



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de biofactorías vegetales para la producción y extracción de antocianinas a partir de Col Lombarda (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Christian Israel Andrade Romero

Tutor: Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

Ambato – Ecuador

Febrero – 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 17 de enero del 2025



Firmado electrónicamente por:
**LILIANA PAULINA
LALALEO CORDOVA**

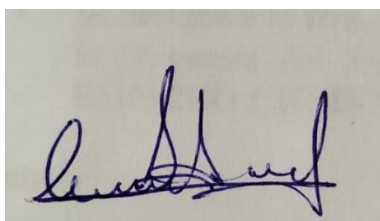
Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

1803601853

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Christian Israel Andrade Romero, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las referencias bibliográficas.



Christian Israel Andrade Romero

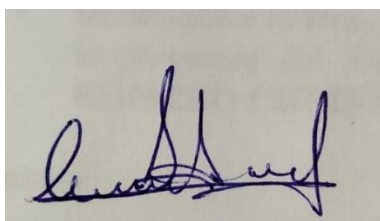
0106774813

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Christian Israel Andrade Romero

0106774813

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO MANOLO
SALAZAR GARCÉS**

Presidente del Tribunal



Firmado electrónicamente por:
**MARIA EUGENIA
GARCIA PAZMIÑO**

Mg. María Eugenia García Pazmiño
2100248505



Firmado electrónicamente por:
**MARIA DANIELA
GARCÉS MONCAYO**

Mg. María Daniela Garcés Moncayo
1803571585

Ambato, 30 de enero de 2025

DEDICATORIA

*A mi madre **Miriam**, el primer y único amor de mi vida, quien siempre me apoyo y confió en mí a pesar de las dificultades y la distancia, eres y siempre serás el mejor ejemplo de resiliencia para mí, gracias por enseñarme a no rendirme, por tu amor incondicional, tus consejos y todos los momentos felices que me has brindado.*

*A mi padre **Julio**, quien en otra vida hubiese visto a su diablito chiquito cumplir sus sueños y lograr lo que se propuso, siempre serás la estrella más brillante en el firmamento, gracias por ser mi guía en los momentos difíciles siempre estarás en mi corazón, papá.*

*A mis hermanos **Isaac y Eva**, quienes han sido mi motivo de seguir adelante y nunca rendirme, espero ser su ejemplo de superación y que nunca dejen de soñar por sus sueños mis niños que yo estaré aquí para apoyarlos.*

*A mi tío, **Iván** quien ha sido como un padre para mí y me apoyo en todos estos años de universidad pese a las adversidades.*

*A mi abuela, **Hercila** cuya ausencia dejó un vacío para todos y siempre quiso ver a su nieto graduado, quien me cuido desde que llegue a Zamora y ahora me cuida desde el cielo. Mamita Cila este logro también es tuyo.*

*A la personita que hizo todo esto posible y siempre siguió adelante a pesar de las batallas internas que tenía, **Yo**, recuerda que siempre lograras lo que te propongas y llegar hasta aquí es la prueba más fuerte que la tristeza y la soledad nunca te ganaron, a mí por sobrevivir.*

Con amor, Christian

AGRADECIMIENTO

A todas las personas que fueron parte de esta aventura y me acompañaron en todo momento sin importar las circunstancias;

A mi querida madre, por todo su amor y apoyo, porque se el esfuerzo tan grande que hiciste por ver a tu primer hijo graduarse de la universidad, gracias por nunca dejarme solo.

A mis hermanos, por sus mensajes, amor, confianza y los momentos que pudimos compartir a pesar de que nos separaban 563 km, espero algún día yo estar orgullosos de ustedes por lograr mucho más de lo que yo hice hasta hoy.

A mi familia, especialmente a mis tíos Nancy, Iván, Damaris, Tatuka y Dicson quienes de alguna u otra forma me ayudaron a llegar hasta aquí y me apoyaron en cada decisión.

A mis reales y beyas; que hubiese sido de mí sino hubiésemos coincidido, gracias por todos los buenos momentos que vivimos, por sus consejos y regaños, por aguantarme y cuidarme, han sido como hermanas mayores para mí durante todo este tiempo, me faltarían palabras para expresar cuan agradecido estoy y solo puedo pedirle a la vida que nunca deje de hacernos coincidir en el futuro.

A Rebe, mi roomie y compañera de aventuras, con quien cruce el atlántico por cumplir nuestros sueños, gracias por ser mi apoyo cuando no sabía dónde ir, por aguantarme y cuidarme y sobre todo por no dejarme solo cuando me dejaron con todo el amor en las manos, gracias, mi Rebequita.

A Caro, por su cariño, paciencia y consejos, por haber coincidido de una forma tan extraña pero que nos hizo ser amigos, gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos y que la vida nos permita seguir disfrutándolos. Gracias, Papito.

A Yayi, Mika y Triko, la familia de rebe que me acogió en su casa como un hijo más, por hacerme sentir como en casa y ser mi segundo hogar, por permitirme estar con ustedes pese a ser un total desconocido.

A mi tutora, Dra. Liliana Lalaleo (Nuestra hermana mayor), por aguantar a este chico con sueños gigantes, por su paciencia y sus consejos, por confiar en mí desde que le moleste tanto para ser su tesista y no rendirse conmigo, gracias por todo su apoyo como amiga y docente.

A todos los docentes que me brindaron sus conocimientos y me ayudaron a superarme y amar cada día más la biotecnología, Dr. William Calero, Ing. Christian Galarza, Ing. Alex Valencia, Ing. Ale Sánchez, Ing. Helena de la Torre; ustedes son el reflejo de quien quiero llegar a ser.

A Paty y Vale, quienes han tenido que verme a diario en sus laboratorios, gracias por su ayuda y guía para realizar este trabajo a pesar de sus tareas y ocupaciones, sin su ayuda no lo hubiese logrado.

A todo el team de Panda Sushi Rolls, por su apoyo y ayuda en cada momento difícil, especialmente a las personas que se hicieron amigos más allá del trabajo, Joss, Giss, Silvia, Jona, Samba, Joe e Iván.

A todos los que han sido parte de este viaje, les debo más de lo que las palabras pueden expresar. Este logro es tan mío como suyo.

Agradecido de todos los momentos lindos que pude disfrutar, y de todas las personas que fueron parte de ellos. Estos años me los llevo en el corazón por siempre, como un recordatorio de que lo importante es seguir adelante, sin dejar de soñar.

Gracias por todo lo que me han brindado y perdón por tan poco.

Chris

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	xiv
RESUMEN EJECUTIVO	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Taxonomía de la Col Lombarda	2
1.1.2. Características fisicoquímicas y valor nutricional	3
1.2. Producción de antocianinas de origen vegetal.....	3
1.3. Antocianinas en <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>	4
1.4. Micropropagación de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>	4
1.5. Estrategias para mejorar la producción de antocianinas en <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>	5
1.5.1. Estimuladores de crecimiento	5
1.5.2. Transformación Genética.....	5

1.6.	Objetivos.....	8
1.6.1.	Objetivo general.....	8
1.6.2.	Objetivos específicos	8
CAPÍTULO II		9
METODOLOGÍA		9
2.1.	Materiales	9
2.2.	Métodos	11
2.2.1.	Obtención del material vegetal y desinfección de semillas	11
2.2.2.	Optimización de cultivos	12
2.2.3.	Transformación genética con <i>A. rhizogenes</i> cepa salvaje y factores de transcripción	13
2.2.4.	Confirmación genética de las raíces transformadas	14
2.2.5.	Extracción de antocianinas	15
2.2.6.	Determinación de antocianinas totales.....	15
2.2.7.	Análisis de la actividad antiinflamatoria por desnaturalización de albúmina.....	17
2.2.8.	Análisis estadístico	18
CAPÍTULO III.....		19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		19
3.1.	Tratamiento de semillas previo a la obtención de plántulas in vitro de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>	19
3.2.	Optimización de cultivos.....	20
3.3.	Estimulación de cultivos in vitro de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> . f. <i>rubra</i>	22
3.4.	Análisis de la concentración relativa de antocianidinas	24
3.5.	Análisis del contenido total de antocianinas.....	26
3.6.	Análisis de la capacidad antioxidante.....	28
3.7.	Análisis de la actividad antiinflamatoria	29
3.8.	Análisis Estadístico	30
CAPÍTULO IV.....		34
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		34
4.1.	Conclusiones.....	34

4.2. Recomendaciones	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de reactivos	9
Tabla 2. Listado de equipos y material fungible	10
Tabla 3. Tratamientos previos al cultivo de semillas de col morada	12
Tabla 4. Secuencias de cebadores específicos para PCR	15
Tabla 5. Longitudes de onda máximas de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) de las principales antocianidinas	16
Tabla 6. Diseño Factorial AxB para el análisis estadístico	18
Tabla 7. Descripción de los componentes inorgánicos y orgánicos para un litro (L) de medio MS completo.....	50
Tabla 8. Descripción de los componentes inorgánicos y orgánicos para un litro (L) de medio MS libre de nitratos.....	51
Tabla 9. Tratamientos de semillas para la obtención de plántulas de col lombarda	52
Tabla 10. Concentración de las diferentes antocianidinas presentes en los extractos de los medios empleados y su total.....	53
Tabla 11. Análisis de la varianza del contenido total de antocianinas, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria del extracto de antocianinas de plántulas.....	54
Tabla 12. Análisis de la varianza del contenido total de antocianinas, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria del extracto de antocianinas de las raíces transformadas	55
Tabla 13. Análisis estadísticos de los tratamientos mediante prueba de Tukey.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variedades existentes de col lombarda (<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>).....	2
Figura 2. Ruta de los fenilpropanoides	7
Figura 3. Etapas y tiempos de desinfección de semillas	11
Figura 4. Proceso de micropropagación in vitro de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i> a partir de semillas	13
Figura 5. Procedimiento para la transformación de explantes foliares de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i> mediada por <i>A. rhizogenes</i>	14
Figura 6. Resultados del cultivo de semillas de col morada para la obtención de plántulas.....	20
Figura 7. Crecimiento (cm) de las plántulas de col lombarda en medio MS sólido	22
Figura 8. Raíces transformadas de col morada con <i>A. rhizogenes</i> en los diferentes medios	23
Figura 9. Análisis PCR del ADN genómico de raíces transformadas de col morada con <i>A. rhizogenes</i>	23
Figura 10. Concentración relativa de las diferentes antocianidinas presentes en los extractos a diferentes condiciones experimentales.....	25
Figura 11. Mapa de calor de la acumulación relativa de antocianidinas en diferentes condiciones experimentales	26
Figura 12. Contenido Total de Antocianinas (CTA) en los extractos a diferentes condiciones experimentales	27
Figura 13. Capacidad antioxidante por el método DPPH	29
Figura 14. Actividad antiinflamatoria a diferentes concentraciones.....	30
Figura 15. Medias marginales del contenido total de antocianinas del ANOVA de diseño factorial AxB	31
Figura 16. Medias marginales de la capacidad antioxidante del ANOVA de diseño factorial AxB ..	32
Figura 17. Medias marginales de la actividad antiinflamatoria del ANOVA de diseño factorial AxB	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composiciones de los medios MS y MS S/N	50
Anexo 2. Resultados de los tratamientos post-desinfección.....	52
Anexo 3. Resultados de la concentración relativa de antocianidinas	53
Anexo 4. ANOVA del diseño factorial con dos factores en plántulas.....	54
Anexo 5. ANOVA del diseño factorial con dos factores en raíces transformadas	55
Anexo 6. Pruebas post hoc con análisis estadístico HSD de Tukey	56

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **AS:** Ácido Salicílico
- **CS:** Cepa Salvaje
- **CTA:** Contenido Total de Antocianinas
- **GUS:** Gen reportero de Beta-glucoronidasa
- **MeJA:** Metil Jasmonato
- **MS S/N:** Murashige & Skoog sin nitratos
- **MS:** Murashige & Skoog
- **MYB:** Factor de transcripción MYB12 de *Arabidopsis thaliana*
- **PGRs:** Reguladores de crecimiento de las plantas
- **RT:** Raíces transformadas

RESUMEN EJECUTIVO

En esta investigación, se optimizó el proceso de desinfección y germinación de semillas, expuestas a diferentes condiciones experimentales como: medios de cultivo (Murashige y Skoog Completo y sin nitratos); reguladores de crecimiento (Metil Jasmonato y Ácido Salicílico) y transformación genética (AtMYB12 y GUS) para obtener plántulas y raíces transformadas. Se obtuvieron extractos para analizar el contenido total de antocianinas, capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Los análisis mostraron que el uso de Ácido Giberélico a 4 grados, mejora la tasa de germinación en un 83.33 por ciento. El medio Murashige y Skoog sin nitratos favoreció la acumulación de antocianinas en las plántulas, alcanzando un contenido total de antocianinas de 45.07 mg Cianidina-3-glucósido por 100g, con una capacidad antioxidante del 65 por ciento y actividad antiinflamatoria de 76.49 por ciento. En las raíces transformadas el factor de transcripción AtMYB12 en medio completo Murashige y Skoog reportó mejores resultados con un contenido total de antocianinas de 49.49 mg Cianidina-3-glucósido por 100g; capacidad antioxidante de 72.10 por ciento y actividad antiinflamatoria de 79.4 por ciento. Los resultados estadísticos sugieren que el medio de cultivo influye en la producción de antocianinas y en las raíces transformadas en el factor de transcripción es el más relevante. Los resultados sugieren que la transformación genética y optimización de condiciones de cultivo pueden aumentar la producción de antocianinas, con aplicaciones potenciales a escala industrial.

Palabras clave: biofactorías vegetales, col morada, antocianinas, AtMYB12, MeJA, AS, transformación genética.

ABSTRACT

In this research, the seed disinfection and germination process was optimized, exposed to different experimental conditions such as: culture media (Murashige and Skoog Complete and without nitrates); growth regulators (Methyl Jasmonate and Salicylic Acid) and genetic transformation (AtMYB12 and GUS) to obtain transformed seedlings and roots. Extracts were obtained to analyze total anthocyanin content and antioxidant and anti-inflammatory capacities. Analyses showed that the use of Gibberellic Acid at 4 degrees improved the germination rate by 83.33 percent. The Murashige and Skoog medium without nitrates favored the accumulation of anthocyanins in the seedlings, reaching a total anthocyanin content of 45.07 mg Cyanidin-3-glucoside per 100 g, with an antioxidant capacity of 65 percent and anti-inflammatory activity of 76.49 percent. In the transformed roots the transcription factor AtMYB12 in Murashige and Skoog complete medium reported better results with a total anthocyanin content of 49.49 mg Cyanidin-3-glucoside per 100 g; antioxidant capacity of 72.10 percent and anti-inflammatory activity of 79.4 percent. Statistical results suggest that the culture medium influences the production of anthocyanins, and the transformed roots in the transcription factor are the most relevant. These results suggest that genetic transformation and the optimization of culture conditions can increase anthocyanin production.

Key words: plant biofactories, purple cabbage, anthocyanins, AtMYB12, MeJA, AS, genetic transformation

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

La Col Lombarda (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*) es una verdura crucífera ampliamente cultivada por su valor nutricional y composición fitoquímica debido a la presencia de varios metabolitos secundarios de interés industrial a nivel alimentario, farmacéutico, cosmético y nutracéutico (Belwal et al., 2020a; Ullah et al., 2020).

Los principales compuestos de la col lombarda son las antocianinas, isotiocianatos, polifenoles y vitaminas A, B y C (Nawaz et al., 2018), además se ha encontrado otros fitoquímicos en extractos metanólicos como alcaloides, carotenoides, esteroides, flavonoides, fenoles, fitoesteroles, glucosinolatos, polifenoles, saponinas, selenio, taninos y terpenoides (Biala & Jasiński, 2018); estos compuestos presentan actividades biológicas importantes como la capacidad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antihiper glucémica, anticancerígena, cardioprotectora, hipolipidémica y neuroprotectora (Zhang et al., 2021; Mejías et al., 2024).

Las antocianinas son derivados fenólicos de gran interés, sin embargo, su disponibilidad se ve afectada debido a que se requieren optimizar procesos para la producción, extracción y purificación (Tan et al., 2023). Actualmente se emplean microorganismos genéticamente modificados (MGM) como alternativa donde predomina *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Belwal et al., 2020a), pero estas plataformas requieren al menos 11 transgenes para inducir la síntesis de antocianinas simples como la pelargonidina, lo que implica un mayor coste energético, económico y tiempo (Zha & Koffas, 2017).

La biotecnología es una opción sostenible para el cultivo y posterior extracción a nivel *in vitro*, dado que la micropropagación se da en tiempos cortos, de forma ilimitada y se puede utilizar diferentes explantes desde protoplastos hasta raíces, hojas y peciolo (Gerszberg, 2018). Una alternativa de producción son las biofactorías vegetales, debido a que las plantas poseen los genes necesarios para sintetizar antocianinas de forma natural (Appelhagen et al., 2018).

La implementación de biofactorías vegetales combinado con técnicas de estimulación o sobreexpresión es una alternativa prometedora para aumentar la acumulación de antocianinas en la col lombarda (Thakur et al., 2019); por un lado; Halder et al (2019) destaca el uso de MeJA y AS que si bien actúan como inductores de estrés aumentando la respuesta metabólica y síntesis de metabolitos secundarios también son participan en la regulación del crecimiento y desarrollo celular (Shi et al., 2023a).

Por otro lado, **Jha et al (2023)** menciona que la transformación genética permite modificar rutas metabólicas aumentando la producción de metabolitos como las antocianinas al actuar en la ruta de los fenilpropanoides, específicamente al sobreexpresar y/o inhibir ciertos factores de transcripción que regulan la síntesis de antocianinas, al utilizar *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como vector natural en la transformación (**Kubra et al., 2021**).

Si bien estos enfoques han mostrado tener efectos sinérgicos para la acumulación de antocianinas en otras especies como *Daucus carota*, *Vitis vinífera* y *Fragaria ananassa* o en MGM (**Murthy et al., 2023; Belwal et al., 2020**), sin embargo, el rendimiento y eficiencia respecto al contenido total de antocianinas es bajo. Cabe destacar que hasta el momento dichas estrategias no han sido exploradas completamente en la col lombarda, por lo cual la aplicación de estos enfoques podría resultar interesante para mejorar la bioproducción de antocianinas en esta especie vegetal.

