

# EFFECT OF CULTURE MEDIA ON THE PRODUCTION OF BETALAINS FROM HAIRY ROOT CULTURES OF FOUR CACTI SPECIES

## EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE BETALAÍNAS EN RAÍCES TRANSFORMADAS DE CUATRO ESPECIES DE CACTÁCEAS

Noé I. Contreras-Ovalle<sup>1</sup>, Juan Jáuregui-Rincón<sup>2</sup>, María S. Santos-Díaz<sup>3</sup>, Eugenio Pérez-Molphe-Balch<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. <sup>4</sup>Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad # 940. CP. 20131. Aguascalientes, Aguascalientes, México. (eperezmb@correo.uaa.mx).

### ABSTRACT

Plants of the Cactaceae family are characterized by producing metabolites of interest for the pharmaceutical, food and cosmetic industries. Among these are betalains, which are a class of pigments. However, many of cacti species are small in size, slow growing and threatened or endangered. An alternative for the production of metabolites are biotechnological systems, being transformed roots one of the most interesting. The objective of this study was to determine the most favorable conditions to increment betalains content on *in vitro* hairy root (HR) cultures of *Escobaria chaffeyi*, *Turbiniacarpus laui*, *T. lophophoroides* and *T. pseudopectinatus*, obtained with the A4 strain of *Agrobacterium rhizogenes*, as well as the influence of seven basal media on growth and betalain production. Biomass accumulation, betalain production and root morphology were strongly affected by the basal culture media. The total nitrogen content of the medium influenced significantly biomass accumulation, but not betalain production. The low-phosphate media increased the production of betalains. In general, Driver and Kuniyuki basal media favored the highest biomass yield and production of betalains. These results will optimize the production of betalains in the hairy roots of cacti in order to design an efficient system for producing these pigments.

**Key words:** betalains, *Escobaria chaffeyi*, hairy roots, *Turbiniacarpus laui*, *Turbiniacarpus lophophoroides*, *Turbiniacarpus pseudopectinatus*

### RESUMEN

Las plantas de la familia Cactaceae se caracterizan por la producción de metabolitos de interés para las industrias farmacéutica, alimenticia y de cosméticos. Entre ellos se encuentran las betalainas, una clase de pigmentos. Sin embargo, muchas especies cactáceas son de tamaño pequeño, de lento crecimiento y amenazadas o en peligro. Una alternativa para la producción de metabolitos son los sistemas tecnológicos, las raíces transformadas son uno de los más interesantes. El objetivo del presente estudio fue determinar las condiciones más favorables para incrementar el contenido de betalainas en cultivos *in vitro* de raíz para los cultivos *in vitro* de raíz pilosa (RP) de *Escobaria chaffeyi*, *Turbiniacarpus laui*, *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus*, obtenidos con la cepa A4 de *Agrobacterium rhizogenes*, así como la influencia de siete medios basales sobre el crecimiento y la producción de betalainas. El medio de cultivo basal tuvo un gran efecto en la acumulación de biomasa, la producción de betalaina y la morfología de la raíz. El contenido total de nitrógeno del medio influyó de modo significativo sobre la acumulación de biomasa, pero no en la producción de betalaina. El medio bajo en fosfato aumentó la producción de betalainas. El medio basal Driver y Kuniyuki favoreció la producción más alta de biomasa y la producción de betalainas. Estos resultados optimizarán la producción de betalainas en las raíces pilosas de cactáceas para diseñar un sistema eficiente para la producción de estos pigmentos.

**Palabras clave:** betalainas, *Escobaria chaffeyi*, raíces pilosas, *Turbiniacarpus laui*, *Turbiniacarpus lophophoroides*, *Turbiniacarpus pseudopectinatus*

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: April, 2018. Approved: September, 2019.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 53: 681-696. 2019.

## INTRODUCTION

Cactaceae includes 124 genera and 1427 species found mainly in arid and semiarid regions of America; 586 species can be found in Mexico, more than 70% of which are endemic to the country (Ortega-Baes *et al.*, 2010). Cacti are used since prehispanic times in rituals, traditional medicine and as food and fodder, among many other uses (Jiménez-Sierra and Eguiarte, 2010; Shetty *et al.*, 2012). Cacti are also a good source of useful byproducts and chemicals such as mucilage, fibers, pigments and antioxidants. The chemicals in cacti belong to different groups: 1) complex carbohydrates, 2) carotenoids, 3) betalains, 4) flavonoids and other phenolic compounds, 5) alkaloids, and others (Anderson, 2001; Nazareno and Padrón-Pereira, 2011). Many of these compounds have pharmacological properties, including diuretic, laxative, cardiogenic, analgesic, astringent, and antiparasitic effects (Santos-Díaz *et al.*, 2010). However, although cacti can be a source of metabolites, their commercial exploitation is hindered by factors such as limited capacity for demographic recovery, vulnerability to overexploitation, the destruction of their natural habitats, and their high demand by collectors. Therefore, they are classified as one of the most endangered groups in the plant kingdom (Hernández and Godínez, 1994). Cacti species are subject to “special protection” under Mexican law according to NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010); furthermore, many of them are listed in the appendices to the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), (CITES, 2015) and in the International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN) Red List of Threatened Species (IUCN, 2014).

