to eustress are triggered after recognition of a range of biological, chemical, and physical stressors. Right doses of stressors might cause positive effects on plant performance ("positive stress" or eustress), whereas on the contrary, high doses provoke negative effects ("negative stress" or distress). Managed as eustress doses and length, an eustressor might stimulate the plant response in such a way that plant production and quality are improved. A myriad of literature has reported beneficial effects for the applications of biological (biostimulants/elicitors) and non-biological chemical eustressors in horticulture. However, physical eustressors have not been exhaustively studied in this sense. The present review aims at presenting the current status of the concepts, case studies and applications of eustressors in horticulture. Moreover, the review focuses on the necessity of explaining physical eustressors as stress factors that modulate and increase the quality of horticultural products.

### 1. Introduction

Liebman *et al.* (1996) has defined plant stress as "any unfavorable conditions or substances that affect or block a plant's metabolism, growth or development". Plant stressors can be classified as "internal" that come from within the plant and "external" that exist outside the plant. External and internal stressors are usually referred to as "stress factors" and "stressors", respectively (Kozman *et al.*, 2010). It is noteworthy mentioning that the present review focuses on external "stress factors" and their possibilities to enhance horticultural production. In horticultural and agricultural practices worldwide, plants are exposed to different stress factors (stressors) that limit yield, growth, quality and performance. Based on their origins, they can be separated into biotic, e.g. pathogens, insects, and abiotic, e.g. drought, extreme temperatures, salinity, etc. The impact of the stressors is not only controlled by the dose but also by its duration (Lichtenhalder, 1996). Thus, the balance between the plant response (yield, growth, quality, defense or tolerance) and sensitivity may determine whether a stressor has a positive

(eustress) or a negative (distress) effect on plant metabolism and thus growth (Kozman *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2013; Katsiras *et al.*, 2016). For example, low temperatures cause distress for vegetative tissues of vascular plants and is lethal for many plant species below freezing point temperature (Vaccaro *et al.*, 2008; Schwanz *et al.*, 2013), whereas low temperature for a short period in the morning ("cool morning pulse") induces hardening and tends to improve growth in favor of greater targets (Kalberer *et al.*, 2006). Based on this approach, a stress factor can be called eustressor if plant's response in terms of yield, growth, quality, and resistance to diseases/pests or tolerance to abiotic factors is positive (eustress) or distressor if the response is negative (distress).

The eustress approach reminds us the concept of "hormesis" reported for toxins when applied in low doses in medicine (Caldeiras, 2004). Anciently, Paracelsus (1493–1541) raised the definition: "All things are poisons and nothing is without poison, only the dose permits something not to be poisonous" ("Sed dosis facit venenum"). However, hormesis is currently defined as a biphasic response in which high doses of a toxic agent could cause inhibition, i.e. distress, while a low dose of

\* Corresponding author.

E-mail address: [rgg@uaq.mx](mailto:rgg@uaq.mx) (R.G. Guevara-González).

<https://doi.org/10.1016/j.scihorti.2019.02.003>

Received 16 October 2017; Received in revised form 23 January 2019; Accepted 17 February 2019  
0304-4220/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



## Influence of Elicitors and Eustressors on the Production of Plant Secondary Metabolites

11

Aurora Mariana Alvarado, Humberto Aguirre-Becerra, Ma. Cristina Vázquez-Hernández, Ernesto Magaña-Lopez, Ixchel Parola-Contreras, Laura Helena Caicedo-Lopez, Luis Miguel Contreras-Medina, Juan Fernando Garcia-Trejo, Ramon G. Guevara-Gonzalez, and Ana A. Feregrino-Perez

### Contents

11.1	Introduction .....	334
11.2	Elicitors as Eustress Factors .....	336
11.2.1	Biotic Elicitation .....	338
11.2.2	Abiotic Elicitors .....	342
11.3	Plant Cell and Plant Tissue Culture for Secondary Metabolite Production .....	367
11.3.1	In Vitro Production Versus Field Production .....	370
11.3.2	Eustress Factors in Plant In Vitro Culture .....	373
11.4	Conclusions and Future Prospects .....	375
	References .....	376

### Abstract

Plants are the main source of secondary metabolites, which can be used in different sectors such as pharmaceuticals, food, cosmetics, agriculture, etc. turning them into an attractive source of income. Primary metabolites (carbohydrates, lipids, and proteins) have been linked to vital processes such as growth, development, and fruiting, while the secondary metabolites (phenols, flavonoids, and carotenoids, to name a few) are the result of adaptation and evolution of the plants with respect to changes in the environment. Therefore, it can be said that the

Ramon G. Guevara-Gonzalez and Ana A. Feregrino-Perez have equally contributed for this chapter.