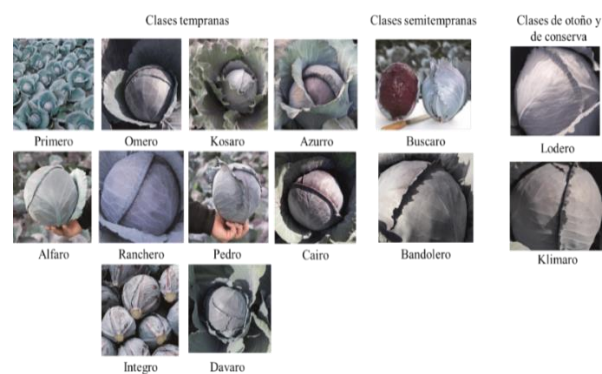
En base a los antecedentes mencionados es interesante investigar alternativas para la bioproducción de antocianinas y optimización de procesos para en un futuro llevarlo a escala industrial. Por tanto, el presente proyecto busca evaluar matrices como las biofactorías vegetales de col lombarda en presencia de reguladores biológicos (transformación genética con factores de transcripción) o químicos (MeJA y AS) para evaluar si incrementan la acumulación de antocianinas.

1.1.1. Taxonomía de la Col Lombarda

La col lombarda, repollo morado, col morada o berza morada, es una crucífera de la familia *Brassicaceae*, perteneciente al género *Brassica* y de la gran especie *Brassica oleracea*, correspondiente a la variedad *capitata* y al grupo *rubra*. Existen 15 variedades de esta especie según **Narvaez & Segura (2021)**, las cuales se clasifican de acuerdo con su estado de maduración en clases tempranas, clases semitempranas y clases de otoño y de conserva como se muestra en la figura 1.

Figura 1.

Variedades existentes de col lombarda (B. oleracea var. capitata f. rubra)



Fuente: (Narvaez & Segura, 2021)

1.1.2. Características fisicoquímicas y valor nutricional

La col lombarda presenta un perfil nutricional interesante debido a la presencia de macro y micronutrientes esenciales con propiedades antioxidantes, posee un bajo contenido calórico, es rica en fibra con propiedades laxantes, vitaminas esenciales y un aporte significativo de minerales; además su alto contenido en agua es útil en dietas (Vega et al., 2023a).

De acuerdo con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2022); 100 gramos de col lombarda contienen 90,39% de agua ideal para hidratación y control de peso; además contiene 6.79 g de carbohidratos de los cuales la mayor parte proviene de la fibra dietética (2.1 g), y 3.83 g de azúcares totales correspondientes a monosacáridos como la glucosa (1.74 g) y fructosa (1.48 g), y disacáridos como la sacarosa (0.6g).

Además contiene una variedad de vitaminas, como la vitamina A con 56 µg RAE (6%) importante para la visión y el sistema inmune (Mejías et al., 2024), vitaminas del complejo B esenciales para el metabolismo energético y el funcionamiento del sistema nervioso (Gandhi et al., 2022) tales como Tiamina con 0.064 mg (5%), Riboflavina con 0.069 mg (5%), Niacina con 0.418 mg (3%), Ácido Pantenico con 0.147 mg (3%), Piridoxina con 0.209 mg (12%) y otras vitaminas como Colina con 17.1mg (3%) y Folato con 18 µg (4%) necesarias para funciones celulares y neurológicas (Xiao et al., 2012).

De igual forma, vitamina C con 53.9 mg de Ácido Ascórbico (61%) como fuente de antioxidantes para reparar tejidos (Statilko et al., 2024), vitamina K esencial para la coagulación sanguínea y salud ósea (Zhang et al., 2024) como filoquinona con 32.3 mg (32 %), Dihidrofiloquinona y Menaquinona-4 con <0.1 mg (1%), y vitamina E importante por ser antioxidante de lípidos previniendo el envejecimiento prematuro (Lee et al., 2020) en forma de tocoferoles y tocotrienoles, siendo el más predominante el α -tocoferol con 0.11 mg (1%).

1.2. Producción de antocianinas de origen vegetal

Stoica et al. (2023) indica que las antocianinas son metabolitos secundarios solubles glicosilados del grupo fenólico. Diversas especies poseen antocianinas con un perfil único, donde prevalecen la cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, malvidina y petunidina (Khoo et al., 2017). Sin embargo, su disponibilidad es afectada por factores como el pH, luz, temperatura y otros, al igual que la extracción, estabilidad a largo plazo y su producción a nivel industrial (Passeri et al., 2016).

Las principales fuentes de antocianinas son cereales (20%), frutas (26%) y flores (54%), sin embargo, la producción mundial se ve marcada por el uso de MGM como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Belwal et al., 2020a), pero estas plataformas requieren al menos 11 transgenes para inducir la síntesis de antocianinas simples como la pelargonidina, lo que implica un mayor coste energético, económico y tiempo (Zha & Koffas, 2017).

Además, la obtención en estas plataformas presenta baja eficiencia siendo de 74,8 mg/L (**Yan et al., 2008**) y de 15,1 mg/L (**Xu et al., 2022**) respectivamente, por lo cual es más eficiente la extracción a partir de especies vegetales donde el rendimiento es estable hasta 30 mg/g peso seco (**Appelhagen et al., 2018**).

1.3. Antocianinas en *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*

La col lombarda contiene diferentes antocianinas con mejor termoestabilidad respecto a otras especies producto de sus estructuras aciladas (**Stoica et al., 2023**), contiene 36 antocianinas diferentes y más del 50% son glucósidos de cianidina con diferentes tonos desde rojizos a pH ácido hasta amarillos a pH básico (**Kalthum Ib et al., 2011**).

Sin embargo, el perfil completo de la col morada no se ha logrado caracterizar, algunos autores informan el uso de técnicas analíticas como HPLC, donde se ha determinado 8, 13 y 20 antocianinas (**Ahmadiani et al., 2014**, **Fang et al., 2018**, **Wiczowski et al., 2013**), donde predominan ácidos derivados de la cianidina-3-diglucósido-5-glucósido, como el ácido ferúlico, sinápico, cafeico y p-cumárico (**Fenger et al., 2019**; **Ghareaghajlou et al., 2021**).

1.4. Micropropagación de *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*

Una alternativa de producción son las biofactorías vegetales, debido a que las plantas poseen los genes necesarios para sintetizar antocianinas de forma natural (**Appelhagen et al., 2018**); sin embargo, a nivel industrial pierden estabilidad y el rendimiento es variable.

En los últimos años se han estudiado cultivos celulares, las especies utilizadas son *Daucus carota*, *Vitis vinífera* y *Fragaria ananassa* (**Murthy et al., 2023**); con un contenido total de antocianinas de 3.03 mg/g peso seco y 3.41 mg/g peso fresco (**Barba et al., 2020**; **Saad et al., 2018**); 4.6 mg/g peso seco y 1.02 mg/g peso fresco (**Cai et al., 2012**; **Yin et al., 2012**); y 1.2 mg/g peso fresco (**Asano et al., 2002**) respectivamente; en contraste algunos estudios informan valores máximos de 1780 mg/g peso seco y 188 mg/g peso fresco en la col lombarda (**Ahmadiani et al., 2014**).

Se han informado protocolos eficientes para la micropropagación de col lombarda con explantes como protoplastos (**Chen et al., 2004**), microsporas (**Mineykina et al., 2021**), cotiledones e hipocótilos (**Gambhir et al., 2017**), yemas (**Pavlović et al., 2013**), raíces, hojas y peciolo (**Daud et al., 2015**; **Gambhir & Srivastava, 2015**); sin embargo, la eficiencia de regeneración depende del genotipo, tipo de explantes, medio y reguladores de crecimiento (**Gerszberg et al., 2015**).

La mayoría de los estudios emplean Murashige y Skoog como medio para germinación, por el contrario, para inducir callos y raíces se emplean auxinas y citoquinas (**Hasan et al., 2021**), sin embargo, algunos autores informan que usar auxinas disminuye la producción y acumulación de antocianinas (**Siatka, 2019**; **Wang et al., 2018**).

1.5. Estrategias para mejorar la producción de antocianinas en *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*

1.5.1. Estimuladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento de las plantas (PGRs) de acuerdo con **Sehgal & Joshi (2022)** son compuestos químicos que permiten modular el crecimiento permitiendo un correcto desarrollo de los órganos de las plantas, tales como el Metil Jasmonato (MeJA) y Ácido Salicílico (AS); además varios estudios informan que estos reguladores influyen en la acumulación de estos metabolitos debido principalmente a que también actúan en las líneas de defensa en respuesta al estrés biótico y abiótico (**Shi et al., 2023a**).

El MeJA según **Moreno et al. (2024)** podría estar implicado en procesos fisiológicos del desarrollo como la regulación del alargamiento celular, mientras que el AS como estimulador en procesos como la germinación, floración y senescencia (**Koo et al., 2020**). Sin embargo, se ha demostrado que inhiben el crecimiento a altas concentraciones (**Krokene et al., 2023**).

Li et al. (2018) realizaron un estudio en especies como *Helianthus annuus*, *Solanum lycopersicum* y *Glycine max* con diferentes concentraciones de MeJA dando como resultado que las concentraciones altas causan una disminución en la altura (39%) y la biomasa (79%), además genera cambios anatómicos en las hojas, aunque los efectos varían con la especie; por su parte **Gul et al. (2023)** reportó cambios en raíces, brotes y tamaños de *S. lycopersicum*.

Respecto al AS, aunque su papel en la inmunidad sistémica ha sido bien informado (**Zhong et al., 2021**), su acción sobre el crecimiento aun no es claro; aunque diversos estudios muestran pruebas indudables de su rol en la división y expansión celular meristemática alterando procesos que determina la altura final de la planta (**Li et al., 2022**).

Estudios en *Cucumis sativus*, *Triticum aestivum*, *Arabidopsis thaliana*, y otros (**Pasternak et al., 2019a**); muestran que concentraciones mayores a 1 mM de AS disminuyen considerablemente la germinación y el crecimiento radicular primario afectado a otros procesos fisiológicos importantes como la elongación, ramificación y enraizamiento lo que conduce a la atrofia de la planta (**Bagautdinova et al., 2022**).

1.5.2. Transformación Genética

La biosíntesis de antocianinas implica genes biosintéticos tempranos (EBG) y tardíos (LBG) activados por factores de transcripción, en este caso la ingeniería metabólica es una forma de acumular antocianinas (**Song et al., 2018**), sin embargo, el proceso puede resultar ambiguo debido a la diversidad de metabolitos, genes y enzimas comprometidos en las rutas, por consecuente, los enfoques más eficientes radican en la sobreexpresión de factores de transcripción reguladores de genes (**Hidalgo et al., 2017**).

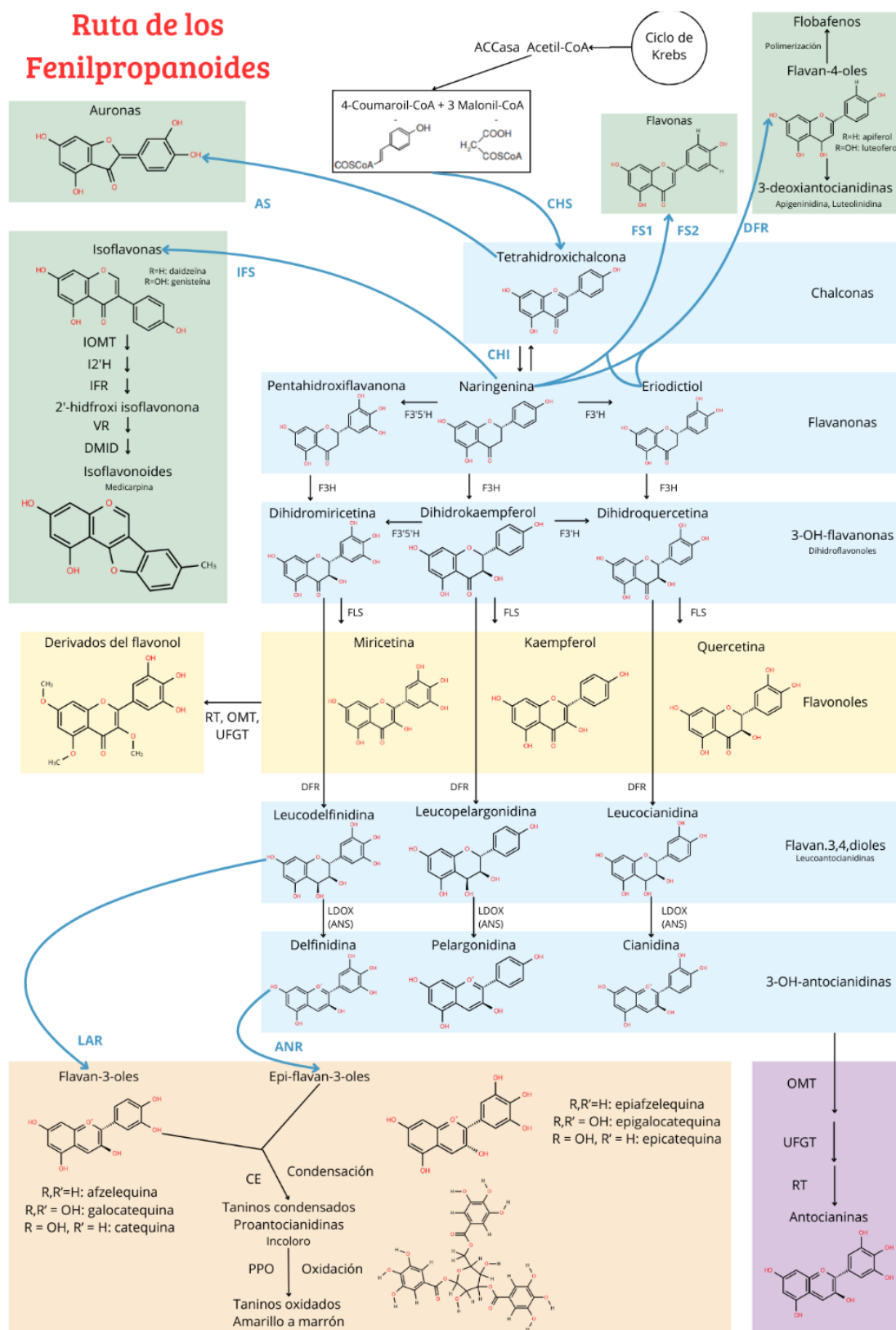
Las antocianinas derivan de la ruta de los fenilpropanoides como se observa en la figura 2 producto de la desaminación de fenilalanina con ayuda de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en ácido transcinámico, el cual se hidroliza en 4-cumarato activándose con la Coenzima A (CoA) para formar 4-cumaroil-CoA, paralelamente 3-malonil-CoA se forma a partir del Acetil-CoA mediante la ayuda de la acetil-CoA carboxilasa, siendo estos dos compuestos los principales precursores de la ruta (**Lepiniec et al., 2006**).

En general esta ruta esta mediada por organizaciones enzimáticas (metabolones) entre la Chalcona Sintasa e Isomerasa (CHS y CHI), Dihidroflavonol-4-Reductasa (DFR), Flavonona-3-Hidroxilasa (F3H), Flavonol Sintasa (FLS) y Antocianidina Sintasa (ANS), UFGT (UDP-glucosa: antocianidina 3-O-glucosiltransferasa) entre otras (**Ferrer et al., 2008**), permitiendo que se formen (iso)flavonoides, monolignoles y antocianinas (**Biała & Jasiński, 2018**).

Autores como **Liu et al. (2015)** han analizado la sobreexpresión y/o inhibición de proteínas homólogas del oncogén viral (MYB) de mieloblastosis V-myb una familia de factores de transcripción que regulan positivamente la biosíntesis de antocianinas (**Farré et al., 2014**). AtMYB12 y su mecanismo de acción han sido estudiado a fondo en la producción de metabolitos que derivan de la ruta de los fenilpropanoides (**Misra et al., 2010**), especialmente en *A. thaliana* donde la transformación genética esta mediada por *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* (**Gerszberg, 2018**). Este factor afecta positivamente al metabolismo primario y secundario en la biosíntesis de flavonoides en la raíz (**Hidalgo et al., 2017; Stracke et al., 2007**), activando genes enzimáticos de F3H, FLS, CHS y CHI (**Pandey et al., 2012, 2014**).

Actuar en la ruta de los fenilpropanoides permite la acumulación de antocianinas en las vacuolas, debido a que la misma es una forma de protección contra el estrés biótico y abiótico desencadenando diversas rutas de señalización que conducen a la síntesis de antocianidinas principales precursores de las antocianinas (**Dabravolski & Isayenkov, 2023; Z. Li & Ahammed, 2023**).

Figura 2.
Ruta de los fenilpropanoides



Fuente: Adaptado de Lepiniec et al. (2006)

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Evaluar biofactorías vegetales para la producción y extracción de antocianinas a partir de Col Lombarda (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)

1.6.2. Objetivos específicos

- Optimizar el cultivo in vitro de semillas para la obtención de plántulas genéticamente uniformes de col lombarda (*B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)
- Estimular los cultivos in vitro de col lombarda con reguladores de crecimiento y el factor de transcripción AtMYB12
- Analizar la capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de las antocianinas producidas en cultivos de col lombarda (*B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*)

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental, el mismo que se llevó a cabo en los laboratorios académicos y el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (UODIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. En la Tabla 1 se enlistan los reactivos y en la Tabla 2 el material fungible y equipos utilizados durante la investigación

Tabla 1.