Plant biotechnology offers a sustainable way to produce secondary metabolites without affecting natural populations (Guillon *et al.*, 2006). In particular, hairy root (HR) culture is an efficient method to obtain active bio-compounds. Hairy root cultures are characterized by plagiotropic growth, abundant lateral branching and enhanced growth rates, similar to callus tissue but with functional and highly differentiated organs (Veena and Taylor, 2007). Hairy roots have the ability to grow in the absence of exogenous plant growth regulators; exhibit

## INTRODUCCIÓN

Cactaceae incluye 124 géneros y 1427 especies halladas principalmente en zonas áridas y semiáridas de América; en México se encuentran 586 especies, más de 70% de las cuales son endémicas al país (Ortega-Baes *et al.*, 2010). Las cactáceas se han usado desde tiempos prehispanicos en rituales, para la medicina tradicional y como alimento y forraje, entre muchos otros usos (Jiménez-Sierra and Eguiarte, 2010; Shetty *et al.*, 2012). También son una buena fuente de subproductos y químicos de utilidad, como mucílago, fibras, pigmentos y antioxidantes. Los químicos de las cactáceas pertenecen a diferentes grupos: 1) hidratos de carbono complejos, 2) carotenoides, 3) betalainas, 4) flavonoides y otros compuestos fenólicos, 5) alcaloides, y otros (Anderson, 2001; Nazareno y Padrón-Pereira, 2011). Muchos de estos compuestos tienen propiedades farmacológicas, que incluyen efectos diuréticos, laxantes, cardiogénicos, analgésicos, astringentes y antiparasíticos (Santos-Díaz *et al.*, 2010). Sin embargo, aunque las cactáceas pueden ser una fuente de metabolitos, factores tales como una capacidad limitada de recuperación demográfica, vulnerabilidad a la sobreexplotación, la destrucción de sus hábitats naturales, y su alta demanda por parte de recolectores obstaculizan su explotación comercial. Por lo tanto, se clasifican como uno de los grupos en mayor peligro de extinción del reino vegetal (Hernández y Godínez, 1994). Las especies de cactáceas están sujetas a una “protección especial” bajo la ley mexicana, según NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010); además, muchas de ellas figuran en el apéndice de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), (CITES, 2015) y en la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN, 2014) de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN).

La biotecnología vegetal ofrece una forma sustentable para producir metabolitos secundarios sin afectar a las poblaciones naturales (Guillon *et al.*, 2006). En particular, el cultivo de raíces pilosas (RP) es un método efectivo para obtener biocompuestos activos. Los cultivos de raíces pilosas se caracterizan por el crecimiento plagiotrópico, ramificaciones laterales abundantes y tasas de crecimiento más eficientes, similares al tejido caloso, aunque con órganos funcionales

the same or greater biosynthetic capacity of normal roots and, moreover, they maintain genetic stability and can produce metabolites that are found only in aerial parts (Sharma *et al.*, 2013).

Betalain pigments have attracted attention in the last few years because of their antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory properties; furthermore, they are more chemically stable than anthocyanins for a wide range of pH values (Pavokovi and Krsnik-Rasol, 2011; Zamudio-Flores *et al.*, 2015). Betalains are water-soluble nitrogenous pigments which are found only in members of the order Caryophyllales and in some genera of Basidiomycetes fungi (Herbach *et al.*, 2006). The basic structure of betalains, which are divided into betacyanins (red-violet) and betaxanthins (yellow) (Strack *et al.*, 2003), consists of a substituted dihydropyridine (main chromophore) with a system of conjugated double bonds (Pavokovi and Krsnik-Rasol, 2011). Betacyanins are condensation products of betalamic acid with cyclo-DOPA [cyclo-3-(3, 4-dihydroxyphenylalanine)], while betaxanthins are condensation products of betalamic acid with amino acids or amines (Herbach *et al.*, 2006; Pavokovi and Krsnik-Rasol, 2011). Because of their properties, the interest in betalains as food colorants, drugs and cosmetics increased. Crop plants as red beet, are a main source of betalains, and Georgiev *et al.* (2008) studied how to use biotechnology to obtain these pigments from alternative sources and *in vitro* systems. Pavokovi and Krsnik-Rasol (2011) proposed the use of cell suspensions, callus and HR cultures of plants of the families Amaranthaceae and Cactaceae grown in bioreactors. Although there is great interest in exploiting them, information is scarce about the metabolites found in organs, tissues or cell cultures of cacti species.

The knowledge that many species of cacti have the potential to produce important metabolites such as alkaloids, betalains and others (Santos-Díaz *et al.*, 2010; Palomeque-Carlín *et al.*, 2015), and that many of them are threatened species, has given rise to efforts to preserve them (Santos-Díaz *et al.*, 2010; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015). Thus, Palomeque-Carlín *et al.* (2015) obtained HR cultures of species of *Mammillaria*, *Turbincarpus* and many other genera to study their potential to produce metabolites in a sustainable way. Therefore, the aim of this study was to assess the effect of culture media on the production of betalain pigments in HR cultures of *Escobaria*

y altamente diferenciados (Veena y Taylor, 2007). Las raíces pilosas tienen la habilidad de crecer en ausencia de reguladores de crecimiento vegetal exógenos; presentan igual o mayor capacidad biosintética que las raíces normales y, además, mantienen la estabilidad genética y pueden producir metabolitos que se encuentran únicamente en las partes aéreas (Sharma *et al.*, 2013).