A. M. Alvarado · H. Aguirre-Becerra · M. C. Vázquez-Hernández · E. Magaña-Lopez  
I. Parola-Contreras · L. H. Caicedo-Lopez · L. M. Contreras-Medina · J. F. Garcia-Trejo  
R. G. Guevara-Gonzalez (Ed) · A. A. Feregrino-Perez  
School of Engineering, Autonomous University of Querétaro, El Marques, Querétaro, México  
e-mail: rmggg66@gmail.com; feregrino.angg@hotmail.com

© Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019  
M. S. Akbar et al. (eds.), *Natural Bio-active Compounds*,  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7154-7_11)

333

[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-7154-7\\_11](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-7154-7_11)

---

**Avances y Desarrollos de la  
Didáctica y las Aplicaciones de  
las Matemáticas en Querétaro**

---

**Víctor Larios Osorio**  
**Coordinador**

**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**2018**



---

## Índice

---

Presentación .....	1
Manuel Toledano Ayala	
Más de tres décadas de formación de profesores de Matemáticas en Querétaro: la Maestría en Didáctica de las Matemáticas .....	5
Victor Larios Osorio, Patricia Isabel Spindola Yáñez y Carmen Sosa Garza	
Series de Fourier aplicadas a curvas convexas .....	27
Jesús Jerónimo Castro, Iván González García y Angélica Rosario Jiménez Sánchez	
Accesibilidad geográfica a los servicios de atención de emergencias obstétricas y su asociación con la mortalidad materna en zonas rurales .....	61
Esperanza Trenado Sánchez	
Modelos de programación matemática .....	85
Rosario Guzmán Cruz, Ischel Pamela Contreras y Ricardo Montoya Zamora	
Determinantes de salud de los adultos mayores del programa <i>70 y más</i> en zonas rurales en México .....	139
Esperanza Trenado Sánchez	

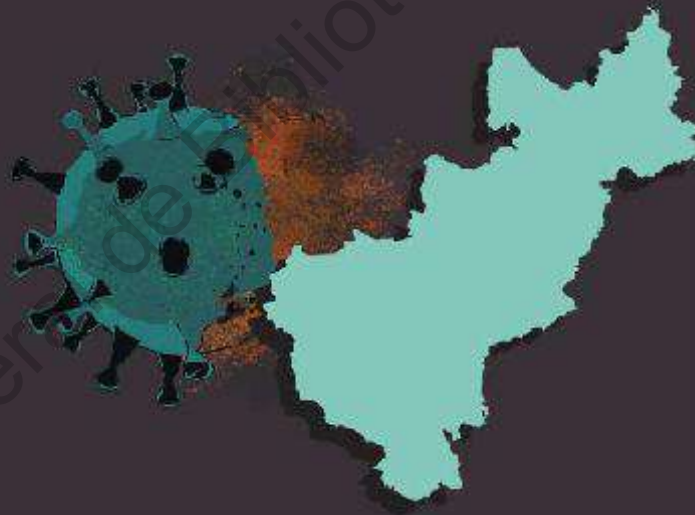


UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE QUERÉTARO

---

# ANÁLISIS Y PERSPECTIVAS SOBRE LA PANDEMIA, DE COVID-19 EN QUERÉTARO

---



## Editores

RAÚL FRANCISCO  
PINEDA LÓPEZ

MARGARITA TERESA  
DE JESÚS GARCÍA GASCA

AZUCENA DE LA  
CONCEPCIÓN  
OCHOA CERVANTES

JUAN ALFREDO  
HERNÁNDEZ CUJERRERO

**SOMOS UAQ**  
BIBLIOTECA



## CAPÍTULO XII

### ¿CÓMO ESTAMOS EN SEGURIDAD ALIMENTARIA EN QUERÉTARO Y DE QUÉ MANERA HA IMPACTADO LA COVID-19?

*Rosalva V. Ocampo Velázquez, Christopher A. Cedillo Jiménez, Juana E. Elton Puente, Ramón G. Guevara González, Adán Mercado Luna, Wilfrido J. Parades García, Ixchel Parola Contreras.*

#### 1. Introducción

Uno de los mayores retos en la actualidad son la reducción del impacto ambiental, lograr la seguridad alimentaria y mejorar la sostenibilidad agrícola bajo las condiciones meteorológicas del cambio climático, para satisfacer las necesidades de una población que está en aumento.