Listado de reactivos

Reactivos	
2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH)	Diclofenaco de Sodio
Acetato de Sodio	Etanol 70 y 96 %
Acetosiringona	Extracto de Carne
Ácido Acético Glacial	Extracto de Levadura
Ácido Bórico	Glicerol
Ácido Clorhídrico	Hidróxido de Sodio
Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)	Hipoclorito de Sodio 5%
Ácido Salicílico	Isopropanol
Agarosa	Master Mix
Agua Destilada	Medio Murashige & Skoog
Agua Estéril	Medio Murashige & Skoog Nitrate Free
Agua Libre de Nucleasas	Metanol
Agua Ultrapura	Metil Jasmonato
Alcohol Isoamílico	Peptona
Azul de Bromofenol	Phytigel
Bacto-Agar	Proteinasa K
B-Mercaptoetanol	Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS)
Bromuro de Hexadecitrimetilamonio (CTAB)	Sucrosa
Claforan	Sulfato de Manganeso Heptahidratado
Cloroformo	Tris Base
Cloruro de Potasio	Tween 20
Cloruro de Sodio	Xileno Cianol

Tabla 2.*Listado de equipos y material fungible*

Equipos	Material Fungible
Agitador Orbital	Bisturís
Autoclave	Botellas de Vidrio Tapa Azul 100, 250, 500 y 1000 mL
Balanza Analítica	Cebadores
Cámara Climática	Cepas Genéticamente Modificadas de <i>A. rhizogenes</i>
Cámara de Electroforesis	dNTPs
Centrífuga	Espátulas
Congelador	Filtros de Jeringa 25 mm
Destilador de Agua	Frasco Ámbar 120 mL
Espectrofotómetro	Jeringas 1 y 3 mL
Incubadora	Magnetos Elicrom
Microcentrífuga	Matraces de 250 mL
Microondas	Micropipeta 0.5 – 10, 20 – 200 y 100 – 1000
NanoDrop	Papel Aluminio
Nevera	Paquete de Fundas Ziploc
Plancha de Calentamiento	Paquete de Vasos Plásticos de 16 oz
Potenciómetro	Pinzas
Termociclador	Placas Petri
Ultracongelador	Probeta 100 mL
Vórtex	Puntas de Micropipeta Amarillas y Azules
	Rollo de Parafilm
	Semillas de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> f. <i>rubra</i>
	Tubos de PCR 2 mL
	Tubos Eppendorf 1.5 mL
	Tubos Falcon 10 mL y 50 mL

2.2. Métodos

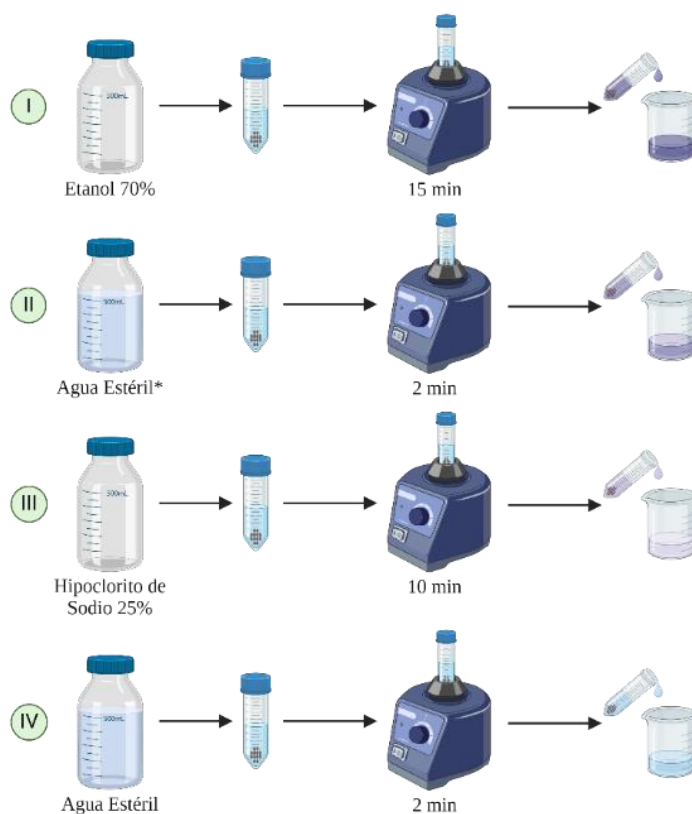
2.2.1. Obtención del material vegetal y desinfección de semillas

Las semillas de *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*, se obtuvieron de la casa comercial “El Huerto”; las cuales se desinfectaron siguiendo el protocolo mostrado en la figura 3 descrito por **Hasan et al. (2021)** con ligeras modificaciones en los tiempos empleados con la finalidad de eliminar el recubrimiento de las semillas y reducir cualquier tipo de contaminación en el proceso de micropropagación.

Primero, se lavaron con etanol al 70% por 15 min. Luego, se enjuagaron tres veces con agua estéril en tiempos de 2 min. Posteriormente, se colocaron en solución de hipoclorito de sodio al 25% con 0.2 mL de Tween 20 por 10 min. Finalmente, se enjuagaron con agua estéril tres veces durante 2 min. Todos los lavados se realizaron con agitación constante con la ayuda de un vortex.

Figura 3.

Etapas y tiempos de desinfección de semillas



Nota: **I)** Primera etapa con etanol al 70%; **II)** Segunda etapa lavados de agua destilada estéril; **III)** Tercera etapa con solución de hipoclorito 25% + tween 20; **IV)** Cuarta etapa lavados con agua destilada estéril.

Posteriormente las semillas desinfectadas fueron sometidas a 6 tratamientos previos a la germinación como se muestra en la Tabla 3 a diferentes temperaturas y en solución con ácido giberélico 500 μ M (AG3), con la finalidad de interrumpir la dormancia y mejorar el proceso germinativo, disminuir la tasa de contaminación y analizar la tasa promedio de germinación.

Tabla 3.

Tratamientos previos al cultivo de semillas de col morada

Tratamiento	Condiciones post-desinfección
1	4 °C en solución de AG3
2	25 °C en solución de AG3
3	-20 °C en solución de AG3
4	25 °C con luz
5	25 °C en oscuridad
6	Desinfección normal

Nota: Las semillas del tratamiento 6 fueron sembradas posterior a la desinfección para analizar la germinación, contaminación y promedio de germinación.

2.2.2. Optimización de cultivos

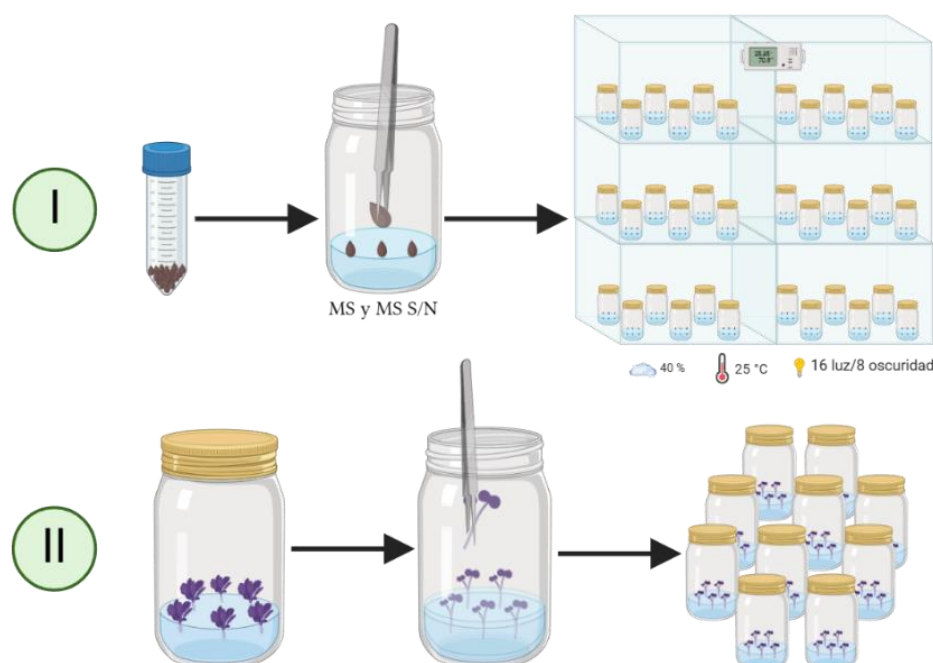
Posterior al proceso de desinfección y exposición da los tratamientos, se cultivaron las semillas en vasos plásticos de 16 oz en medio de cultivo sólido Murashige & Skoog completo (MS) y libre de nitratos (MS S/N) para la elaboración de estos se utilizó las composiciones descritas en el Anexo 1.

Se cultivo 6 semillas en cada vaso por quintuplicado y se almacenaron en una cámara climática con temperatura promedio de 25 ± 2 °C, fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad y humedad relativa de $70 \pm 5\%$. Después del cultivo, las semillas fueron monitoreadas durante 20 días con lo cual se evidenció el porcentaje de germinación, la tasa de contaminación y el promedio de germinación en días.

Finalmente, una vez obtenido un lote primario se procedió a la micropropagación *in vitro* de las plántulas como se aprecia en la figura 4, se realizó cortando los tallos desarrollados a partir de los primeros brotes para incrementar el stock de material vegetal y obtener suficientes muestras para los análisis posteriores

Figura 4.

Proceso de micropropagación in vitro de B. oleracea var. capitata f. rubra a partir de semillas



Nota: I) Siembra de semillas desinfectadas en medio MS y MS S/N sin hormonas. II) Micropropagación para la obtención de plántulas genéticamente uniformes

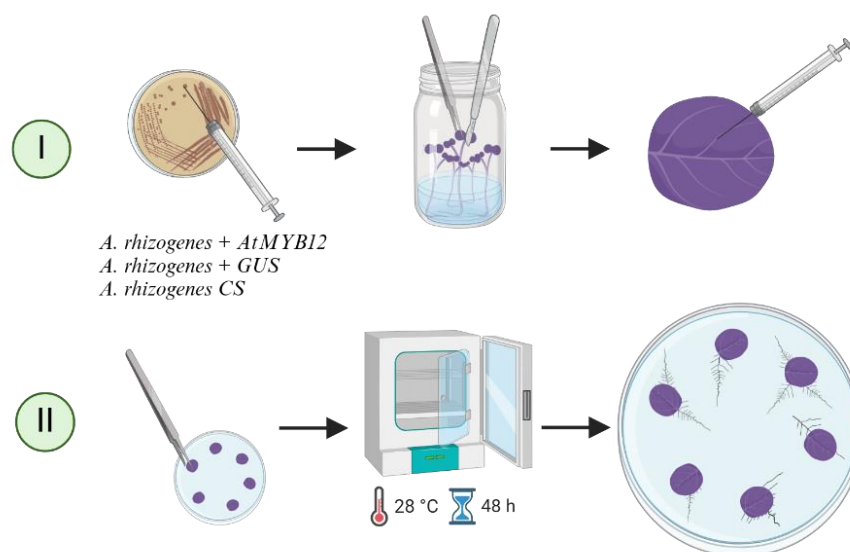
2.2.3. Transformación genética con *A. rhizogenes* cepa salvaje y factores de transcripción

Para la inducción de raíces transformadas se utilizaron explantes foliares de plántulas *in vitro* de col lombarda como se muestra en la figura 5. Los cuales se infectaron con la cepa A4 Cepa Salvaje de *A. rhizogenes* (CS), la cepa A4 de *A. rhizogenes* con el vector de expresión pJCV52 que contiene el gen AtMYB12 (MYB) y la cepa A4 de *A. rhizogenes* con el vector de expresión pJCV52 que contiene el gen GUS (Beta-glucoronidasa) como control negativo. Los explantes se cultivaron en medio MS y MS S/N libre de reguladores del crecimiento según lo descrito por **Hidalgo et al. (2017)**.

Las muestras se incubaron en oscuridad por 48 horas a 28 ± 2 °C para permitir la infección bacteriana. Posteriormente, las hojas infectadas se transfirieron a medio MS y MS S/N respectivamente con 500 mg/L de cefotaxima para eliminar la bacteria. Transcurrido 15 días, aparecieron raíces en la mayoría de explantes inoculados. Finalmente, se aislaron las raíces de los explantes foliares para subcultivar en medio sin antibiótico.

Figura 5.

Procedimiento para la transformación de explantes foliares de B. oleracea var. capitata f. rubra mediada por A. rhizogenes



Nota: I) Se utilizaron explantes foliares maduros de 2x2 cm los cuales se infectaron con ayuda de una jeringa de 3 mL en las nervaduras del envés de las hojas. **II)** Las hojas se incubaron para permitir la infección y fueron subcultivadas a los 2, 7 y 21 días en medios con antibiótico para facilitar la generación de raíces transformadas (RT).

2.2.4. Confirmación genética de las raíces transformadas

La naturaleza de las RT, se comprobó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN genómico total se obtuvo por el método CTAB modificado descrito por **Moreau et al. (2012)** y para la extracción se utilizaron 200 µg de material inicial.

El análisis PCR se realizó empleando Dream Taq Green Polymerase con 200 ng de ADN de cada muestra y utilizando cebadores específicos de genes diseñados por **Hidalgo et al. (2017)** los cuales se muestran en la tabla 4.

Las condiciones de PCR en el termociclador de las secuencias genéticas fueron las siguientes: (95 °C 5 min; 30 ciclos; 95 °C 1 min; 60 °C 40 seg; 72 °C 90 seg y 72 °C 10 min) y el tamaño del amplicón se analizó en gel de agarosa al 1% a 90 V.

Tabla 4.*Secuencias de cebadores específicos para PCR*

Gen	Tipo	Secuencia Primer	Tamaño amplicón bp
AtMYB12	Forward	CACCATGGGAAGAGCGCCATGTTG	1117
	Reverse	TGACAGAAGCCAAGCGACCA	
rolC	Forward	TAACATGGCTAGAAGACGACC	534
	Reverse	AAACTTGCACCTCGCCATGCC	
virD	Forward	ATGTCGCAAGGCAGTAAGCCCA	438
	Reverse	GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA	
GUS	Forward	CATGAAGATGCGGACTTGCG	647
	Reverse	GCTAACGTATCCACGCCGTA	

Fuete: (Hidalgo et al., 2017)**2.2.5. Extracción de antocianinas**

La extracción de antocianinas se realizó en las plántulas a los 60 días de cultivo mientras que el extracto de las raíces se realizó posterior a la confirmación por PCR a los 30 días de cultivo en medio sin antibiótico. Se siguió la metodología descrita por **Strauch et al. (2019)**, utilizando 100 g de material fresco de plántulas o raíces transformadas de col lombarda *in vitro* por maceración con etanol al 96% como solvente orgánico y ácido clorhídrico 1M para acidificar el medio y facilitar la extracción en una proporción 85:15.

El material vegetal se pesó en una balanza analítica (Ohaus pioneer) y se mezcló con 100 mL del solvente en proporción 1:2, posteriormente mediante calentamiento por agitación (Corning PC-620D) se maceraron las muestras a 800 rpm durante 120 min a 70 °C y finalmente se separaron los sólidos del extracto con ayuda de una centrifuga (Rotina 380) a 5000 rpm por 10 min.

Finalmente se recogió el sobrenadante el cual se almacenó en botellas ámbar cubiertas con papel aluminio a 4 °C con la finalidad de evitar la degradación antes de realizar los análisis correspondientes.

2.2.6. Determinación de antocianinas totales

Primero se determinó la concentración relativa de antocianidinas en los extractos por espectrofotometría UV-Vis con ayuda de un Espectrofotómetro de microplacas Fisher Scientific AccuSkan GO utilizando las absorbancias de la tabla 5 que corresponden al máximo de absorción característico de cada antocianidina. La concentración fue calculada utilizando el coeficiente de extinción molar de la cianidina-3-glucósido.

Tabla 5.

Longitudes de onda máximas de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) de las principales antocianidinas

Antocianidina	Sustitución		$\lambda_{\text{máx}}$	
	R1	R2	Espectro visible	
Anglicona				
Pelargonidina	H	H	494	Naranja
Cianidina	OH	H	506	Naranja - Rojo
Delfinidina	OH	OH	508	Azul - Rojo
Peonidina	OCH3	H	506	Naranja -Rojo
Petunidina	OCH3	OH	508	Azul - Rojo
Malvidina	OCH3	OCH3	510	Azul - Rojo

Nota: Longitudes de onda máximas correspondientes a la forma catiónica flavilio (Núcleo estructural de las antocianidinas) **Fuente:** (Sadowska & Bartosz, 2024)

El contenido total de antocianinas (CTA) se realizó utilizando el método diferencial de pH descrito por **Vega et al. (2023)** y **Zhang et al. (2016)**. Se utilizó el extracto de col lombarda ajustando el pH con buffer de cloruro potásico 0.025 M a pH 1.0 y en buffer de acetato sódico 0.4 M a pH 4.5, la absorbancia de cada muestra se midió a 510 nm y 700 nm, frente al blanco con agua destilada.

La Absorbancia (A) se calculó mediante la siguiente ecuación

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (1)$$

Mientras que el CTA se cuantificó en términos de cianidina-3-glucósido (Cya-3-glu) principal antocianina de la col lombarda, y se calculó mediante la siguiente fórmula, expresado en mg Cya-3-glu/100 g de material vegetal.

$$CTA = \frac{A * MW * FD * m * 1000}{(\epsilon * 1 * V)} \quad (2)$$

Donde:

A = Absorbancia

MW = Peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449.2 g/mol)

ϵ = Absortividad molar de la cianidina-3-glucósido (26 900 L/mol * cm)

FD = Factor de dilución (1:25)

V = Volumen utilizado para la extracción

m = Peso de la muestra

2.2.5. Análisis de la capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante se cuantificó con el método de la actividad eliminadora de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), siguiendo la metodología descrita por **Pusty et al. (2024)**. Donde se mezcló 0,5 µL del extracto con 3 µL de solución de DPPH, se incubó las muestras por 30 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm frente a un blanco.

La actividad antioxidante se expresó en términos del porcentaje de inhibición de eliminación de DPPH y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%DPPH = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \right] * 100 \quad (4)$$

Donde:

A_b = Absorbancia del blanco

A_c = Absorbancia del control

A_m = Absorbancia de la muestra

2.2.7. Análisis de la actividad antiinflamatoria por desnaturalización de albúmina

La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante la desnaturalización de proteínas utilizando albúmina de huevo para el proceso y se realizó siguiendo la metodología descrita por **Yesmin et al. (2020)** con modificaciones en las concentraciones analizadas. La albúmina se obtuvo de la clara de huevos frescos la cual se colocó en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada, se agitó la solución para obtener un precipitado y se centrifugó a 4000 rpm por 15 min para recuperar el sobrenadante rico en ovoalbúmina.

Se mezcló 2 µL del sobrenadante con 2,8 µL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) al cual se le agregó 2 µL de extracto a diferentes concentraciones (1000, 800, 600, 400 y 200 µg/mL). Se empleó como control la solución con agua destilada y de referencia diclofenaco sódico a las mismas concentraciones. Las soluciones se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 15 min y se midió la absorbancia a 660 nm; posteriormente se incubaron en baño térmico a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se midió la absorbancia a 660 nm.

El porcentaje de inhibición del proceso se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{OD_2 - OD_1}{OD_3 - OD_1} \right) * 100 \quad (4)$$

Donde:

OD_1 = Absorbancia de la muestra previo a la desnaturalización

OD_2 = Absorbancia de la muestra posterior a la desnaturalización

OD_3 = Absorbancia del control negativo posterior a la desnaturalización

2.2.8. Análisis estadístico

Se implementó un diseño experimental factorial con dos factores adaptado a las características específicas de las plántulas y las raíces transformadas como se indica en la tabla 6. En el caso de las plántulas, el factor A corresponde al medio de cultivo con dos niveles, mientras que el factor B se refiere a la estimulación: control, MeJA y AS. Por otro lado, en las raíces, el factor A mantiene los mismos niveles, pero el factor B incluye tratamientos con CS, MYB y GUS.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Los datos obtenidos correspondientes al CTA, DPPH y actividad antiinflamatoria se evaluaron mediante un análisis multifactorial ANOVA, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey, asumiendo un valor de significancia de $p < 0,05$ para encontrar diferencias significativas.