Los pigmentos de betalaína han captado la atención en los últimos años debido a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias; además, son más estables químicamente que las antocianinas a lo largo de una amplia variedad de valores de pH (Pavokovi y Krsnik-Rasol, 2011; Zamudio-Flores *et al.*, 2015). Las betalaínas son pigmentos nitrogenados solubles en agua que solo se encuentran en miembros del orden Caryophyllales y en algunos géneros de hongos Basidiomycetes (Herbach *et al.*, 2006). La estructura básica de las betalaínas, que se dividen en betacianinas (violeta rojizo) y betaxantinas (amarillo) (Strack *et al.*, 2003), consiste en una dihidropiridina sustituida (cromóforo principal) con un sistema de enlaces dobles conjugados (Pavokovi y Krsnik-Rasol, 2011). Las betacianinas son productos de la condensación del ácido betalámico con ciclo-DOPA [ciclo-3-(3, 4-dihidroxyfenilalanina)], mientras que las betaxantinas son productos de la condensación de productos de ácido betalámico con aminoácidos o aminas (Herbach *et al.*, 2006; Pavokovi y Krsnik-Rasol, 2011). Debido a sus propiedades es que ha aumentado el interés en las betalaínas como colorantes para alimentos, fármacos y cosméticos. Algunos cultivos como el betabel son la fuente principal de betalaínas, y Georgiev *et al.* (2008) estudiaron cómo usar la biotecnología para obtener estos pigmentos de fuentes alternativas o sistemas *in vitro*. Pavokovi y Krsnik-Rasol (2011) propusieron el uso de suspensiones celulares, y cultivos de tejidos en biorreactores de callos y RP de plantas de las familias Amaranthaceae y Cactaceae. Aunque hay gran interés en explotarlos, hay información escasa acerca de los metabolitos hallados en órganos, tejidos o cultivos celulares de especies de cactáceas.

El conocimiento de que muchas especies de cactáceas tienen el potencial para producir metabolitos importantes como alcaloides, betalaínas y otros (Santos-Díaz *et al.*, 2010; Palomeque-Carlín *et al.*, 2015), y el hecho de que muchas son especies amenazadas, ha incrementado los esfuerzos para conservarlas

*chaffeyi* Britton & Rose, *Turbincarpus laui* Glass & R. Foster, *T. lophophoroides* (Werdermann) Buxbaum & Backeberg, and *T. pseudopectinatus* (Backeberg) Glass & R. Foster, by measuring biomass accumulation and betalain content. These are endangered and small species, which would make it impossible to use wild plants for commercial production of metabolites.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Hairy root (HR) cultures of *E. chaffeyi*, *T. laui*, *T. lophophoroides* and *T. pseudopectinatus* were used. These roots were obtained in a previous work using the A4 strain of *Agrobacterium rhizogenes*, which contains the agropine-type plasmid pRiA4 and the binary vector pESC4 (Palomeque-Carlín *et al.*, 2015). They were cultured in Murashige and Skoog (MS) basal medium (Murashige and Skoog, 1962) with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 8 g L<sup>-1</sup> agar (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee, KS, USA) as a gelling agent. The cultures were incubated at 25 °C with a photoperiod of 16 h of light (daylight fluorescent lamps, 54 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and 8 h of darkness and subcultured every 60 d.

### Growth and betalains production in hairy roots of cacti in different culture media

Seven basal culture media were used to cultivate cacti HR: 1) DKW (Driver and Kuniyuki, 1984); 2) Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968); 3) Heller (Heller, 1953); 4) MS (Murashige and Skoog, 1962); 5) N6 (Chu *et al.*, 1975); 6) Westvaco WV3 (Coke, 1996); and 7) White medium (White, 1963). All culture media were supplemented with 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 8 g L<sup>-1</sup> agar as gelling agent and the vitamins solution from the MS medium; afterwards, the pH was adjusted to 5.7 before autoclaving. Petri dishes containing 25 mL of medium were inoculated with 1.5 g of HR and incubated at 25 °C, with a photoperiod of 16 h of light (daylight fluorescent lamps, 54 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) and 8 h of darkness. Hairy root growth and betalain content were determined at 45 d in cacti species (Table 1). Hairy root growth (g) was expressed as Fresh Weight Gain (FWG = final fresh weight – inoculum fresh weight); in all cases, the fresh weight (FW) was determined after blotting the HR on gauze to remove excess moisture. To obtain the dry weight (DW), roots were placed in an incubator at 60 °C for 48 h.