El concepto de seguridad alimentaria surge en la década del 70, basado en la producción y disponibilidad alimentaria a nivel global y nacional. En los años 80, se añadió la idea del acceso, tanto económico como físico. Y en la década del 90, se llegó al concepto actual que incorpora la inocuidad y las preferencias culturales, y se reafirma la seguridad alimentaria como un derecho humano (FAO, 2011). El concepto que el Instituto de Nutrición para Centroamérica y Panamá (INCAP) da a la Seguridad Alimentaria Nutricional (SAN) es "un estado en el cual todas las personas gozan, en forma oportuna y permanente, de acceso físico, económico y social a los alimentos que necesitan, en cantidad y calidad, para su adecuado consumo y utilización biológica, garantizándoles un estado de bienestar general que coadyuva al logro de su desarrollo". Por otra parte,



La Sociedad Científica Mexicana de Ecología  
y la Facultad de Ciencias Naturales de la  
Universidad Autónoma de Querétaro

otorgan la presente

## CONSTANCIA

a

**Ixchel Parola Contreras, Ana Angélica Feregrino Pérez,  
Ramón Gerardo Guevara González  
y Rosalía Virginia Ocampo Velázquez**

por la organización del simposio titulado

**Posibilidades de uso industrial para plantas de México:  
actividades biológicas de interés y su manejo durante su cultivo.**

en el **VII CONGRESO MEXICANO DE ECOLOGÍA**  
celebrado del 29 de septiembre al 4 de octubre de 2019

**Dr. Pedro Luis Valverde Padilla**  
*Presidente de la  
Sociedad Científica Mexicana de Ecología*

**Dr. Humberto Suzán Azpiri**  
*Presidente del  
Comité Organizador Local*

515



# MARCH FOR SCIENCE

M É X I C O

THIS CERTIFICATE IS AWARDED BY

Ixchel Parola Contreras

FOR COLLABORATING AND ORGANIZING THE SATELLITE MARCH EVENT  
THIS 14 OF APRIL 2018 AND IS HEREBY PRESENTED WITH THIS

## CERTIFICATE OF ACHIEVEMENT

GIVEN THIS 14 OF APRIL 2018

**MARCH FOR SCIENCE**  
Valerie Groover  
Satellite Resources Coordinator

**MARCH FOR SCIENCE MÉXICO**  
Pedro Camilo Alcántara C.  
Mexican Satellite Resources Coordinator



# Movimiento por la Ciencia Querétaro

Otorga la presente constancia a:

**Ixchel Parola Contreras**

---

Por su participación como STAFF en la  
**2da. FERIA DE ARTE, CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

Santiago de Querétaro, Qro., a 4 de mayo del 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cedillo', is written over a horizontal line.

M. en C. Christopher Alexis Cedillo Jimenez  
Coordinador general de  
Movimiento por la Ciencia  
Querétaro

Movimiento por la Ciencia Querétaro tiene sede en la  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO con dirección en  
Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n. C.P. 76010,  
Cto Universitario, Centro Universitario, 76010 Santiago de Querétaro, Qro.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

ACTA NÚMERO: 201804500663

28/11/2019 23/11/2019

FAC. INGENIERÍA QRO	CARRA	CICLO	SEMESTRE	CATEDRA	ORDINARIO
218 PROGRAMACIÓN			PANCRA CONTRERAS IXCHEL		

CLAVE	NOMBRE DEL ALUMNO	NOTA	CALIFICACIÓN
275010	ESPIÑAL RUIZ YVRI	9	NUEVE
242714	FERRUZA CAMPOS EMA ALEJANDRA	9	NUEVE
275011	GARCIA DE LA TORRE ALDO	8	OCHO
256859	HILARIO HERNANDEZ JAVIER	9	NUEVE
236096	APIAN DUJAN ANIBAL AIME	8	OCHO
275012	LUGO SANTILLAN ANGELICA MARIANA	10	DEZ
275015	MARQUEZ BLANCO MARIA GUADALUPE	8	OCHO
229012	MORALES JAIME ANTONIO DE JESUS	7	SIETE
275014	PACHECO DE LOYOLA MARTHA INES	10	DEZ
274868	PUGA HUERTA OSVALDO JOSE	8	OCHO
247643	RAMIREZ GARCIA MARIA MONTSERRAT	8	OCHO
275009	ROMILES ALVAREZ HECTOR ANTONIO	9	NUEVE
245395	ROJAS VIGILANZO ANA PATRICIA	6	SEIS