Tabla 6.

Diseño Factorial AxB para el análisis estadístico

Biofactorías (Matriz)	Medio de cultivo (Factor A)	Regulador de crecimiento (Factor B)
Plántula	MS	Control
		MeJA
		AS
	MS S/N	Control
		MeJA
		AS
Raíz	MS	CS
		CS + MeJA
		CS + AS
		MYB
		GUS
		CS
	MS S/N	CS + MeJA
		CS + AS
		MYB

Nota: Se realizó el análisis de varianza con tres respuestas experimentales: **1)** Contenido total de antocianinas, **2)** Capacidad antioxidante y **3)** Actividad antiinflamatoria. Los tratamientos CS + MeJA y CS + AS en ambos medios se excluyeron para el análisis estadístico ya que no se observaron resultados óptimos para la extracción de antocianinas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Tratamiento de semillas previo a la obtención de plántulas *in vitro* de *B. oleracea* var. *capitata* f. *rubra*

Las plántulas *in vitro* de col lombarda se obtuvieron a partir de semillas desinfectadas con ETOH, H₂O y NaOCl, siguiendo el protocolo de **Hasan et al. (2021)** con ligeras modificaciones en los tiempos de desinfección. Posteriormente las semillas desinfectadas se sometieron a 6 tratamientos previos a la siembra, con el fin de analizar la tasa de germinación, contaminación y tiempo promedio de germinación; factores que se analizaron por quintuplicado en medio MS y MS S/N.

Los factores fueron analizados diariamente durante 20 días, y se observó que el tratamiento 1 (4 °C en solución de AG3 500 µM) tuvo un porcentaje de germinación mayor y disminuyó la tasa de contaminación. (Anexo 2). Estos resultados son similares a los reportados por **Hasan et al. (2021)** quienes indican que el uso de NaOCl reduce significativamente la contaminación.

De acuerdo con la investigación realizada por **Miceli et al. (2019)**, el AG3 al ser una hormona clave en la regulación del crecimiento y desarrollo celular, desempeña un papel fundamental en diferentes procesos fisiológicos, tales como la germinación, elongación y diferenciación celular. Debido a que esta hormona promueve la activación del metabolismo interno de la semilla, favoreciendo la liberación de energía para que el embrión inicie su desarrollo (**Johnson et al., 2023**).

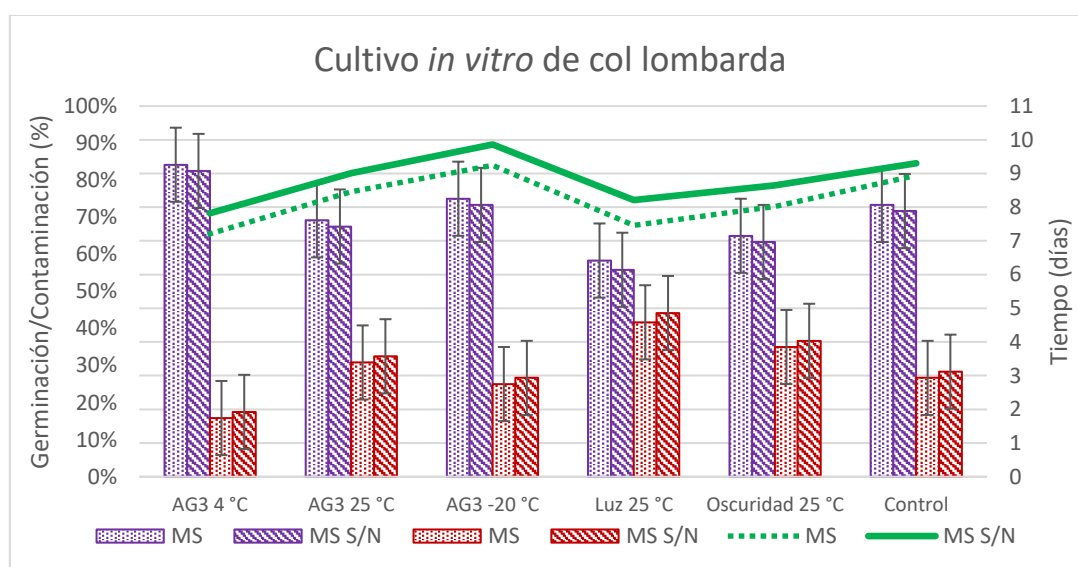
Además, esta hormona juega un papel crucial en la eliminación de la dormancia en las semillas, como señalan **Salazar et al. (2018)**, ya que actúa sobre los mecanismos inhibitorios que impiden la germinación, contribuyendo a romper las barreras físicas y químicas que bloquean el inicio del proceso germinativo. Un mecanismo clave que facilita este proceso es la síntesis de enzimas que permiten hidrolizar macromoléculas que se encuentran al interior. Según **Johnson et al. (2023)**, esta acción acelera la embriogénesis al proporciona nutrientes y energía a la semilla.

Como se observa en la figura 6 la mayor tasa de germinación fue de 84.17% y 15,83% de contaminación en MS, así también se obtuvieron valores muy cercanos en el tratamiento con MS S/N el cual fue de 82.50% de germinación y 17.50% de contaminación. Esto puede deberse a que los tratamientos fueron sometidos a AG3 y se ha comprobado que rompe la dormancia aumentando la germinación, especialmente cuando se combina con otros factores como la estratificación que es la exposición a bajas temperaturas. Por otro lado, en aquellos tratamientos donde no se utilizó esta hormona y/o se exponen a temperaturas mayores a 20 °C, el efecto AG3 sobre la tasa de germinación no es significativa e incluso es menor al control, lo cual se confirma en estudios reportados por **Tuan et al. (2018)**.

La mejor tasa promedio de germinación se obtuvo en el tratamiento T1 (AG3, 4 °C) a los 7 días. Estudios previos, como los realizados por **Kumchai et al. (2013)**, indican que la adición de prolina, un compuesto con un efecto similar al AG3, permite la germinación y formación de raíces en un período de 10 a 12 días. Esto sugiere que el uso de agentes con acción germinativa no solo favorece este proceso, sino que también induce un crecimiento más rápido y saludable de las plántulas, aumentando así la eficiencia en el cultivo *in vitro* de col morada.

Figura 6.

Resultados del cultivo de semillas de col morada para la obtención de plántulas



Nota: Tasa de germinación en color morado, tasa de contaminación en color rojo, promedio de germinación en color verde.

3.2. Optimización de cultivos

El AG3 según **Miceli et al. (2019b)** tiene un efecto sinérgico con las hormonas modulando la formación de raíces y promoviendo la expansión y el alargamiento celular del embrión, se evidencio una diferencia significativa en el crecimiento, la elongación y generación de raíces en el medio MS y MS S/N como se muestra en la Figura 7.

Si bien los nutrientes benefician el crecimiento y desarrollo, la deficiencia de los mismos como indica **Pei et al. (2024)** generan estrés biótico lo que induce a la senescencia foliar y lo que a su vez provoca que la planta pase por una transición de asimilación a reactivación de nutrientes, siendo los cloroplastos los principales organelos afectados, por consiguiente las hojas presentan deficiencia y desequilibrio interfiriendo en la acumulación de antocianinas como respuesta al estrés (**Jezek et al., 2023**).

Investigaciones previas de **Zhang et al. (2017)** en *A. thaliana* han demostrado que durante la senescencia este metabolito minimiza el estrés oxidativo facilitando el transporte de nutrientes de hojas viejas a tejidos jóvenes, autores como **Zhang et al. (2024)** han identificado una acumulación de antocianinas en las hojas cuando se cultivan en deficiencia de N ya que está implicado en la regulación de genes como PAL, CHS y F3H que son parte de la ruta biosintética de las antocianinas.

En plántulas *in vitro* de col, el medio MS, promovió un crecimiento promedio de 13.25 cm, debido a su composición rica en nutrientes, vitaminas y sales minerales los cuales favorecen la elongación celular y la expansión en dirección de la pared celular, lo cual resulta en un crecimiento robusto, como lo corroboran otros autores (**Pasternak & Steinmacher, 2024**).

En el medio MS S/N donde la ausencia de N limita la síntesis proteica y de ácidos nucleicos (**Maia et al., 2020**); se observó un crecimiento y elongación celular más reducido, con un promedio de 9.32 cm de las plántulas. **Ye et al. (2022)** mencionan que el N es crucial para sintetizar pigmentos fotosintéticos, lo que afecta de forma directa en la producción de energía y por consecuente afectando el tamaño de las plántulas.

Por su parte, se ha demostrado que el MeJA inhibe la elongación reduciendo el crecimiento al inducir la senescencia prematura y/o limitando la división celular, de acuerdo con **Major et al. (2017)** y **Kamińska (2021)** los jasmonatos exógenos suprimen la proliferación y expansión celular, probablemente interfiriendo con la replicación del ADN. Sin embargo, el efecto puede depender de la concentración empleada, en este estudio las plántulas tratadas con MeJA mostraron un crecimiento promedio de 2.43 cm en MS y 1.67 CM en MS S/N, lo que podría estar relacionado con la concentración empleada, como sugieren **Lakehal & Bellini (2019)** además de la deficiencia de nitrógeno que es un estrés adicional.

Finalmente, aunque el efecto inhibitor de AS sobre el crecimiento no se comprende completamente (**Müller et al., 2024**). Algunos estudios reportan concentraciones elevadas de AS tienden a afectar la elongación celular; como indica **Pasternak et al. (2019)** puede conllevar a fenotipos de estatura atrofiada dependiendo de la especie vegetal al suprimir la división y expansión celular. **Pokotylo et al. (2022)** sugieren que las NPRs (Genes no expresivos del gen 1 relacionado con la patogénesis), SABPs (Proteínas de unión a AS) junto con otras hormonas, modulan la activación de genes relacionados con la respuesta inmune y el crecimiento de forma positiva o negativa afectando el desarrollo celular, lo que podría explicar los resultados obtenidos en este tratamiento, que mostraron un crecimiento promedio de 1.85 cm en MS y 0.94 cm en MS S/N.

Figura 7.

Crecimiento (cm) de las plántulas de col lombarda en medio MS sólido



Nota: Promedio de mediciones en diferentes muestras. **A)** Crecimiento en MS MeJA (2.5 cm), **B)** Crecimiento en MS AS (1.9 cm), **C)** Crecimiento en MS (13.9 cm), **D)** Crecimiento en MS S/N MeJA (1.7 cm), **E)** Crecimiento en MS S/N AS (1.0 cm) y **F)** Crecimiento en MS S/N (10.1 cm)

3.3. Estimulación de cultivos *in vitro* de *B. oleracea* var. *capitata*. f. *rubra*

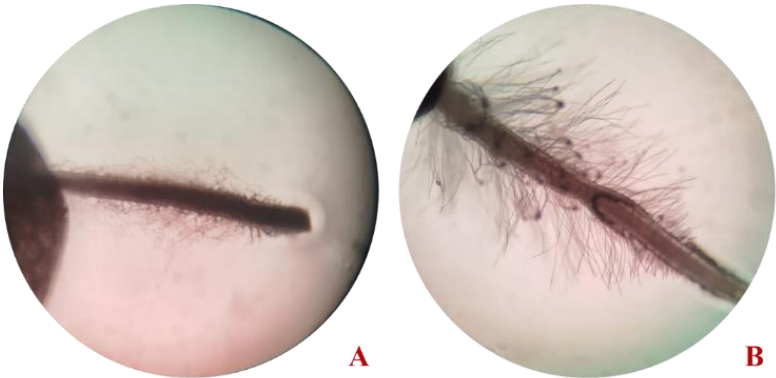
Se obtuvieron cultivos de RT de col morada (RT) mediante la infección en explantes foliares de plántulas de col morada *in vitro* con una cepa de *A. rhizogenes* tipo salvaje (CS) y bacterias modificadas de *A. rhizogenes* con el factor de transcripción AtMYB12 (MYB) y el gen reportero GUS (GUS). Las RT fueron obtenidas entre los 15-20 días de cultivo, posteriormente se subcultivaron en medio MS y MS S/N suplementado con cefotaxima (500 mg/L) para su selección.

Respecto a los explantes foliares infectados y cultivados con MeJA y AS, se excluyeron para los análisis posteriores debido a que no se obtuvieron RT, probablemente como sugiere **Zlotorynski (2020)** debido al estrés elevado al que fueron sometidos los explantes, provocó la senescencia foliar y posterior apoptosis inhibiendo la formación de RT, dicha observación resalta la importancia de controlar el estrés para asegurar una correcta transformación.

Sin embargo, el trabajo realizado por **Rezazadehfar et al. (2024)** muestra que ciertos inductores de estrés como el cloruro de calcio y penconazol a una concentración <500 μ M mejora la acumulación de metabolitos secundarios en las RT, lo que sugiere que la concentración de los inductores empleados en este estudio podría ser menor para futuros análisis.

En su mayoría las RT aisladas posterior a la infección con *A. rhizogenes* crecieron bajo la selección de cefotaxima, tras varios subcultivos durante 20 días se obtuvieron líneas radicales transgénicas. Sin embargo, la formación de raíces adventicias vario respecto al medio, como se ha mencionado anteriormente debido a la deficiencia de nitrógeno, en el caso de las raíces obtenidas en MS se lograron observar nodulaciones y varias ramificaciones, mientras que en MS S/N las ramificaciones era apenas visibles como se aprecia en la figura 8.

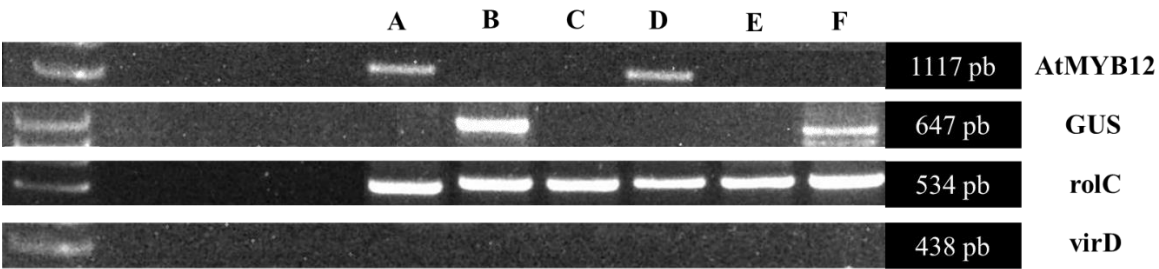
Figura 8.
Raíces transformadas de col morada con A. rhizogenes en los diferentes medios



Nota: Raíces transformadas en los medios de cultivo a 40X. **A)** Raíces transformadas obtenidas en medio MS S/N y **B)** Raíces transformadas obtenidas en medio MS.

Una vez retirado el antibiótico, se extrajo el ADN genómico de las RT para confirmar la transformación mediante PCR como se muestra en la figura 9. La ausencia de los genes *virD* permitió determinar la correcta eficiencia y eliminación de colonias de *Agrobacterium* en el cultivo vegetal, la presencia de genes *rolC* indica la proliferación de RT por acción de *Agrobacterium* (Bulgakov, 2008) y finalmente se comprobó la correcta inserción del gen factor de transcripción *AtMYB12* y el gen *GUS* como control negativo de la transformación genética (Wu et al. 2024).

Figura 9.
Análisis PCR del ADN genómico de raíces transformadas de col morada con A. rhizogenes



Nota: Análisis de los amplicones correspondientes donde **A)** MS + MYB, **B)** MS + GUS, **C)** MS + CS , **D)** MS S/N + MYB **E)** MS S/N + CS y **F)** MS S/N GUS

3.4. Análisis de la concentración relativa de antocianidinas

Las antocianidinas como expresa **Mattioli et al. (2020)** son los principales precursores de antocianinas siendo el 50% derivados de cianidina (Cya), 12% de Pelargonidina (Pg), 12 % de Delfinidina (Dfl), 12 % de Petunidina (Ptn), 7% de Peonidina (Pnd) y 7% de Malvidina (Mvd) (**Lu et al., 2024**), por lo cual se analizó la distribución en las diferentes condiciones experimentales del cultivo *in vitro* de col morada a los 60 días de cultivo (Anexo 3).

De forma general se observa una variación significativa respecto a la cantidad total como la composición relativa de cada antocianidina en los diferentes tratamientos, siendo Cya la más alta, lo que se relaciona con lo reportado en la bibliografía. **Stoica et al. (2023)** menciona que más del 50% de antocianinas presentes en la col derivan de la cianidina-3-o-glucósido tales como los ácidos sinápico, cafeico, ferúlico y p-cumárico (**Fenger et al., 2019**).

Por el contrario, las antocianidinas con menor proporción en todos los medios fueron Mvd y Ptn, lo cual puede estar relacionado con la baja actividad enzimática de metiltransferasas que permiten su producción a partir de la metilación de cianidina (**Cappellini et al., 2021**), de igual forma sucede con Pg, Dfl y Ptn como indican **Dong & Lin (2021)** posiblemente por una disponibilidad baja de sus precursores como son el dihidrokaempferol y dihidroquercetina.