A completely randomized experimental design was used and each petri dish was an experimental unit. Three petri dishes of each culture medium were used for each species. The entire experiment was carried out twice. The data were analyzed

(Santos-Díaz *et al.*, 2010; Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 2015). Por ello, Palomeque-Carlín *et al.* (2015) obtuvieron cultivos de RP de especies de *Mammillaria*, *Turbincarpus* y muchos otros géneros para estudiar su potencial para producir metabolitos de forma sostenible. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue medir el efecto de los medios de cultivo sobre la producción de pigmentos (contenido de betalainas) y la acumulación de biomasa en cultivos de RP de *Escobaria chaffeyi* Britton & Rose, *Turbincarpus laui* Glass & R. Foster, *T. lophophoroides* (Werdermann) Buxbaum & Backeberg, and *T. pseudopectinatus* (Backeberg) Glass & R. Foster. Todas ellas son especies pequeñas y en peligro de extinción, lo cual hace imposible el uso de plantas silvestres para la producción comercial de metabolitos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para la investigación se usaron cultivos de raíz pilosa (RP) de *E. chaffeyi*, *T. laui*, *T. lophophoroides* y *T. pseudopectinatus*. Estas raíces se obtuvieron en un trabajo previo con el uso de la cepa A4 de *Agrobacterium rhizogenes*, la cual alojó el plásmido tipo agropina pRiA4 y el vector binario pESC4 (Palomeque-Carlín *et al.*, 2015). Las raíces se cultivaron en un medio base Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) con 30 g L<sup>-1</sup> de sucrosa y 8 g L<sup>-1</sup> agar (PhytoTechnology Laboratories, Shawnee, KS, USA) como agente gelificante. Los cultivos se incubaron a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz (lámparas fluorescentes de luz de día, 54 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 h de oscuridad y recultivo cada 60 d.

### Crecimiento y producción de betalainas en raíces pilosa de cactáceas en diferentes medios de cultivo

Siete medios de cultivos basales se usaron para cultivar RP de cactáceas: 1) DKW (Driver y Kuniyuki, 1984); 2) Gamborg B5 (Gamborg *et al.*, 1968); 3) Heller (Heller, 1953); 4) MS (Murashige y Skoog, 1962); 5) N6 (Chu *et al.*, 1975); 6) Westvaco WV3 (Coke, 1996); and 7) el medio de White (White, 1963). Todos los medios de cultivo se complementaron con 30 g L<sup>-1</sup> sucrosa, 8 g L<sup>-1</sup> agar como agente gelificante y la solución de vitaminas de medio MS; luego se ajustó el pH a 5.7 antes de esterilizar en autoclave. Cajas Petri con 25 mL de medio se inocularon con 1.5g de RP y se incubaron a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz (lámparas fluorescentes de luz de día, 54 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y 8 h de oscuridad. El crecimiento de la raíz pilosa y el contenido

**Table 1.** Growth variables and betalain production for hairy roots cultures of cacti species.**Cuadro 1.** Variables de crecimiento y producción de betalaína para cultivos de raíces pilosas de especies de cactáceas.

Species	FW <sub>max</sub> <sup>†</sup> (g)	DW <sub>max</sub> <sup>†</sup> (g)	FW <sub>max</sub> /IFW	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	Td (d)	BC <sub>max</sub> <sup>‡</sup> (mgBE)/(100 g fw)	BX <sub>max</sub> <sup>‡</sup> (mgIE)/(100 g fw)
<i>E. chaffeyi</i>	10.12	0.60	5.2	0.047	14.6	0.60	1.17
<i>T. laui</i>	8.14	0.53	4.0	0.045	15.5	1.03	2.17
<i>T. lophophoroides</i>	5.48	0.54	2.7	0.030	22.7	0.38	1.00
<i>T. pseudopectinatus</i>	5.09	0.24	2.5	0.053	13.0	0.73	1.13

<sup>†</sup>Determined at the time of maximum growth (20-45 d, depending on the species) ♦ Determinado al momento del crecimiento máximo (20 – 45 d, según la especie).

<sup>‡</sup>Determined at the time of maximum production (35-50 d) ♦ Determinado al momento de la producción máxima (35-50 d).

FW: Fresh weight. DW: Dry weight. IFW: Inoculated fresh weight.  $\mu$ : Specific growth rate =  $(\ln P_2 - \ln P_1)/(t_2 - t_1)$ , as in Hoffman and Poorter (2002). Td: Doubling time =  $\ln 2/\mu$ , as in Jeong *et al.*, (2009). BC: betacyanins. BX: Betaxanthins. BE: Betanin equivalents. IE: Indicaxanthin equivalents ♦ FW: Peso fresco. DW: Peso seco. IFW: Peso fresco inoculado.  $\mu$ : Tasa de peso específico =  $(\ln P_2 - \ln P_1)/(t_2 - t_1)$ , al igual que en Hoffman y Poorter (2002). Td: Tiempo duplicado =  $\ln 2/\mu$ , al igual que en Jeong *et al.*, (2009). BC: betacianinas. BX: Betaxantinas. BE: Equivalentes de Betanina. IE: Equivalentes de Indicaxantín.

by ANOVA and the means were compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