\*\*\*\*\*





FECHA DE VERIFICACIÓN: 04 DE D I C I E M B R E DE 2019

Página 1 de 1

PRESIDENTE: \_\_\_\_\_ VICE: \_\_\_\_\_ VICE: \_\_\_\_\_ SECRETARIO: \_\_\_\_\_

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

ANEXO 13 Participación en ponencias y congresos



**XVII National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology &  
X Joint Mexico-USASymposium**  
Sociedad Mexicana de Bioquímica A. C.

This certify that

**Ixchel Parola Contreras**

Attended the XVII National Congress of Plant Biochemistry and Molecular Biology  
& X Symposium Mexico/USA held in Puerto Vallarta, Jalisco, México, November 13-17<sup>th</sup>, 2017

On behalf  
of the Organizing Committee

  
Dr. June Kilpatrick Simpson Williamson







13<sup>o</sup> CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA



THE STATE UNIVERSITY OF QUERETARO THROUGH THE FACULTY OF ENGINEERING grant the present

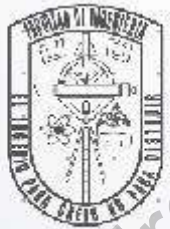
to:

**IXCHEL PAROLA CONTRERAS**

For your participation:

**General Conference**

QUERÉTARO, MEX. MAY 2017.



*[Signature]*  
Dr. Aurelio Domínguez González  
Engineering Faculty Principal

*[Signature]*  
Dr. Gonzalo Macías Bobadilla  
General Coordinator - CONING 2017



UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE QUERÉTARO



FACULTAD  
DE INGENIERÍA

**FI**



CONIIN



IEEE



CONCYTEQ



CONACYT

The Querétaro State University through the Engineering Faculty grant the present acknowledgment to:

**Parola Contreras Ixchel**

FOR HER COLLABORATION:

**ORAL PRESENTATION:**

Management of stress factors (eustressors) in medicinal plants as an alternative for production of secondary

metabolites  
QUERÉTARO, MEX.  
MAY 2018

**Dr. Manuel Toledo Ayala**

PRINCIPAL  
ENGINEERING FACULTY

**Dr. Gonzalo Nacías Bobadilla**

CHIEF OF DIVISION FOR CONIIN  
ENGINEERING FACULTY



UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE QUERÉTARO



FACULTAD  
DE INGENIERÍA



IEEE  
SECCIÓN QUERÉTARO



CONCYTEQ



CONACYT

# CONiIN

XV INTERNATIONAL ENGINEERING  
CONGRESS

THE QUERÉTARO STATE UNIVERSITY THROUGH THE ENGINEERING  
FACULTY GRANT THE PRESENT ACKNOWLEDGMENT TO:

Ixchel Parola-Contreras

ORAL PRESENTATION: "Growth modelling of  
chilouage (*Heliopsis longipes*) plant"

QUERÉTARO, MEX.  
MAY 2019

Dr. Manuel Toledano Ayala  
PRINCIPAL  
ENGINEERING FACULTY

Dr. Gonzalo Macías Bobadilla  
GENERAL COORDINATOR CONiIN  
ENGINEERING FACULTY

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

# Seminario FIBIO

Otorga el presente reconocimiento a:

M.C. Ixchel Parola  
Contreras

Por su participación en el Seminario FIBIO 2019-2 llevado a cabo en la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala

Con la ponencia titulada:

**"Cambios en el contenido de afinina en *Heliopsis longipes* (chilcuague) después de la elicitación controlada bajo condiciones de invernadero"**

  
Dr. Enrique Ríos Contreras  
Coordinador del Campus Amazcala  
Facultad de Ingeniería

  
Dr. Genaro Martín Soto Zorazola  
Director del Comité Organizador  
Seminario FIBIO-2019-2

  
Asael Escamilla García  
Coordinador del Seminario  
FIBIO 2019-2

  
Estelana Espinosa Méndez  
Coordinadora del Seminario  
FIBIO 2019-2





Las licenciaturas en  
**Gastronomía y Desarrollo Humano para la Sustentabilidad**  
 de la  
**Facultad de Filosofía**

otorga la presente:

**CONSTANCIA**

**a: Ixchel Parola Contreras**

Por su participación en la mesa de discusión **Alimentos Regionales y Salud** en el marco del Segundo Coloquio  
**"Gastronomía y Desarrollo Regional Sostenible. La importancia de los alimentos regionales."**  
 llevado a cabo del 18 al 20 de septiembre de 2019.