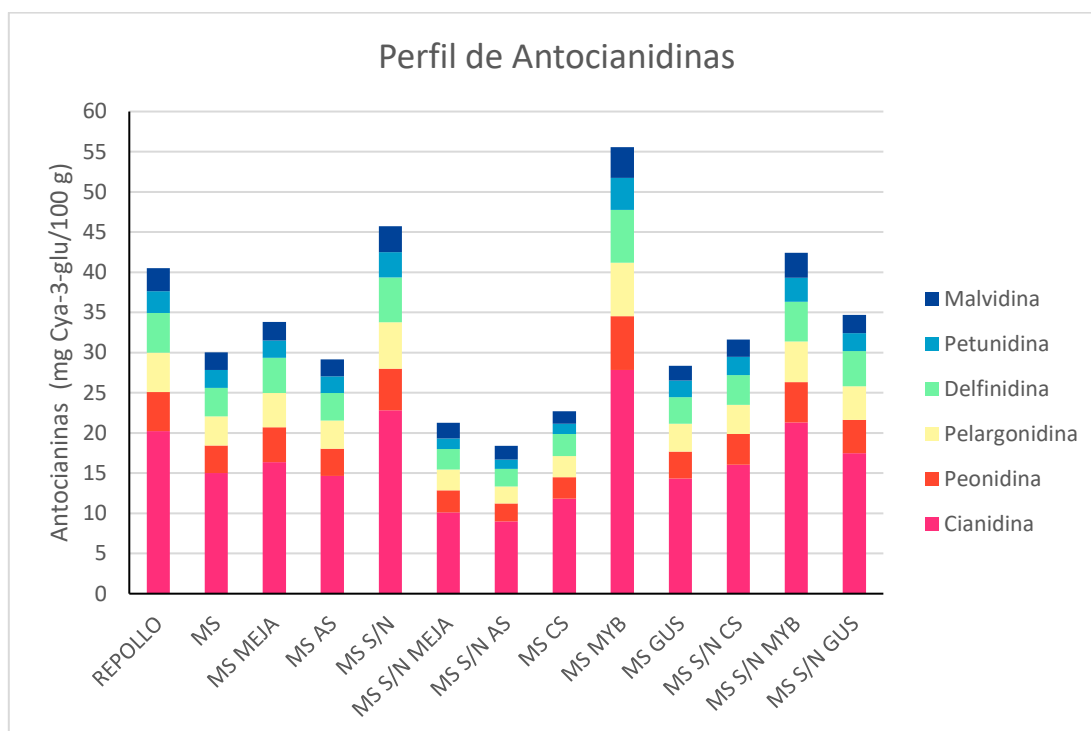
En la figura 10 se observa que la Cya se destaca como el compuesto predominante en todas las condiciones experimentales. En el caso de las plántulas cultivadas con MS S/N presentaron niveles más altos de antocianidinas: 22.84 mg/g de Cya, 5.76 mg/g de Pg y 3.19 mg/g de Mvd debido a la deficiencia de nitrógeno que activa señales de defensa frente al estrés por déficit nutricional lo que ayuda a la acumulación de estos compuestos en las hojas y raíces.

Por el contrario, el medio MS no facilitó la acumulación de antocianinas donde se obtuvieron valores de 15.03 mg/g Cya, 4.44 mg/g Dfl y 2.30 Mvd siendo los mismos menores a los encontrados en el repollo comercial; 20.23 mg/g Cya, 4.95 Dfl y 2.84 Mvd. En el resto de los tratamientos el total de antocianidinas analizadas fue menor a 35 mg/g.

Por otro lado, en las RT la concentración relativa de antocianinas es mayor en los tratamientos donde se introdujo el factor MYB con los cuales se obtuvo 27.85 mg/g en MS y 21.31 mg/g en MS S/N, según **Song et al. (2018)** esta concentración podría estar relacionada directamente con la activación y/o regulación de EBG y LBG un mecanismo activado por el factor MYB que regula positivamente la expresión de genes que codifican enzimas esenciales de la ruta de los fenilpropanoides.

Figura 10.

Concentración relativa de las diferentes antocianidinas presentes en los extractos a diferentes condiciones experimentales



Nota: Concentración de antocianidinas promedio de plántulas y RT de col morada expresadas en términos de Cya-3-glu en mg por cada 100 g de material vegetal.

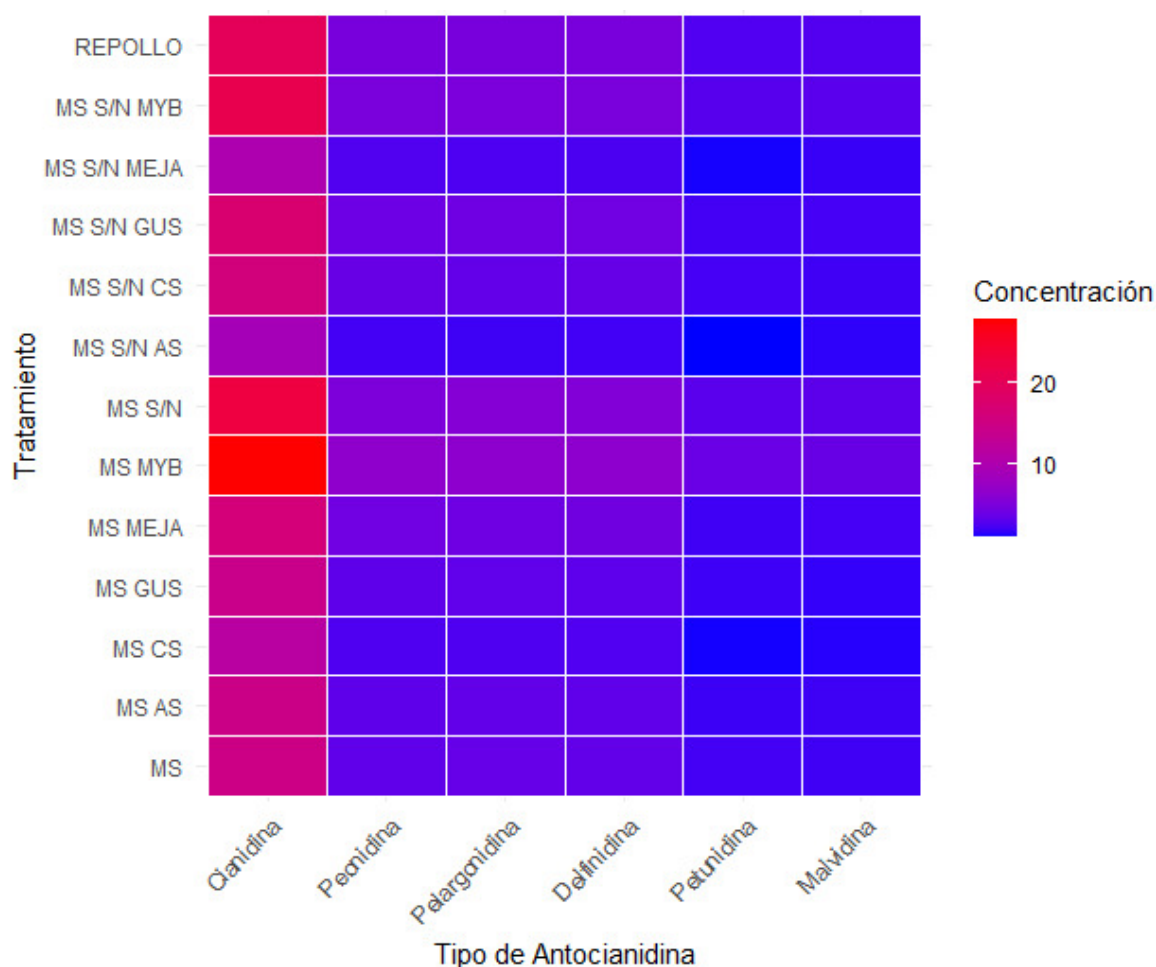
El mapa de calor presentado en la figura 11, basado en las concentraciones de antocianidinas, evidencia diferencias claras en la acumulación relativa. Los tonos azules representan bajas concentraciones, mientras que el rojo intenso indica altas concentraciones, proporcionando una representación visual nítida de los perfiles de antocianidinas entre las muestras.

El tratamiento MS MYB muestra un tono rojo intenso, lo que indica una concentración significativamente mayor de cianidina. Por otro lado, las muestras del tratamiento MS S/N también presentan concentraciones altas, aunque son inferiores a las de MS MYB. Esto sugiere que el gen MYB combinado con el medio MS, potencia la síntesis de antocianinas al activar genes clave en la ruta de los fenilpropanoides. Asimismo, la eliminación de nitratos por sí sola favorece la acumulación, aunque en menor medida.

En el caso de los reguladores de crecimiento, el MeJA incrementa ligeramente los niveles de antocianidinas lo que concuerda con su papel como regulador en condiciones de estrés. Finalmente, los tratamientos MS, GUS, CS y AS muestran tonos cercanos al cero, lo que indica que estas condiciones no tienen un impacto significativo, a diferencia de los tratamientos anteriormente mencionados.

Figura 11.

Mapa de calor de la acumulación relativa de antocianidinas en diferentes condiciones experimentales



Nota: Los colores representan la acumulación relativa de antocianinas en función de la intensidad; rojo (alta acumulación), azul (baja acumulación). Las condiciones evaluadas incluyen tratamientos respecto a la composición del medio y el estimulador utilizado.

3.5. Análisis del contenido total de antocianinas

Los resultados obtenidos en las plántulas *in vitro* de col lombarda muestran que cuando se emplea las dos composiciones de medio MS y MS S/N, la deficiencia de Nitrógeno (N) influye en la producción de antocianinas, lo cual se puede analizar en la Figura 12. En MS S/N se obtuvo un valor mayor de CTA de 44.75 mg Cya-3-glu/100g, en contraste al del medio MS, donde el valor fue de 30,12 mg Cya-3-glu/100g, por consecuente se demostró que la deficiencia de nitrógeno influye considerablemente en la acumulación de este metabolito.

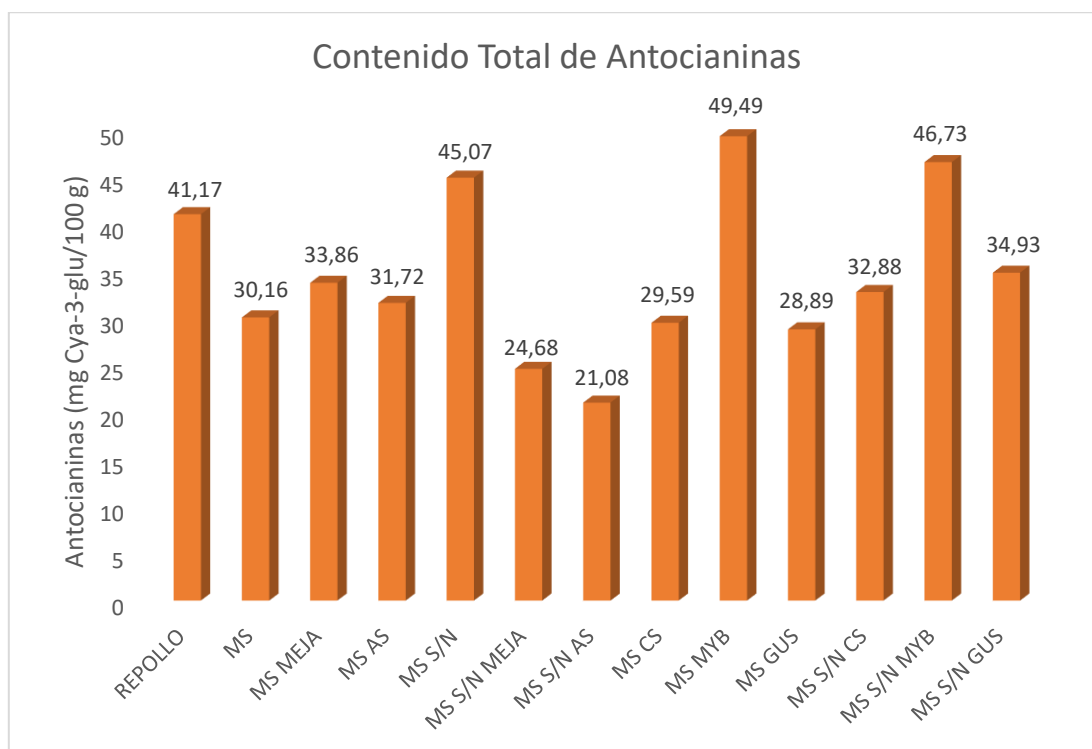
En los medios de cultivo se emplean nitratos (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) formas asimilables para las plantas como fuente de N, por ende, en el medio MS S/N se acumulan metabolitos secundarios como las antocianinas debido al estrés; por su parte **Meng et al. (2020)** menciona que utilizar nitrógeno libre de amonio a bajas concentraciones es mejor para la acumulación de antocianinas.

De igual forma, se utilizaron reguladores de crecimiento como el MeJA y AS, mismos que se colocaron en el medio a una concentración final de 500 μM (**Phillips & Garda, 2019**). Según **Naik & Al-Khayri (2016)** estas fitohormonas inducen la resistencia sistémica adquirida, lo que coincide con la acumulación de antocianinas como respuesta al estrés biótico, dado que están involucradas en las vías de señalización de defensa. Además de ser estimuladores de crecimiento en determinadas especies y según la concentración empleada (**Yang et al., 2019**).

Los resultados muestran que el MeJA indujo una mayor acumulación de antocianinas en ambos medios, con concentraciones de 32.90 mg/g en MS y 23.91 mg/g en MS S/N. En contraste, las muestras tratadas con AS mostraron una menor acumulación: 29.73 mg/g en MS y 19.80 mg/g en MS S/N. Esta diferencia puede estar relacionada con el mecanismo de acción de cada fitohormona y como afectan la ruta de los fenilpropanoides en cada medio.

Figura 12.

Contenido Total de Antocianinas (CTA) en los extractos a diferentes condiciones experimentales



Nota: Contenido total de antocianinas promedio de plántulas y RT de col morada expresadas en términos de Cya-3-glu en mg por cada 100 g de material vegetal

Si bien ambas fitohormonas actúan en la ruta de los fenilpropanoides, la diferencia radica en su mecanismo de acción (**Belwal et al., 2020b**). El MeJA activa la ruta al inducir la expresión de genes clave para la expresión de CHS, DFR, F3H y UFGT (**Wang et al., 2019**), lo cual en lugar de ser un regulador del crecimiento se evidencio que actúa como un inductor del estrés, lo que favorece la biosíntesis de antocianinas. A su vez este proceso se ve facilitado por la degradación de proteínas JAZ (JA-ZIM) lo que permite liberar el complejo MYB-bHLH y por ende promoviendo la acumulación de metabolitos secundarios en las plantas (**An et al., 2021**), este mecanismo podría explicar el por qué existe una mayor acumulación de antocianinas en las muestras tratadas con MeJA.

Por otro lado, el AS, regula la inmunidad al activar líneas de defensa contra patógenos biotróficos y semibiotróficos. Aunque también permite acumular metabolitos secundarios como expresa **Shi et al. (2023b)**; sin embargo, su efecto depende de la interacción con otras vías de señalización; razón por la cual la concentración en ambos medios es menor a las muestras tratadas con MeJA (**Pacheco & Gorni, 2021**).

3.6. Análisis de la capacidad antioxidante

El análisis DPPH realizado con el extracto de antocianinas mostró diferencias entre las condiciones experimentales como se observa en la figura 13, teniendo como referencia al repollo con un valor de 62.71%; resultados similares a los reportados en el trabajo de **Vasugi (2018)** quién obtuvo $59.55 \pm 4.17\%$ en la misma especie vegetal, pero utilizando polvo de col lombarda. Por consiguiente se puede inferir que utilizar el material vegetal fresco permite una mejor extracción con solventes orgánicos, por consiguiente las muestras tratadas con MYB mostraron un aumento en la actividad antioxidante.

Respecto a los análisis con las antocianinas extraídas de plántulas, se obtuvo una capacidad antioxidante de 44.53% en MS y 65.00% en MS S/N, valores similares a los reportados por **Sharma & Kumar (2011)** analizados con extracto etanólico de *R. ellipticus* en diferentes medios dando resultados de 35.10% y 60.85% lo que sugiere que la extracción etanólica es mejor que la metanólica en la col morada.

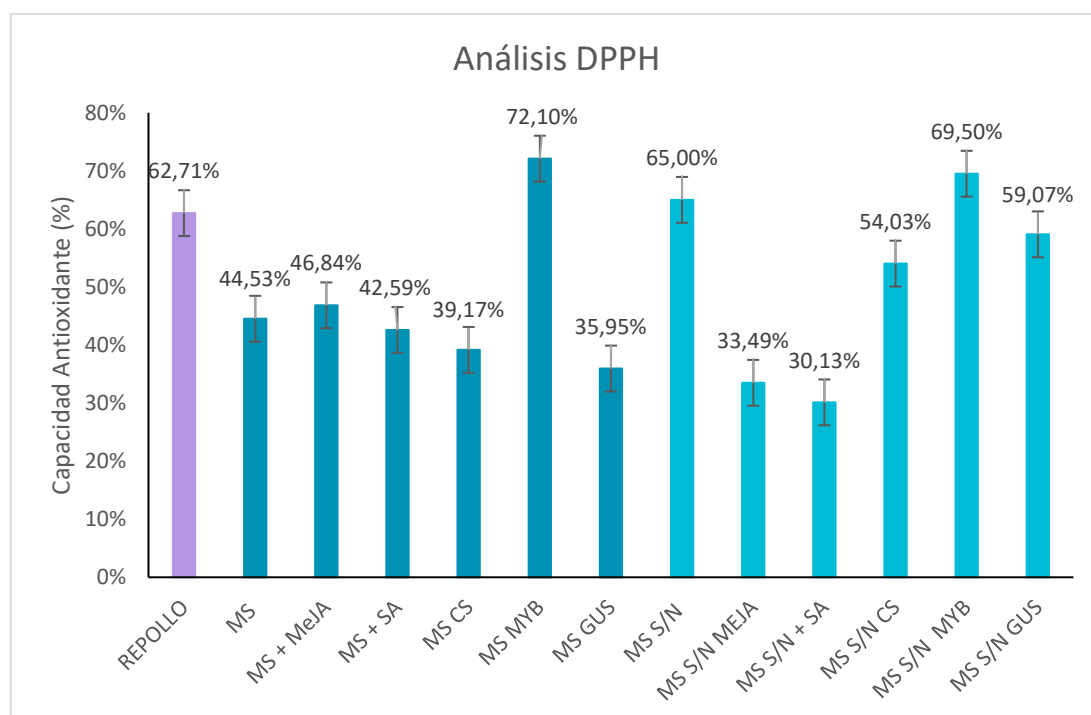
En el caso del tratamiento con MeJA la actividad disminuyó a 46.84% en MS y 33.49% en MS S/N sugiriendo que el metabolismo priorizó la producción de otros compuestos como los alcaloides (**Chavan et al., 2021**), de manera similar el AS también redujo la actividad a 42.59% en MS y 30.13% en MS S/N probablemente producto de la señalización de defensa para producir compuestos y/o proteínas antimicrobianas por encima de la producción de compuestos bioactivos con poder antioxidante (**Munim Twaij et al., 2019**).

En contraste, el análisis de DPPH realizado con el extracto de antocianinas de RT con MYB evidenció un porcentaje mayor de 72,10% en MS y 69.50% en MS S/N; estudios similares reportados por **Nguyen et al. (2024)** en RT de *Agastache rugosa* presentaron alrededor del 90% de capacidad antioxidante; sin embargo, los datos difieren debido a la especie vegetal utilizada

Por su parte las muestras donde se introdujo el gen GUS dieron como resultado actividades antioxidantes bajas similares a las plántulas sin estímulos; 33.49 % en MS y 59.07% en MS S/N; lo que indica que su presencia no afectó directamente a la síntesis de antocianinas, de forma similar sucede con las muestras tratadas con CS indicando que el vector de infección bacteriana no influyó en los resultados obtenidos, ya que en ambos casos no existe una acumulación anormal del metabolito.