### Extraction of betalains

The method proposed by García-Cruz *et al.* (2013) was used, with slight modifications, to cacti HR; red cactus pear fruits (*Opuntia ficus-indica* var. Roja Pelona) and beetroot (*Beta vulgaris*) obtained from a local market were used as reference. One point five grams of fresh material were mixed with an 80% (v:v) aqueous methanol solution, mixture was sonicated in an ultrasonic water bath (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) for 10 min, and shaken for 20 min in a Vortex-Genie 2 mixer (Daigger & Company, Inc., Vernon Hills, IL, USA). The mixture was centrifuged 10 min at 2200 x g (Velab Microscopes Inc., Glen Ellyn, IL, USA), and decanted. The first supernatant was collected, and another 10 mL of an 80% (v/v) aqueous methanol solution were added to the residue; the extraction steps were repeated once again to obtain a second supernatant. The supernatants were pooled and filtered with Ahlstrom paper no. 631 and this mix contained the betalain fraction. This procedure was performed in triplicate. The extraction steps were carried out at room temperature and dark conditions to avoid damaging the betalain pigments. The methanolic extracts obtained were stored at -20 °C in dark conditions until use.

### Content of betalains

Methanolic extracts were used to determine the concentration of betacyanins and betaxanthins according to the method of

de betalaína en las especies de cactáceas se determinaron a los 45 d (Cuadro 1). El crecimiento de la raíz pilosa (g) se expresó como Incremento de Peso Fresco (IPF = peso fresco final – peso fresco del inóculo); en todos los casos se determinó el peso fresco (FW) después de remover el exceso de humedad de las RP con una gasa seca. Para obtener el peso seco (DW), las raíces se colocaron en una incubadora a 60 °C durante 48 h.

El diseño experimental fue completamente al azar y cada caja Petri representó una unidad experimental. Tres cajas Petri de cada medio de cultivo se usaron para cada especie. Todo el experimento se realizó dos veces. Los datos se analizaron con ANDEVA y los promedios se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

### Extracción de betalaínas

El método utilizado fue el propuesto por García-Cruz *et al.* (2013), con ligeras modificaciones, para las RP de las cactáceas; como referencia, se usaron tunas rojas (*Opuntia ficus-indica* var. Roja Pelona) y betabel (*Beta vulgaris*) adquiridos en un mercado local. Del material fresco se mezclaron 1.5 g con una solución de metanol acuoso al 80% (v:v); la mezcla se sometió a un baño de agua ultrasónico (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA) por 10 min, y se agitó por 20 min en una mezcladora Vortex-Genie 2 (Daigger & Company, Inc., Vernon Hills, IL, USA). La mezcla se centrifugó por 10 min a 2200 x g (Velab Microscopes Inc., Glen Ellyn, IL, USA) y se decantó. El primer sobrenadante se extrajo y se agregaron otros 10 mL de solución de metanol acuoso al 80% (v/v) al residuo; los pasos para la extracción se repitieron hasta obtener un segundo sobrenadante. Los sobrenadantes se acumularon y filtraron con papel Ahlstrom

Castellanos-Santiago and Yahia (2008) with slight modifications, using a Jenway Genova spectrophotometer (Bibby Scientific Ltd., Stone, Staffs, UK). The betalain concentration was calculated using the formula:  $B = (A \times DF \times MW \times V \times 100) / (\epsilon \times W \times L)$ , where  $B$  is the content of betacyanins or betaxanthins in fresh weight (mg per 100 g FW),  $A$  is absorbance (538 nm for betacyanins and 483 for betaxanthins),  $DF$  is the dilution factor,  $MW$  is molecular weight (550 g per mol for betanin and 308 g per mol for indicaxanthin),  $V$  is solution volume (mL),  $\epsilon$  is the molar extinction coefficient (60 000 L per mol-cm for betanin and 48 000 L per mol-cm for indicaxanthin),  $W$  is fresh material weight (g), and  $L$  is the length of the cell (1 cm).

#### Qualitative analysis of betalains by Thin Layer Chromatography (TLC)

Silica gel-coated TLC plates (250  $\mu$ m thick) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used. Methanolic extract of betalains was spotted on a silica gel-coated plate and developed (8 cm) at room temperature and dark conditions using a solvent mixture containing isopropanol, ethanol, water and acetic acid (24.75:35:40:0.25) as the mobile phase. The plate was dried, and the bands obtained were observed under visible and ultraviolet light (UV light) to confirm the presence of different betalain pigments. Cactus pear and beetroot extracts were spotted under the same conditions for comparison.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Growth and betalains production in hairy roots of cacti in different culture media

Cacti HR from four species showed active growth and a characteristic branching pattern in all the culture media (Figures 1 and 2). The maximum fresh weight gain (FWG) for *E. chaffeyi* HR (Figure 1A) was obtained on N6 and MS media, an approximately 7-fold increase compared to the inoculated weight; the lowest FWG was obtained in White medium (3.344 g). In the case of HR of *T. laui* (Figure 1B), the best FWG was obtained on DKW medium (3.940 g), a near 3-fold increase compared to the inoculated weight; however, results were not statistically different from those obtained on B5 and Heller media. For HR of *T. lophophoroides* (Figure 2A), the maximum FWG was obtained on MS medium (3.324 g), an approximately 2-fold increase compared to the inoculated weight; however, this result was only different from those obtained on Heller and WV3 media.

no. 631 y esta mezcla contenía la fracción de betalaína. Este procedimiento se ejecutó por triplicado. Los pasos de extracción se realizaron a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para evitar dañar los pigmentos de betalaína. Los extractos metanólicos obtenidos se almacenaron a -20 °C en condiciones de oscuridad hasta su uso.