Santiago de Querétaro, Qro. a 20 de septiembre de 2019.  
 "Universalidad, Diversidad y Memoria"

**Mtra. María Eugenia Barbosa Ortega**  
 Coordinadora de la Licenciatura en  
 Gastronomía

**Dra. Ma. Margarita Espinosa Blas**  
 Directora de la Facultad de Filosofía

**Dra. Mónica Ribeiro Palacios**  
 Coordinadora de la Licenciatura en Desarrollo  
 Humano para la Sustentabilidad





# CONiIN

XVI INTERNATIONAL ENGINEERING  
CONGRESS

THE QUERÉTARO STATE UNIVERSITY THROUGH THE ENGINEERING  
FACULTY GRANT THE PRESENT ACKNOWLEDGMENT TO:

Ixchel Parola-Contreras, Erik Gustavo Tovar-Pérez, Emilio Andrés Delis-Hechavarría, Alexandra Edileth Jarro-Castañeda, Leticia Félix-Cuencas, Axel Escamilla-García and Ramón Gerardo Guevara-González.

**ORAL PRESENTATION: Chitosan triggers affinin in  
Heliopsis longipes**

QUERÉTARO,  
MEXICO.  
SEPTEMBER, 2020



Dr. Manuel Toledano Ayala  
PRINCIPAL  
ENGINEERING FACULTY



Dr. Gonzalo Macías Bobadilla  
GENERAL COORDINATOR CONiIN  
ENGINEERING FACULTY



# 1er Congreso Nacional

## Políticas, Programas y Proyectos para el Rescate del Campo Mexicano



Chapingo, Estado de México, a 20 de octubre de 2018  
CARTA DE ACEPTACIÓN

**IXCHEL PAROLA CONTRERAS**


**PRESENTE**

Por este medio le informamos que su documento titulado **PRODUCCIÓN BAJO AGRICULTURA PROTEGIDA, SITUACIÓN ACTUAL EN MÉXICO** ha sido oficialmente aceptado por el Comité de Revisión de Ponencias del "PRIMER CONGRESO NACIONAL: POLÍTICAS, PROGRAMAS, Y PROYECTOS PARA EL RESCATE DEL CAMPO MEXICANO", por lo que esperamos contar con su asistencia al evento del 5 al 8 de noviembre del presente año.

Una vez aceptado su trabajo se le sugiere realizar las observaciones que se marcan en su documento, mismo que le será devuelto a la brevedad, si desea que pueda ser considerado para una probable publicación.

Agradecemos su interés por participar en este evento, sin duda sus aportaciones contribuirán en el desarrollo de las propuestas de política del sector agropecuario y forestal de México.

ATENTAMENTE

  
**DR. JAVIER RUIZ LEDESMA**  
**COORDINADOR DEL CONGRESO**



La Sociedad Científica Mexicana de Ecología  
y la Facultad de Ciencias Naturales de la  
Universidad Autónoma de Querétaro

otorgan la presente

## CONSTANCIA

a

**Ixchel Parola-Contreras, Ana Angélica Feregrino-Pérez, Irineo Torres-Pacheco,  
Rosalia Virginia Ocampo-Velázquez, Alejandra Rojas-Molina,  
Iza Fernanda Pérez-Ramírez, Ramón Gerardo Guevara-González.**


por su contribución con la ponencia titulada


**Aplicación de eustresores como estrategia de conservación de plantas silvestres  
como *Heliopsis longipes* para el incremento de la concentración de afinina.**

en el simposio titulado

**Posibilidades de uso industrial para plantas de México:  
actividades biológicas de interés y su manejo durante su cultivo.**

en el **VII CONGRESO MEXICANO DE ECOLOGÍA**  
celebrado del 29 de septiembre al 4 de octubre de 2019

  
**Dr. Pedro Luis Valverde Padilla**  
Presidente de la  
Sociedad Científica Mexicana de Ecología

  
**Dr. Humberto Suzán Azpiri**  
Presidente del  
Comité Organizador Local

Juriquilla, Santiago de Querétaro, Querétaro.



**ANEXO 14** Manual de producción de chilcuague (*H. longipes*) en condiciones de invernadero con elicitación controlada

Ver archivo adjunto

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