Figura 13.

Capacidad antioxidante por el método DPPH



Nota: Se presenta el promedio de la capacidad antioxidante con aleatoriedad en las muestras

3.7. Análisis de la actividad antiinflamatoria

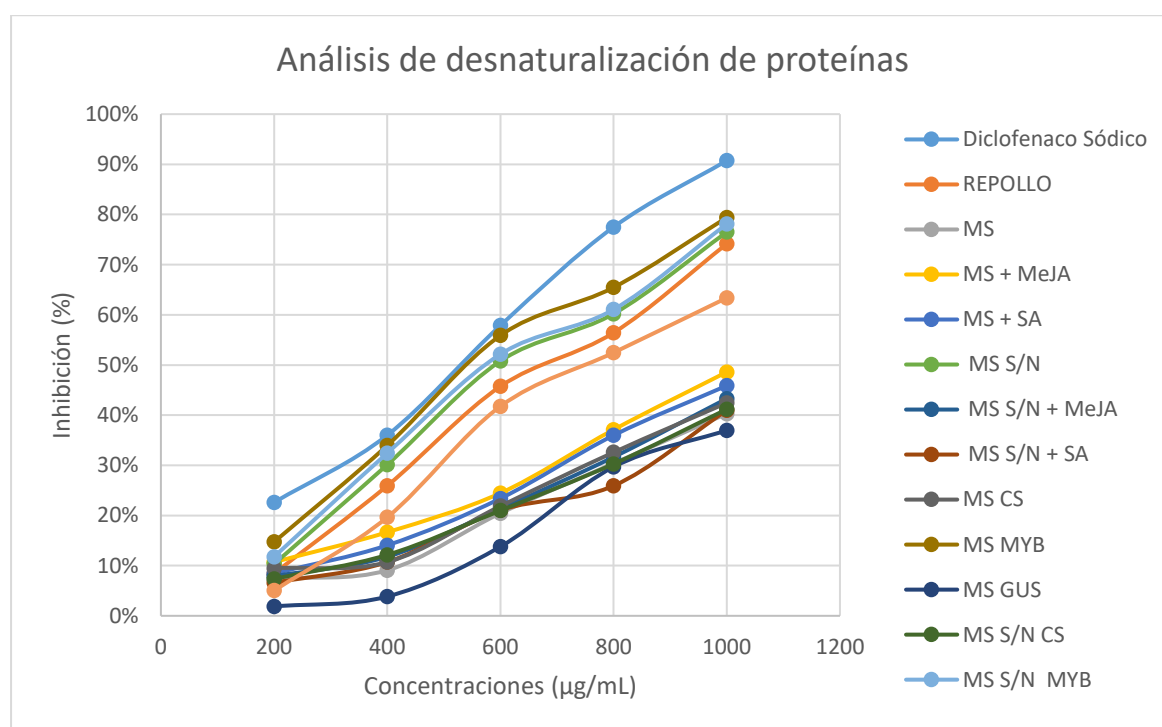
Los resultados presentados en la figura 14 demuestran que los extractos presentan una actividad antiinflamatoria significativa. El diclofenaco sódico, un antiinflamatorio no esteroide (AINE) de referencia mostró una inhibición de 90.74% a 1000 µg/mL, mientras que los extractos más efectivos fueron los obtenidos de las RT con MYB en medios MS y MS S/N con inhibiciones del 79.40% y 78.10% respectivamente. Aunque estos valores son menores al control positivo, son aceptables y sugieren que los extractos puedan ser utilizados como posibles agentes antiinflamatorios naturales.

Estos resultados coinciden con estudios previos como el de **Saeed et al. (2024)** quienes reportaron inhibiciones similares con extractos metanólicos ($76 \pm 0.13\%$) y etanólicos ($78 \pm 0.5\%$) de *Carissa carandas*. Por el contrario, los tratamientos con MeJA y AS mostraron una menor inhibición a la mayor concentración ($<50\%$), lo que indica que los reguladores de crecimiento pueden influir negativamente en las vías que regulan la actividad biológica de compuestos bioactivos.

Los resultados también demostraron un claro efecto dosis – dependiente, con una disminución en la inhibición a medida que disminuye la concentración del extracto; este comportamiento puede estar relacionado con la pureza de los extractos ya que, como indica **Shen et al. (2025)** las diluciones pueden reducir la actividad biológica de los compuestos presentes en la muestra.

Figura 14.

Actividad antiinflamatoria a diferentes concentraciones



Nota: Se presenta el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la ovoalbúmina promedio con aleatoriedad en las muestras a diferentes concentraciones

3.8. Análisis Estadístico

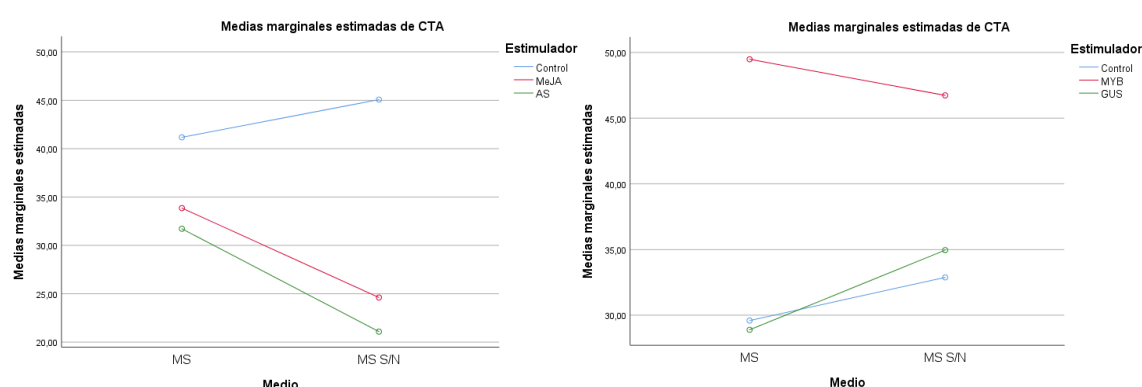
El análisis de varianza ANOVA (Anexo 4 y 5), demostró que los factores analizados (Medio de cultivo y estimulador) son estadísticamente significativos, lo que sugiere que la biosíntesis de antocianinas presentes en los extractos responde de manera diferente a las condiciones del medio y el estimulador aplicado.

Como se observa en la figura 15 la interacción entre los factores destaca que el efecto del estimulador depende principalmente de la disponibilidad de nutrientes en el medio, específicamente del nitrógeno.

Los resultados muestran que el medio MS S/N es óptimo para obtener un mayor CTA en las plántulas, mientras los estimuladores muestran una mayor efectividad en el medio MS, lo que sugiere que el nitrógeno es esencial para que los estimuladores sean efectivos. Por el contrario, en las raíces el medio MS y MYB producen un contenido mayor de antocianinas, pese a que el medio MS S/N y MYB también permite un CTA alto, sin embargo su incidencia es menor. Finalmente, el gen GUS no presenta diferencias significativas respecto al control.

Figura 15.

Medias marginales del contenido total de antocianinas del ANOVA de diseño factorial AxB

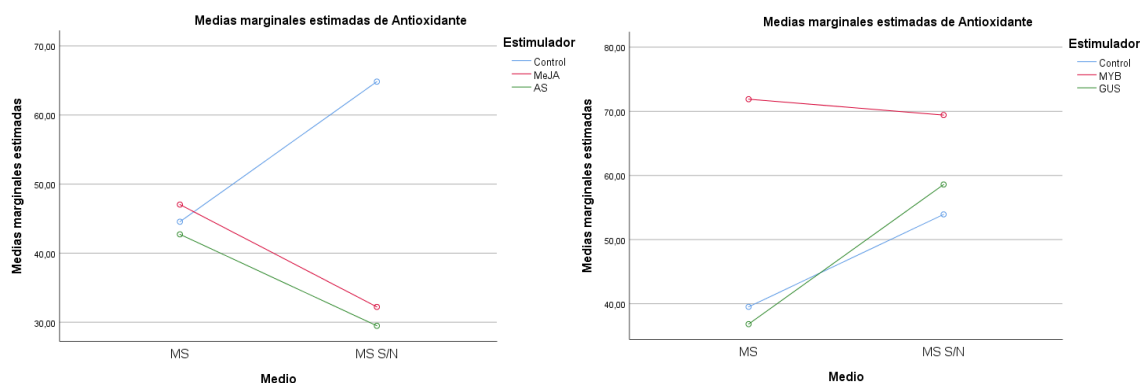


Nota: Los valores representan las medias ajustadas del contenido total de antocianinas en función de los niveles de los factores medio de cultivo y estimulador. Los análisis fueron realizados en SPSS y se utilizó un modelo de efectos principales

Los resultados de la capacidad antioxidante presentados en la figura 16 muestran que las antocianinas extraídas de las plántulas cultivadas en el medio MS S/N presentan mejor actividad biológica, mientras que las interacciones entre el medio y el estimulador disminuyen esta capacidad, respecto al medio MS no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Por su parte en las RT aquellas con el factor MYB presentaron una mejor capacidad cuando se combinan con el medio MS pese a que la diferencia con el medio MS S/N no es significativa; lo que sugiere que la estimulación con MYB tiene un efecto similar en ambos medios.

Figura 16.

Medias marginales de la capacidad antioxidante del ANOVA de diseño factorial AxB

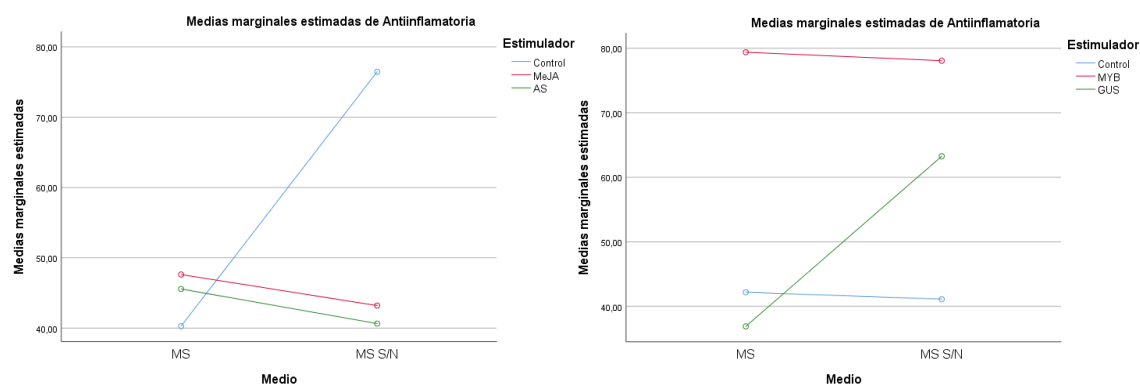


Nota: Los valores representan las medias ajustadas de la capacidad antioxidantes en función de los niveles de los factores medio de cultivo y estimulador. Los análisis fueron realizados en SPSS y se utilizó un modelo de efectos principales.

Respecto a la actividad antiinflamatoria de las antocianinas extraídas de las plántulas como se observa en la figura 17, muestra diferencias significativas respecto al medio de donde se obtuvieron siendo mayor cuando se cultivan en MS S/N. Mientras que, las interacciones entre el medio y el estimulador, si bien muestran diferencias significativas, la inhibición obtenida es casi similar. Por otro lado, en las raíces transformadas se observa que la actividad biológica de las antocianinas varía respecto al medio en las que se obtuvieron, afectando a la actividad antiinflamatoria e indicando que es más significativa en las antocianinas producidas en el medio MS.

Figura 17.

Medias marginales de la actividad antiinflamatoria del ANOVA de diseño factorial AxB



Nota: . Los valores representan las medias ajustadas de la actividad antiinflamatoria en función de los niveles de los factores medio de cultivo y estimulador. Los análisis fueron realizados en SPSS y se utilizó un modelo de efectos principales.

Finalmente, se realizó una prueba post hoc de Tukey para analizar las diferencias significativas, donde se observó que la capacidad antioxidante en plántulas respecto a los reguladores de crecimiento no difiere significativamente entre sí, aunque ambos difieren del control; reflejando valores de significancia mayores a 0.05 ($p \text{ value} > 0.119$) y un error cuadrático de 7.982 que refleja la variabilidad entre las medias, la prueba post hoc se reporta en el anexo 6

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El tratamiento más efectivo para establecer plántulas de col morada fue el tratamiento 1 en el cual las semillas fueron sumergidas en una solución de AG3 a 4°C posterior a la desinfección, logrando una tasa de germinación promedio del 83% en ambos medios, favoreciendo la ruptura de la dormancia y reduciendo significativamente el tiempo de germinación y obteniendo plántulas a los 7 días.
- En la optimización de cultivos se observó que el medio MS promovió un mayor crecimiento y elongación (> 13 cm) en comparación con el medio MS S/N (< 10 cm), que indujo la atrofia celular debido a la deficiencia de nitrógeno e inhibiendo el crecimiento y la elongación de los haces vasculares, tanto en plántulas como en las raíces transformadas.
- En cuanto a los reguladores de crecimiento; se encontró que concentraciones altas de MeJA y AS tuvieron un efecto más relacionado con la inducción de estrés que con la regulación de crecimiento, mostrando efectos similares a los de la deficiencia de nitrógeno. En las plántulas estos reguladores redujeron el crecimiento considerablemente mientras que en las raíces transformadas lo inhibieron parcial o totalmente. En cambio, AtMYB12 como factor de transcripción promovió la formación de raíces transformadas robustas con una mayor presencia de ramificaciones en MS en comparación con las raíces cultivadas en MS S/N.
- La cianidina resultó ser la antocianidina predominante (~ 50%) en todas las condiciones experimentales. La deficiencia de nitrógeno en el medio favoreció la acumulación de antocianinas en las plántulas debido al estrés, alcanzando un total de 45.07 mg Cya-3-glu/100 g. Por otro lado, en las raíces transformadas se confirmó la influencia del factor MYB en la ruta de los fenilpropanoides incrementando la biosíntesis de antocianinas lo que resultó en un contenido total de antocianinas de 49.49 mg Cya-3-glu/100 g; un 9.8% más que en las plántulas demostrando el potencial uso de la transformación genética para acumular metabolitos secundarios.
- En los análisis de capacidad antioxidante los extractos de raíces transformadas mostraron una mayor eficiencia en comparación con las plántulas, destacando el efecto positivo del factor MYB en la biosíntesis de compuestos bioactivos donde se obtuvo 72.10%, a diferencia del extracto de plántulas cultivadas en MS S/N donde la capacidad antioxidante fue del 65%.

- De manera similar la actividad antiinflamatoria fue mayor en los extractos de raíces transformadas con MYB alcanzando una inhibición del 79.4% a una concentración de antocianinas de 1000 µg/mL mientras que el extracto obtenido de las plántulas en medio MS S/N fue del 76,49%. Aunque la diferencia no fue significativa, los resultados sugieren el potencial uso de los extractos obtenidos de cultivos *in vitro* como potenciales agentes naturales antioxidantes y antiinflamatorios.
- En términos generales se puede concluir que el uso de biofactorías vegetales ya sea plántulas o raíces transformadas genéticamente con factores de transcripción, podrían representar una alternativa viable para la producción de antocianinas a escala industrial.

4.2. Recomendaciones

- Realizar estudios con diferentes concentraciones menores a 500 µM de MeJA y AS con la finalidad de determinar los umbrales de concentración que inducen estrés sin comprometer el crecimiento de las plántulas y raíces, evaluando su impacto sobre el crecimiento, biosíntesis de metabolitos secundarios puntuales que interviene en la ruta de la producción de antocianinas y actividades biológicas de estos extractos.
- Complementar este estudio con un perfil detallado de los metabolitos secundarios presentes en las muestras como flavonoides, ácidos fenólicos, terpenoides, ácidos grasos entre otros compuestos bioactivos, además de confirmar los tipos de antocianinas presentes en los extractos mediante técnicas más precisas como HPLC-MS
- Para complementar el perfil de compuestos bioactivos presentes en la col morada se debería realizar un estudio metabolómico no dirigido mediante resonancia magnética nuclear (RMN) , para obtener una visión más detallada de las interacciones metabólicas.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria con pruebas más precisas como la inhibición de la producción de citoquinas o investigar la reducción de genes proinflamatorios como COX-2 en líneas celulares control, además de considerar estudios *in vivo* en modelos animales para comprender de mejor manera los mecanismos de acción de las antocianinas en condiciones fisiológicas reales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2014). Anthocyanins Contents, Profiles, and Color Characteristics of Red Cabbage Extracts from Different Cultivars and Maturity Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30), 7524–7531. <https://doi.org/10.1021/jf501991q>
- An, J., Xu, R., Liu, X., Zhang, J., Wang, X., You, C., & Hao, Y. (2021). Jasmonate induces biosynthesis of anthocyanin and proanthocyanidin in apple by mediating the JAZ1–TRB1–MYB9 complex. *The Plant Journal*, 106(5), 1414–1430. <https://doi.org/10.1111/tpj.15245>
- Appelhaagen, I., Wulff, A. K., Wendell, M., Hvorslef, A., Russell, J., Oertel, A., Martens, S., Mock, H., Martin, C., & Matros, A. (2018). Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. *Metabolic Engineering*, 48, 218–232. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.06.004>
- Asano, S., Ohtsubo, S., Nakajima, M., Kusunoki, M., Kaneko, K., Katayama, H., & Nawa, Y. (2002). Production of Anthocyanins by Habituated Cultured Cells of Nyoho Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Food Science and Technology Research*, 8(1), 64–69. <https://doi.org/10.3136/fstr.8.64>
- Bagautdinova, Z. Z., Omelyanchuk, N., Tyapkin, A. V., Kovrizhnykh, V. V., Lavrekha, V. V., & Zemlyanskaya, E. V. (2022). Salicylic Acid in Root Growth and Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2228. <https://doi.org/10.3390/ijms23042228>
- Barba, G., Chen, S.-T., Agnolet, S., Hegelund, J., Stanstrup, J., Christensen, J. H., Müller, R., & Lütken, H. (2020). Ethephon-induced changes in antioxidants and phenolic compounds in anthocyanin-producing black carrot hairy root cultures. *Journal of Experimental Botany*, 71(22), 7030–7045. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa376>
- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, I. D., Venskutonis, P. R., Georgiev, M. I., Clément, C., & Luo, Z. (2020a). Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological advances. *Biotechnology Advances*, 43, 107600. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107600>
- Belwal, T., Singh, G., Jeandet, P., Pandey, A., Giri, L., Ramola, S., Bhatt, I. D., Venskutonis, P. R., Georgiev, M. I., Clément, C., & Luo, Z. (2020b). Anthocyanins, multi-functional natural products of industrial relevance: Recent biotechnological