#### Contenido de betalaínas

Extractos metanólicos se usaron para determinar la concentración de betacianinas y betaxantinas según el método de Castellanos-Santiago y Yahia (2008), con ligeras modificaciones, con el uso de un espectrofotómetro Jenway Genova (Bibby Scientific Ltd., Stone, Staffs, UK). La concentración de betalaína se calculó con la fórmula  $B = (A \times DF \times MW \times V \times 100) / (\epsilon \times W \times L)$ , donde  $B$  es el contenido de betacianinas o betaxantinas en peso fresco (mg por 100 g FW),  $A$  es la absorbancia (538 nm para betacianinas y 483 para betaxantinas),  $DF$  es el factor de dilución,  $MW$  es el peso molecular (550 g por mol para betanina y 308 g por mol para indicaxantina),  $V$  es el volumen de la solución (mL),  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (60 000 L por mol-cm para betanina y 48 000 L por mol-cm para indicaxantina),  $W$  es el peso fresco del material (g), y  $L$  es la longitud de la celda (1 cm).

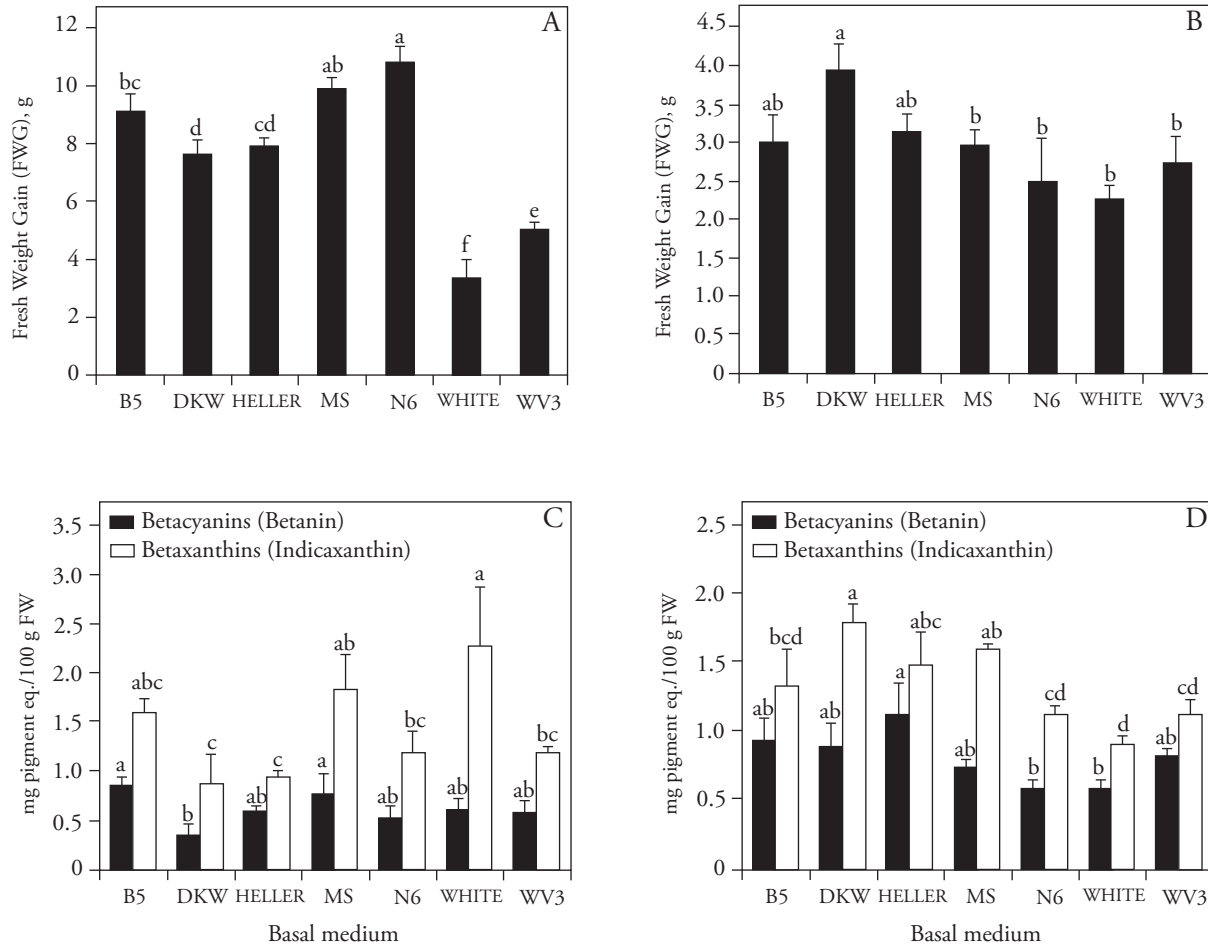
#### Análisis cuantitativo de betalaínas por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Placas de CCF (grosor, 250  $\mu$ m) cubiertas con gel de silicón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) se utilizaron. Extracto metanólico se halló en una placa cubierta de gel de silicón y se dejó extender (8 cm) a temperatura ambiente y condiciones oscuras usando una mezcla de solvente con isopropanol, etanol, agua y ácido acético (24.75:35:40:0.25) como la fase móvil. La placa se secó y las bandas obtenidas se observaron bajo luz visible y luz ultravioleta (UV) para confirmar la presencia de pigmentos de betalaína diferentes. Extractos de tuna y betabel se procesaron bajo las mismas condiciones con fines de comparación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento y producción de betalaínas en raíces pilosas de cactáceas en diferentes medios de cultivo