- advances. *Biotechnology Advances*, 43, 107600.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107600>
- Biała, W., & Jasiński, M. (2018). The Phenylpropanoid Case – It Is Transport That Matters. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01610>
- Bulgakov, V. P. (2008). Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 26(4), 318–324.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.001>
- Cai, Z., Knorr, D., & Smetanska, I. (2012). Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.09.001>
- Cappellini, F., Marinelli, A., Toccaceli, M., Tonelli, C., & Petroni, K. (2021). Anthocyanins: From Mechanisms of Regulation in Plants to Health Benefits in Foods. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748049>
- Charron, C. S., Clevidence, B. A., Britz, S. J., & Novotny, J. A. (2007). Effect of Dose Size on Bioavailability of Acylated and Nonacylated Anthocyanins from Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. *capitata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5354–5362. <https://doi.org/10.1021/jf0710736>
- Chavan, J. J., Kshirsagar, P. R., Jadhav, S. G., Nalavade, V. M., Gurme, S. T., & Pai, S. R. (2021). Elicitor-mediated enhancement of biomass, polyphenols, mangiferin production and antioxidant activities in callus cultures of *Salacia chinensis* L. 3 *Biotech*, 11(6), 285. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02836-2>
- Chen, L.-P., Zhang, M.-F., Xiao, Q.-B., Wu, J.-G., & Hirata, Y. (2004). Plant Regeneration from Hypocotyl Protoplasts of Red Cabbage (*Brassica Oleracea*) by Using Nurse Cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77(2), 133–138. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016811.29125.18>
- Dabravolski, S. A., & Isayenkov, S. V. (2023). The Role of Anthocyanins in Plant Tolerance to Drought and Salt Stresses. *Plants*, 12(13), 2558. <https://doi.org/10.3390/plants12132558>
- Daud, N., Hasbullah, N., Azis, N., Rasad, F., Amin, M., & Lassim, M. (2015, April 7). In Vitro Regeneration of *Brassica oleracea* L. var *Capitata* through stems, roots, leaves and petioles culture. *International Conference on Agricultural, Ecological and Medical Sciences (AEMS-2015) April 7-8, 2015 Phuket (Thailand)*. <https://doi.org/10.15242/IICBE.C0415004>

- Dong, N., & Lin, H. (2021). Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant–environment interactions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 180–209. <https://doi.org/10.1111/jipb.13054>
- Dubos, C., Le Gourrierc, J., Baudry, A., Huep, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J., Alboresi, A., Weisshaar, B., & Lepiniec, L. (2008). MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 55(6), 940–953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03564.x>
- Fang, S., Lin, F., Qu, D., Liang, X., & Wang, L. (2018). Characterization of Purified Red Cabbage Anthocyanins: Improvement in HPLC Separation and Protective Effect against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Molecules*, 24(1), 124. <https://doi.org/10.3390/molecules24010124>
- Farré, G., Blancquaert, D., Capell, T., Van Der Straeten, D., Christou, P., & Zhu, C. (2014). Engineering Complex Metabolic Pathways in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 187–223. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035825>
- Fenger, J., Moloney, M., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Dangles, O. (2019). The influence of acylation, metal binding and natural antioxidants on the thermal stability of red cabbage anthocyanins in neutral solution. *Food & Function*, 10(10), 6740–6751. <https://doi.org/10.1039/C9FO01884K>
- Ferrer, J.-L., Austin, M. B., Stewart, C., & Noel, J. P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 356–370. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.009>
- Gambhir, G., Kumar, P., & Srivastava, D. K. (2017). High frequency regeneration of plants from cotyledon and hypocotyl cultures in Brassica oleracea cv. Pride of India. *Biotechnology Reports*, 15, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.005>
- Gambhir, G., & Srivastava, D. (2015). Thidiazuron Induces High Frequency Shoot Regeneration in Leaf and Petiole Explants of Cabbage (Brassica Oleracea L. Var. Capitata). *Journal of Biotechnology & Biomaterials*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000172>
- Gandhi, A., Soga, K., Thakur, V., & Mal, D. (2022). Nutritional Quality of Red Cabbage (Brassica oleracea var. Capitata F. Rubra): A Review. *Ecology, Environment and Conservation*, 28, 243–246. <https://doi.org/10.53550/EEC.2022.v28i07s.040>
- Gerszberg, A. (2018). Tissue culture and genetic transformation of cabbage (Brassica oleracea var. capitata): an overview. *Planta*, 248(5), 1037–1048. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2961-3>

- Gerszberg, A., Hnatuszko, K., & Kowalczyk, T. (2015). In vitro regeneration of eight cultivars of *Brassica oleracea* var. capitata. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51(1), 80–87. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9648-7>
- Ghareaghajlou, N., Hallaj, S., & Ghasempour, Z. (2021). Red cabbage anthocyanins: Stability, extraction, biological activities and applications in food systems. *Food Chemistry*, 365, 130482. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130482>
- Gul, N., Masoodi, K. Z., Ramazan, S., Mir, J. I., & Aslam, S. (2023). Study on the impact of exogenously applied methyl jasmonate concentrations on *Solanum lycopersicum* under low temperature stress. *BMC Plant Biology*, 23(1), 437. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04449-8>
- Hasan, Alaa. M., ElKaaby, Ekhlas. A. J., & AL-Jumaily, Rakad. M. Kh. (2021). In Vitro Effects of Different Combinations of Phytohormones on Callus Induction from Different Explants of Cabbage *Brassica Oleracea* Var. Capitata L. Seedlings. *Iraqi Journal of Science*, 3476–3486. <https://doi.org/10.24996/ijs.2021.62.10.7>
- Hidalgo, D., Georgiev, M., Marchev, A., Bru-Martínez, R., Cusido, R. M., Corchete, P., & Palazon, J. (2017). Tailoring tobacco hairy root metabolism for the production of stilbenes. *Scientific Reports*, 7(1), 17976. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18330-w>
- Jezek, M., Allan, A. C., Jones, J. J., & Geilfus, C. (2023). Why do plants blush when they are hungry? *New Phytologist*, 239(2), 494–505. <https://doi.org/10.1111/nph.18833>
- Johnson, A. J., Geary, B., Hulet, A., & Madsen, M. D. (2023). Breaking Dormancy and Increasing Restoration Success of Native *Penstemon* Species Using Gibberellic Acid Seed Coatings and U-Shaped Furrows. *Plants*, 12(23), 4005. <https://doi.org/10.3390/plants12234005>
- Kalthum Ib, U., Idayu Muha, I., & Mohd Salle, R. (2011). The Effect of pH on Color Behavior of *Brassica oleracea* Anthocyanin. *Journal of Applied Sciences*, 11(13), 2406–2410. <https://doi.org/10.3923/jas.2011.2406.2410>
- Kamińska, M. (2021). Role and activity of jasmonates in plants under in vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(3), 425–447. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02091-6>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>

- Koo, Y. M., Heo, A. Y., & Choi, H. W. (2020). Salicylic Acid as a Safe Plant Protector and Growth Regulator. *The Plant Pathology Journal*, 36(1), 1–10. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295>
- Krokene, P., Kohmann, K., Huynh, N. B., & Mageroy, M. H. (2023). Methyl jasmonate, salicylic acid, and oxalic acid affects growth, inducible defenses, and pine weevil resistance in Norway spruce. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1155170>
- Kubra, G., Khan, M., Munir, F., Gul, A., Shah, T., Hussain, A., Caparrós-Ruiz, D., & Amir, R. (2021). Expression Characterization of Flavonoid Biosynthetic Pathway Genes and Transcription Factors in Peanut Under Water Deficit Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.680368>
- Kumchai, J., Huang, J.-Z., Lee, C.-Y., Chen, F.-C., & Chin, S.-W. (2013). Proline partially overcomes excess molybdenum toxicity in cabbage seedlings grown in vitro. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 5589–5601. <https://doi.org/10.4238/2013.November.18.8>
- Lakehal, A., & Bellini, C. (2019). Control of adventitious root formation: insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*, 165(1), 90–100. <https://doi.org/10.1111/ppl.12823>
- Lee, H. W., Zhang, H., Liang, X., & Ong, C. N. (2020). Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols and phyloquinone in 12 Brassicaceae vegetables. *LWT*, 130, 109649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109649>
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 405–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105252>
- Li, A., Sun, X., & Liu, L. (2022). Action of Salicylic Acid on Plant Growth. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.878076>
- Li, C., Wang, P., Menzies, N. W., Lombi, E., & Kopittke, P. M. (2018). Effects of methyl jasmonate on plant growth and leaf properties. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 181(3), 409–418. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700373>
- Li, Z., & Ahammed, G. J. (2023). Plant stress response and adaptation via anthocyanins: A review. *Plant Stress*, 10, 100230. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100230>

- Liu, J., Osbourn, A., & Ma, P. (2015). MYB Transcription Factors as Regulators of Phenylpropanoid Metabolism in Plants. *Molecular Plant*, 8(5), 689–708. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.012>
- Lu, Z., Wang, X., Lin, X., Mostafa, S., Zou, H., Wang, L., & Jin, B. (2024). Plant anthocyanins: Classification, biosynthesis, regulation, bioactivity, and health benefits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 217, 109268. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.109268>
- Maia, V. M., Pegoraro, R. F., Aspiazú, I., Oliveira, F. S., & Nobre, D. A. C. (2020). Diagnosis and management of nutrient constraints in pineapple. In *Fruit Crops* (pp. 739–760). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818732-6.00050-2>
- Major, I. T., Yoshida, Y., Campos, M. L., Kapali, G., Xin, X., Sugimoto, K., de Oliveira Ferreira, D., He, S. Y., & Howe, G. A. (2017). Regulation of growth–defense balance by the JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-MYC transcriptional module. *New Phytologist*, 215(4), 1533–1547. <https://doi.org/10.1111/nph.14638>
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L., & Silva, P. (2020). Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173809>
- Mejías, N., Vega, A., Gomez, L. S., Pasten, A., Uribe, E., Cortés, A., Valenzuela, G., Camus, J., Delporte, C., & Bernal, G. (2024). Health-Promoting Properties of Processed Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra): Effects of Drying Methods on Bio-Compound Retention. *Foods*, 13(6), 830. <https://doi.org/10.3390/foods13060830>
- Mejías, N., Vega-Galvez, A., Gomez-Perez, L. S., Pasten, A., Uribe, E., Cortés, A., Valenzuela-Barra, G., Camus, J., Delporte, C., & Bernal, G. (2024). Health-Promoting Properties of Processed Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra): Effects of Drying Methods on Bio-Compound Retention. *Foods*, 13(6), 830. <https://doi.org/10.3390/foods13060830>
- Meng, J., Gao, Y., Han, M., Liu, P., Yang, C., Shen, T., & Li, H. (2020). In vitro Anthocyanin Induction and Metabolite Analysis in *Malus spectabilis* Leaves Under Low Nitrogen Conditions. *Horticultural Plant Journal*, 6(5), 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.06.004>

- Miceli, A., Moncada, A., Sabatino, L., & Vetrano, F. (2019a). Effect of Gibberellic Acid on Growth, Yield, and Quality of Leaf Lettuce and Rocket Grown in a Floating System. *Agronomy*, 9(7), 382. <https://doi.org/10.3390/agronomy9070382>
- Miceli, A., Moncada, A., Sabatino, L., & Vetrano, F. (2019b). Effect of Gibberellic Acid on Growth, Yield, and Quality of Leaf Lettuce and Rocket Grown in a Floating System. *Agronomy*, 9(7), 382. <https://doi.org/10.3390/agronomy9070382>
- Mineykina, A., Bondareva, L., Soldatenko, A., & Domblides, E. (2021). Androgenesis of Red Cabbage in Isolated Microspore Culture In Vitro. *Plants*, 10(9), 1950. <https://doi.org/10.3390/plants10091950>
- Misra, P., Pandey, A., Tiwari, M., Chandrashekar, K., Sidhu, O. P., Asif, M. H., Chakrabarty, D., Singh, P. K., Trivedi, P. K., Nath, P., & Tuli, R. (2010). Modulation of Transcriptome and Metabolome of Tobacco by Arabidopsis Transcription Factor, *AtMYB12*, Leads to Insect Resistance. *Plant Physiology*, 152(4), 2258–2268. <https://doi.org/10.1104/pp.109.150979>
- Moreau, H., Verhelst, B., Couloux, A., Derelle, E., Rombauts, S., Grimsley, N., Van Bel, M., Poulain, J., Katinka, M., Hohmann-Marriott, M. F., Piganeau, G., Rouzé, P., Da Silva, C., Wincker, P., Van de Peer, Y., & Vandepoele, K. (2012). Gene functionalities and genome structure in *Bathycoccus prasinos* reflect cellular specializations at the base of the green lineage. *Genome Biology*, 13(8), R74. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r74>
- Moreno, A., Martínez, E., van den Berg, N., & Pliego, C. (2024). Effects of Exogenous Application of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on the Physiological and Molecular Response of ‘Dusa’ Avocado to *Rosellinia necatrix*. *Plant Disease*, 108(7), 2111–2121. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-23-2316-RE>
- Müller, J., König, Y., Kaiser, S., Löffke, C., Krebs, M., & Scheuring, D. (2024). *Salicylic Acid restricts cell elongation and induces changes of vacuolar morphology and pH*. <https://doi.org/10.1101/2024.09.06.611645>
- Munim Twaij, B., Jazar, Z. H., & Hasan, M. N. (2019). The effects of elicitors and precursor on in-vitro cultures of *Trifolium resupinatum* for sustainable metabolite accumulation and antioxidant activity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101337. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101337>
- Murthy, H., Joseph, K., Paek, K. Y., & Park, S.-Y. (2023). Anthocyanin Production from Plant Cell and Organ Cultures In Vitro. *Plants*, 13(1), 117. <https://doi.org/10.3390/plants13010117>

- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61442>
- Narvaez, J. J., & Segura, M. R. (2021). Cabbage (*Brassica oleracea* var. **capitata**): A food with functional properties aimed to type 2 diabetes prevention and management. *Journal of Food Science*, 86(11), 4775–4798. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15939>
- Nawaz, H., Shad, M. A., & Muzaffar, S. (2018). Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of Brassica. In *Brassica Germplasm - Characterization, Breeding and Utilization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76120>
- Nguyen, B. Van, Kim, J. K., Lim, J., Kim, K., Sathasivam, R., Cho, D. H., & Park, S. U. (2024). Enhancement of Phenylpropanoid Accumulation and Antioxidant Activities of *Agastache rugosa* Transgenic Hairy Root Cultures by Overexpressing the Maize Lc Transcription Factor. *Applied Sciences*, 14(20), 9617. <https://doi.org/10.3390/app14209617>
- Pacheco, A. C., & Gorni, P. H. (2021). Elicitation with Salicylic Acid as a Tool for Enhance Bioactive Compounds in Plants. In *Salicylic Acid - A Versatile Plant Growth Regulator* (pp. 1–15). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-79229-9_1
- Pandey, A., Misra, P., Chandrashekar, K., & Trivedi, P. K. (2012). Development of AtMYB12-expressing transgenic tobacco callus culture for production of rutin with biopesticidal potential. *Plant Cell Reports*, 31(10), 1867–1876. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1300-6>
- Pandey, A., Misra, P., Khan, M. P., Swarnkar, G., Tewari, M. C., Bhambhani, S., Trivedi, R., Chattopadhyay, N., & Trivedi, P. K. (2014). Co-expression of *Arabidopsis* transcription factor, At *MYB12*, and soybean isoflavone synthase, *GmIFS1*, genes in tobacco leads to enhanced biosynthesis of isoflavones and flavonols resulting in osteoprotective activity. *Plant Biotechnology Journal*, 12(1), 69–80. <https://doi.org/10.1111/pbi.12118>
- Passeri, V., Koes, R., & Quattrocchio, F. M. (2016). New Challenges for the Design of High Value Plant Products: Stabilization of Anthocyanins in Plant Vacuoles. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00153>

- Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., Palme, K., & Mironova, V. V. (2019a). Salicylic Acid Affects Root Meristem Patterning via Auxin Distribution in a Concentration-Dependent Manner. *Plant Physiology*, 180(3), 1725–1739. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00130>
- Pasternak, T., Groot, E. P., Kazantsev, F. V., Teale, W., Omelyanchuk, N., Kovrizhnykh, V., Palme, K., & Mironova, V. V. (2019b). Salicylic Acid Affects Root Meristem Patterning via Auxin Distribution in a Concentration-Dependent Manner. *Plant Physiology*, 180(3), 1725–1739. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00130>
- Pasternak, T. P., & Steinmacher, D. (2024). Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. *Plants*, 13(2), 327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>
- Pavlović, S., Vinterhalter, B., Zdravković, S., Vinterhalter, D., Zdravković, J., Cvikić, D., & Mitić, N. (2013). Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(3), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0279-6>
- Pei, Z., Huang, Y., Ni, J., Liu, Y., & Yang, Q. (2024). For a Colorful Life: Recent Advances in Anthocyanin Biosynthesis during Leaf Senescence. *Biology*, 13(5), 329. <https://doi.org/10.3390/biology13050329>
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55(3), 242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Piccaglia, R., Marotti, M., & Baldoni, G. (2002). Factors influencing anthocyanin content in red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L f. *rubra* (L) Thell). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(13), 1504–1509. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1226>
- Pokotylo, I., Hodges, M., Kravets, V., & Ruelland, E. (2022). A ménage à trois: salicylic acid, growth inhibition, and immunity. *Trends in Plant Science*, 27(5), 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.008>
- Pusty, K., Kumar, K., Giri, S., Raj, G., Tiwari, A., Shaikh, A., & Béla, K. (2024). Ultrasound assisted phytochemical extraction of red cabbage by using deep eutectic solvent: Modelling using ANFIS and optimization by genetic algorithms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 102, 106762. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106762>

- Rezazadehfar, P., Rezayian, M., Niknam, V., & Mirmasoumi, M. (2024). Elicitor-enhanced steroidal saponin accumulation in hairy root cultures of *Trigonella foenum-graecum*. *Scientific Reports*, 14(1), 19106. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-69625-8>
- Saad, K. R., Parvatam, G., & Shetty, N. P. (2018). Medium composition potentially regulates the anthocyanin production from suspension culture of *Daucus carota*. 3 *Biotech*, 8(3), 134. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1146-x>
- Sadowska, I., & Bartosz, G. (2024). Antioxidant Activity of Anthocyanins and Anthocyanidins: A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12001. <https://doi.org/10.3390/ijms252212001>
- Saeed, W., Ismail, T., Qamar, M., & Esatbeyoglu, T. (2024). Bioactivity Profiling and Phytochemical Analysis of *Carissa carandas* Extracts: Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Urinary Tract Infection Properties. *Antioxidants*, 13(9), 1037. <https://doi.org/10.3390/antiox13091037>
- Salazar, S., Martínez, N., García, J., Pérez, R., & Martínez, R. D. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, 208, 85–98. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.010>
- Sehgal, H., & Joshi, M. (2022). The journey and new breakthroughs of plant growth regulators in tissue culture. In *Advances in Plant Tissue Culture* (pp. 85–108). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90795-8.00002-3>
- Sharma, U. S., & Kumar, A. (2011). In vitro antioxidant activity of *Rubus ellipticus* fruits. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(1), 47–50. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79805>
- Shen, C., Ma, F., Gao, S., Zhou, J., Huang, D., Huang, R., Li, H., & Tang, B. (2025). Concentration-Dependent Bioactivity Profiles of Hesperetin and Naringenin: Insights into Antibacterial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Effects. *ACS Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00538>
- Shi, L., Li, X., Fu, Y., & Li, C. (2023a). Environmental Stimuli and Phytohormones in Anthocyanin Biosynthesis: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16415. <https://doi.org/10.3390/ijms242216415>
- Shi, L., Li, X., Fu, Y., & Li, C. (2023b). Environmental Stimuli and Phytohormones in Anthocyanin Biosynthesis: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16415. <https://doi.org/10.3390/ijms242216415>

- Siatka, T. (2019). Effects of Growth Regulators on Production of Anthocyanins in Callus Cultures of *Angelica archangelica*. *Natural Product Communications*, 14(6), 1934578X1985734. <https://doi.org/10.1177/1934578X19857344>
- Song, H., Yi, H., Lee, M., Han, C.-T., Lee, J., Kim, H., Park, J.-I., Nou, I.-S., Kim, S.-J., & Hur, Y. (2018). Purple Brassica oleracea var. capitata F. rubra is due to the loss of BoMYBL2–1 expression. *BMC Plant Biology*, 18(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1290-9>
- Statilko, O., Tsiaka, T., Sinanoglou, V. J., & Strati, I. F. (2024). Overview of Phytochemical Composition of Brassica oleraceae var. capitata Cultivars. *Foods*, 13(21), 3395. <https://doi.org/10.3390/foods13213395>
- Stoica, R., Ganciarov, M., Constantinescu, D., Capră, L., Șuică, I., Senin, R., Pricope, G., Ivan, G., Călin, C., & Oancea, F. (2023). Sustainable Recovery of Anthocyanins and Other Polyphenols from Red Cabbage Byproducts. *Foods*, 12(22), 4157. <https://doi.org/10.3390/foods12224157>
- Strauch, R. C., Mengist, M. F., Pan, K., Yousef, G. G., Iorizzo, M., Brown, A. F., & Lila, M. A. (2019). Variation in anthocyanin profiles of 27 genotypes of red cabbage over two growing seasons. *Food Chemistry*, 301, 125289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125289>
- Tan, S., Lan, X., Chen, S., Zhong, X., & Li, W. (2023). Physical character, total polyphenols, anthocyanin profile and antioxidant activity of red cabbage as affected by five processing methods. *Food Research International*, 169, 112929. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112929>
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>
- Tuan, P. A., Kumar, R., Rehal, P. K., Toora, P. K., & Ayele, B. T. (2018). Molecular Mechanisms Underlying Absciscic Acid/Gibberellin Balance in the Control of Seed Dormancy and Germination in Cereals. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00668>
- Ullah, A., Munir, S., Badshah, S. L., Khan, N., Ghani, L., Poulson, B. G., Emwas, A.-H., & Jaremko, M. (2020). Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, 25(22), 5243. <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>

- USDA. (2022, October 28). *Cabbage, red, raw*. <https://fdc.nal.usda.gov/food-details/2346408/nutrients>.
- Vasugi, S. (2018). In vitro antioxidant activity of Brassica oleracea , Aristolochia bracteolata leaves extract. *Enviromental Science, Medicine*.
- Vega, A., Gomez, L. S., Zepeda, F., Vidal, R. L., Grunenwald, F., Mejías, N., Pasten, A., Araya, M., & Ah, K. S. (2023a). Assessment of Bio-Compounds Content, Antioxidant Activity, and Neuroprotective Effect of Red Cabbage (Brassica oleracea var. Capitata rubra) Processed by Convective Drying at Different Temperatures. *Antioxidants*, 12(9), 1789. <https://doi.org/10.3390/antiox12091789>
- Vega, A., Gomez, L. S., Zepeda, F., Vidal, R. L., Grunenwald, F., Mejías, N., Pasten, A., Araya, M., & Ah, K. S. (2023b). Assessment of Bio-Compounds Content, Antioxidant Activity, and Neuroprotective Effect of Red Cabbage (Brassica oleracea var. Capitata rubra) Processed by Convective Drying at Different Temperatures. *Antioxidants*, 12(9), 1789. <https://doi.org/10.3390/antiox12091789>
- Wang, Y., Liu, W., Jiang, H., Mao, Z., Wang, N., Jiang, S., Xu, H., Yang, G., Zhang, Z., & Chen, X. (2019). The R2R3-MYB transcription factor MdMYB24-like is involved in methyl jasmonate-induced anthocyanin biosynthesis in apple. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.031>
- Wang, Y., Wang, N., Xu, H., Jiang, S., Fang, H., Su, M., Zhang, Z., Zhang, T., & Chen, X. (2018). Auxin regulates anthocyanin biosynthesis through the Aux/IAA–ARF signaling pathway in apple. *Horticulture Research*, 5(1), 59. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0068-4>
- Wiczowski, W., Szawara, D., & Topolska, J. (2013). Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, 51(1), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.015>
- Wu, X., Xia, M., Su, P., Zhang, Y., Tu, L., Zhao, H., Gao, W., Huang, L., & Hu, Y. (2024). MYB transcription factors in plants: A comprehensive review of their discovery, structure, classification, functional diversity and regulatory mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282, 136652. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.136652>
- Xiao, Z., Lester, G. E., Luo, Y., & Wang, Q. (2012). Assessment of Vitamin and Carotenoid Concentrations of Emerging Food Products: Edible Microgreens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7644–7651. <https://doi.org/10.1021/jf300459b>

- Xu, S., Li, G., Zhou, J., Chen, G., & Shao, J. (2022). Efficient production of anthocyanins in *Saccharomyces cerevisiae* by introducing anthocyanin transporter and knocking out endogenous degrading enzymes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.899182>
- Yan, Y., Li, Z., & Koffas, M. A. G. (2008). High-yield anthocyanin biosynthesis in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(1), 126–140. <https://doi.org/10.1002/bit.21721>
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., & Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349>
- Ye, J. Y., Tian, W. H., & Jin, C. W. (2022). Nitrogen in plants: from nutrition to the modulation of abiotic stress adaptation. *Stress Biology*, 2(1), 4. <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00030-1>
- Yesmin, S., Paul, A., Naz, T., Rahman, A. B. M. A., Akhter, S. F., Wahed, M. I. I., Emran, T. Bin, & Siddiqui, S. A. (2020). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*, 6(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00207-7>
- Yin, Y., Borges, G., Sakuta, M., Crozier, A., & Ashihara, H. (2012). Effect of phosphate deficiency on the content and biosynthesis of anthocyanins and the expression of related genes in suspension-cultured grape (*Vitis* sp.) cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.03.009>
- Zha, J., & Koffas, M. A. G. (2017). Production of anthocyanins in metabolically engineered microorganisms: Current status and perspectives. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(4), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.10.005>
- Zhang, J., Song, B., Chen, G., Yang, G., Ming, M., Zhang, S., Xue, Z., Han, C., Li, J., & Wu, J. (2024). Transcriptome Analysis Identified PyNAC42 as a Positive Regulator of Anthocyanin Biosynthesis Induced by Nitrogen Deficiency in Pear (*Pyrus* spp.). *Horticulturae*, 10(9), 980. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10090980>
- Zhang, N., Jiao, S., & Jing, P. (2021). Red Cabbage Rather Than Green Cabbage Increases Stress Resistance and Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, 10(6), 930. <https://doi.org/10.3390/antiox10060930>

- Zhang, N., Sun, Q., Li, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, H., Li, S., Zhang, L., Qi, Y., Ren, S., Zhao, B., & Guo, Y.-D. (2016). Melatonin Improved Anthocyanin Accumulation by Regulating Gene Expressions and Resulted in High Reactive Oxygen Species Scavenging Capacity in Cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00197>
- Zhang, X., Jia, Q., Jia, X., Li, J., Sun, X., Min, L., Liu, Z., Ma, W., & Zhao, J. (2024). *Brassica* Vegetables - An Undervalued Nutritional Goldmine. *Horticulture Research*. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae302>
- Zhang, Y., Liu, Z., Liu, J., Lin, S., Wang, J., Lin, W., & Xu, W. (2017). GA-DELTA pathway is involved in regulation of nitrogen deficiency-induced anthocyanin accumulation. *Plant Cell Reports*, 36(4), 557–569. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2102-7>
- Zhong, Q., Hu, H., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021). Biosynthesis and Roles of Salicylic Acid in Balancing Stress Response and Growth in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11672. <https://doi.org/10.3390/ijms222111672>
- Zlotorynski, E. (2020). The secret of increased (root) hair density. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(11), 657–657. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00302-0>

ANEXOS

Anexo 1. Composiciones de los medios MS y MS S/N

Tabla 7.

Descripción de los componentes inorgánicos y orgánicos para un litro (L) de medio MS completo

Componentes Inorgánicos		Componentes Orgánicos	
Macronutrientes		Vitaminas	
KNO ₃	1900	Piridoxina HCl	0.50
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	Ácido Nicotínico	0.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	Tiamina HCl	0.10
NH ₄ NO ₃	1650	Glicina	2.00
KH ₂ PO ₄	170		
Micronutrientes		Otros	
KI	0.83	Sucrosa	30 g/L
H ₃ BO ₃	6.20	Mionositol	100
MnSO ₄ ·H ₂ O	22.30	Phytigel	2.7 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80		
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.30		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	pH	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	5.8 ± 0.2	

Nota: Todas las cantidades se encuentran expresadas en mg/L

Tabla 8.

Descripción de los componentes inorgánicos y orgánicos para un litro (L) de medio MS libre de nitratos

Componentes Inorgánicos		Componentes Orgánicos	
Macronutrientes		Vitaminas	
KCl	709.91	Piridoxina HCl	0.50
CaCl ₂	332.20	Ácido Nicotínico	0.50
MgSO ₄	180.70	Tiamina HCl	0.10
K ₂ SO ₄	1637.89		
KH ₂ PO ₄	170.00		
Micronutrientes		Otros	
KI	0.830	Sucrosa	30 g/L
KCl	709.91	Mionositol	100
H ₃ BO ₃	6.200	Phytigel	2.7 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.600		
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.900		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.250		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80		
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.26		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	pH	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	5.8 ± 0.2	

Nota: Todas las cantidades se encuentran expresadas en mg/L

Anexo 2. Resultados de los tratamientos post-desinfección

Tabla 9.

Tratamientos de semillas para la obtención de plántulas de col lombarda

Resultados	Medio	Tratamiento					Control
		AG3 4 °C	AG3 25 °C	AG3 -20 °C	Luz 25 °C	Oscuridad 25 °C	
Tasa de germinación	MS	84,17%	69,17%	75,00%	58,33%	65,00%	73,33%
	MS S/N	82,50%	67,50%	73,33%	55,83%	63,33%	71,67%
Tasa de contaminación	MS	15,83%	30,83%	25,00%	41,67%	35,00%	26,67%
	MS S/N	17,50%	32,50%	26,67%	44,17%	36,67%	28,33%
Promedio de germinación	MS	7,21	8,46	9,24	7,46	8,02	8,94
	MS S/N	7,82	9,01	9,86	8,21	8,65	9,30

Nota. Promedio de germinación, contaminación y tiempo analizados por quintuplicado en 30 semillas por cada tratamiento en cada medio.

Anexo 3. Resultados de la concentración relativa de antocianidinas

Tabla 10.

Concentración de las diferentes antocianidinas presentes en los extractos de los medios empleados y su total

Antocianina	Cya	Pnd	Pg	Dfl	Ptn	Mvd	Total
REPOLLO	20,23	4,86	4,88	4,95	2,73	2,84	40,49
MS	15,03	3,40	3,65	3,53	2,23	2,17	30,02
MS MEJA	16,36	4,36	4,24	4,40	2,15	2,30	33,82
MS AS	14,67	3,38	3,51	3,42	2,05	2,11	29,14
MS S/N	22,84	5,18	5,76	5,59	3,15	3,19	45,71
MS S/N MEJA	10,12	2,76	2,59	2,55	1,32	1,94	21,27
MS S/N AS	9,00	2,23	2,11	2,19	1,17	1,69	18,39
MS CS	11,81	2,67	2,65	2,73	1,29	1,52	22,69
MS MYB	27,85	6,70	6,66	6,55	3,97	3,84	55,57
MS GUS	14,34	3,36	3,44	3,32	2,07	1,82	28,35
MS S/N CS	16,03	3,86	3,59	3,74	2,28	2,13	31,62
MS S/N MYB	21,31	5,01	5,05	4,97	2,96	3,13	42,44
MS S/N GUS	17,47	4,15	4,20	4,38	2,23	2,28	34,71

Nota: Todos los valores son el promedio de tres réplicas y se encuentran expresados en mg de Cya-3-glu por cada 100 g de material vegetal utilizado.

Anexo 4. ANOVA del diseño factorial con dos factores en plántulas

Tabla 11.

Análisis de la varianza del contenido total de antocianinas, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria del extracto de antocianinas de plántulas

Pruebas de efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	CTA	1281,353 ^a	5	256,271	7130,733	,000
	Capacidad_Antioxidante	2379,498 ^b	5	475,900	59,623	,000
	Capacidad_Antiinflamatoria	2841,694 ^c	5	568,339	595,514	,000
Intersección	CTA	19505,100	1	19505,100	542729,635	,000
	Capacidad_Antioxidante	34018,753	1	34018,753	4262,055	,000
	Capacidad_Antiinflamatoria	43150,406	1	43150,406	45213,656	,000
Medio_Cultivo	CTA	127,627	1	127,627	3551,221	,000
	Capacidad_Antioxidante	30,264	1	30,264	3,792	,075
	Capacidad_Antiinflamatoria	360,282	1	360,282	377,509	,000
Estimulador	CTA	960,778	2	480,389	13366,825	,000
	Capacidad_Antioxidante	1169,865	2	584,933	73,284	,000
	Capacidad_Antiinflamatoria	812,636	2	406,318	425,746	,000
Medio_Cultivo * Estimulador	CTA	192,949	2	96,474	2684,398	,000
	Capacidad_Antioxidante	1179,368	2	589,684	73,879	,000
	Capacidad_Antiinflamatoria	1668,776	2	834,388	874,285	,000
Error	CTA	,431	12	,036		
	Capacidad_Antioxidante	95,781	12	7,982		
	Capacidad_Antiinflamatoria	11,452	12	,954		
Total	CTA	20786,885	18			
	Capacidad_Antioxidante	36494,032	18			
	Capacidad_Antiinflamatoria	46003,553	18			
Total corregido	CTA	1281,784	17			
	Capacidad_Antioxidante	2475,279	17			
	Capacidad_Antiinflamatoria	2853,147	17			

a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = 1,000)

b. R al cuadrado = ,961 (R al cuadrado ajustada = ,945)

c. R al cuadrado = ,996 (R al cuadrado ajustada = ,994)

Anexo 5. ANOVA del diseño factorial con dos factores en raíces transformadas

Tabla 12.

Análisis de la varianza del contenido total de antocianinas, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria del extracto de antocianinas de las raíces transformadas

Pruebas de efectos inter-sujetos						
Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	CTA	1176,954 ^a	5	235,391	1642,134	,000
	Antioxidante	3231,765 ^b	5	646,353	150,759	,000
	Antiinflamatoria	5581,454 ^c	5	1116,291	2007,577	,000
Intersección	CTA	24756,092	1	24756,092	172703,531	,000
	Antioxidante	54503,913	1	54503,913	12712,810	,000
	Antiinflamatoria	58123,451	1	58123,451	104531,270	,000
Medio	CTA	21,780	1	21,780	151,942	,000
	Antioxidante	567,957	1	567,957	132,474	,000
	Antiinflamatoria	287,600	1	287,600	517,230	,000
Estimulador	CTA	1094,261	2	547,131	3816,894	,000
	Antioxidante	2200,509	2	1100,254	256,630	,000
	Antiinflamatoria	4533,796	2	2266,898	4076,870	,000
Medio * Estimulador	CTA	60,913	2	30,457	212,471	,000
	Antioxidante	463,299	2	231,650	54,031	,000
	Antiinflamatoria	760,057	2	380,029	683,457	,000
Error	CTA	1,720	12	,143		
	Antioxidante	51,448	12	4,287		
	Antiinflamatoria	6,672	12	,556		
Total	CTA	25934,766	18			
	Antioxidante	57787,126	18			
	Antiinflamatoria	63711,578	18			
Total corregido	CTA	1178,674	17			
	Antioxidante	3283,213	17			
	Antiinflamatoria	5588,126	17			

a. R al cuadrado = ,999 (R al cuadrado ajustada = ,998)

b. R al cuadrado = ,984 (R al cuadrado ajustada = ,978)

c. R al cuadrado = ,999 (R al cuadrado ajustada = ,998)

Anexo 6. Pruebas post hoc con análisis estadístico HSD de Tukey

Tabla 13.

Análisis estadísticos de los tratamientos mediante prueba de Tukey

Antioxidante			
HSD Tukey ^{a,b}			
Estimulador	N	Subconjunto	
		1	2
AS	6	36,1033	
MeJA	6	39,6250	
Control	6		54,6917
Sig.		,119	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 7,982.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

b. Alfa = 0,05.

Nota: Los valores promedios representan la influencia de los factores en las respuestas experimentales. Se realizaron comparaciones de medias utilizando la prueba HSD de Tukey ($\alpha=0.05$). Las letras en los subconjuntos homogéneos de la capacidad antioxidante en plántulas indican que no hay diferencias significativas entre AS y MeJA ($p>0.05$). Los datos están basados en medias observadas, con un error cuadrático medio de 7.982.