Las RP de cactáceas de cuatro especies presentaron un crecimiento activo y un patrón característico de ramificación en todos los medios de cultivo (Figuras 1 y 2). El incremento de peso (IPF) máximo en las RP de *E. chaffeyi* (Figura 1A) se obtuvo en los medios N6 y MS, un incremento siete veces mayor

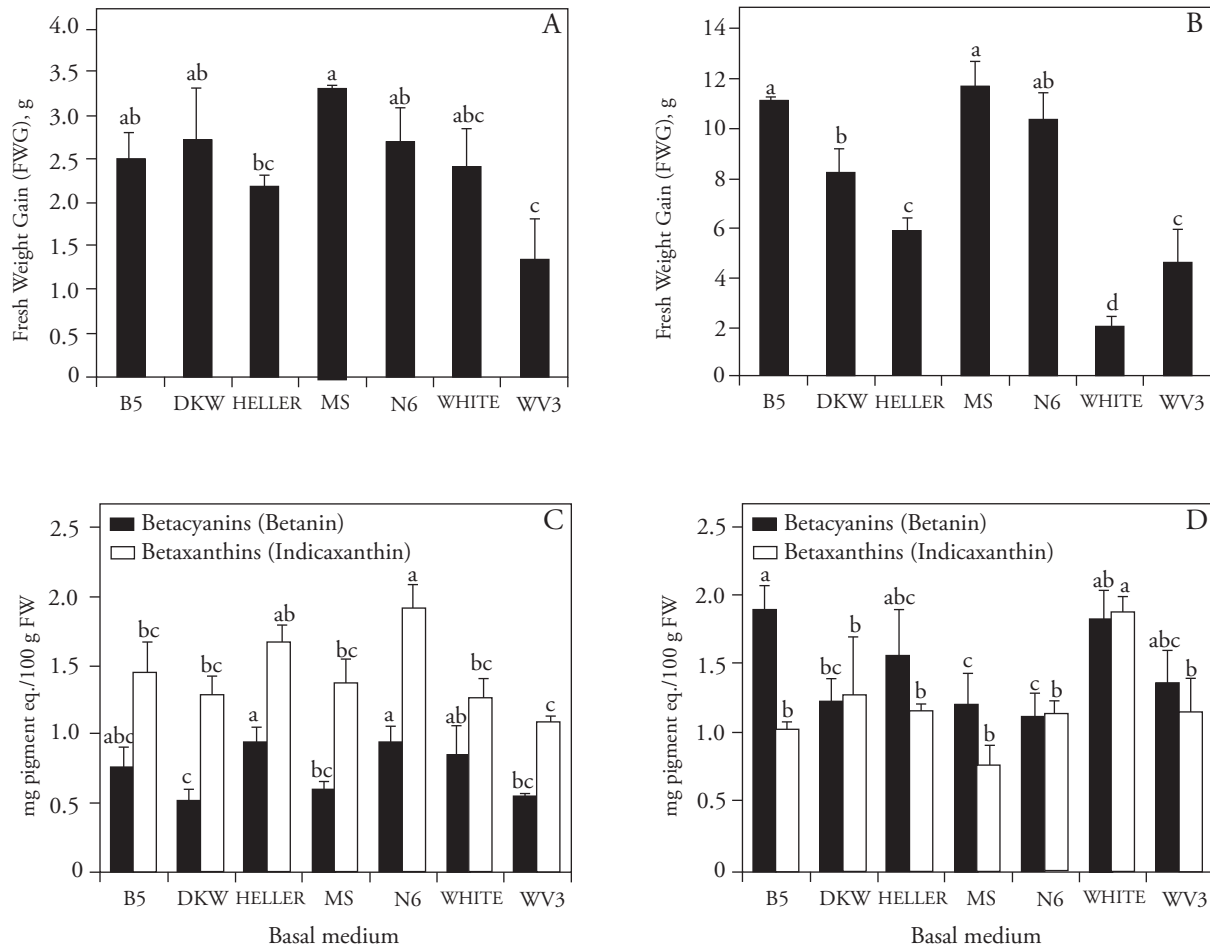


**Figure 1.** Fresh weight gain (FWG) and betalains content (BT) for cacti hairy roots on different basal culture media. A) and C): FWG and BT for *Escobaria chaffeyi*; B) and D): FWG and BT for *Turbinicarpus laui*; FW: fresh weight; pigment: Betanin (betacyanins) or Indicaxanthin (betaxanthins). Bars are the means of three replicates  $\pm$  standard deviation. Similar bars with different letters, differ significantly (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 1.** Incremento de peso fresco (IPF) y contenido de betalaínas (BT) para raíces pilosas de cactáceas en diferentes medios de cultivo basales. A) y C): IPF y BT para *Escobaria chaffeyi*; B) y D): IPF y BT para *Turbinicarpus laui*; FW: peso fresco; pigmento: Betanina (betacianinas) o Indicaxantina (betaxantinas). Las barras son promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Barras similares con letras diferentes presentan diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

The HR of *T. pseudopectinatus* (Figure 2B) showed highest FWG in MS and B5 media, near 8-fold increase compared to the inoculated weight, while the lowest FWG was obtained on White medium. These results were partially different to those obtained by Palomeque-Carlín et al. (2015). They found that DKW was the best culture medium for *E. chaffeyi* HR with a 3-fold increase compared to the starting weight; in contrast, in this work the DKW medium yielded a 5-fold increase. For *T. pseudopectinatus*, they found a 2-fold increase in FWG with B5 medium, and a 1-fold increase with

en comparación con el peso inoculado; el IPF menor se obtuvo en el medio White (3.344 g). En el caso de las RP de *T. laui* (Figura 1B), el mejor IPF se obtuvo en el medio DKW (3.940 g), casi tres veces mayor en comparación con el peso inoculado; sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos en los medios B5 y Heller. En las RP de *T. lophophoroides* (Figura 2A), el IPF máximo se obtuvo en el medio MS (3.324 g), aproximadamente 2 veces mayor en comparación con el peso inoculado; sin embargo, este resultado solo fue diferente de los obtenidos en los medios Heller y WV3.



**Figure 2.** Fresh weight gain (FWG) and betalains content (BT) for cacti hairy roots on different basal culture media. A) and C): FWG and BT for *T. lophophoroides*; B) and D): FWG and BT for *T. pseudopectinatus*; FW: fresh weight; pigment: Betanin (betacyanins) or Indicaxanthin (betaxanthins). Bars are the means of three replicates  $\pm$  standard deviation. Similar bars with different letters, differ significantly (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

**Figura 2.** Incremento de peso fresco (IPF) y contenido de betalainas (BT) para raíces pilosas de cactáceas en diferentes medios de cultivo basales. A) y C): IPF y BT para *T. lophophoroides*; B) y D): IPF y BT para *T. pseudopectinatus*; FW: peso fresco; pigmento: Betanina (betacianinas) o Indicaxantina (betaxantinas). Las barras son promedios de tres repeticiones  $\pm$  desviación estándar. Barras similares con letras diferentes presentan diferencias significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ).

MS medium; in this study the FWG increased 8-fold on both MS and B5 media. Otherwise, their results of FWG for *T. lophophoroides* were similar to those obtained in this study. It is important to note that they used a harvest time of 30 d and 0.5 g of inoculum, which explains some of the differences between both studies, considering that the HR of this species had not reached the maximum growth at the harvest time used in our study and that the MS medium has more total nitrogen (Total N) than other media. According to Jacob and Malpathak (2005), there are two important factors in the culture

Las RP de *T. pseudopectinatus* (Figura 2B) presentaron el mayor IPF en los medios MS y B5, un incremento cerca de ocho veces mayor en comparación con el peso inoculado, mientras que el IPF más bajo se obtuvo con el medio White. Estos resultados fueron parcialmente diferentes a los obtenidos por Palomeque-Carlín *et al.* (2015), quienes encontraron que DKW era el mejor medio de cultivo para las RP de *E. chaffeyi* con un incremento de 3 veces en comparación con el peso inicial; en contraste, en el presente trabajo, el medio DKW produjo un incremento de 5 veces. Para *T. pseudopectinatus*, encontraron un

medium that greatly influence the growth and morphogenesis of HR: Total N and the ammonium/nitrate ratio ( $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  ratio). Most plants grow better in media containing both  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ , and that root growth was often inhibited by  $\text{NH}_4^+$  and promoted by  $\text{NO}_3^-$  ions (Table 2).

High levels of Total N and adequate  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  ratios promote the production of biomass, but this varies among species. The growth of *E. chaffeyi* was in accordance with this observation, as the higher growth was obtained in N6 and MS media with the highest levels of Total N, while B5, DKW, Heller and MS preserved the HR morphological characteristics without callus production (Figure 3A). For *T. laui*, DKW, Heller and B5 media were the best for growth, but the morphology was preserved with B5, DKW and MS (Figure 3B). The growth results for *T. lophophoroides* contradicted Jacob and Malpathak (2005), because even though MS, N6, DKW and B5 were some the best media, there was higher biomass accumulation in White medium, whereas the characteristic morphology was preserved in B5 and DKW media (Figure 3C). For *T. pseudopectinatus*, the MS, B5 and N6 media yielded the best results in terms of biomass accumulation, but morphology was preserved in Heller, MS and N6 media (Figure 3D).

The highest content of betacyanins in HR of *E. chaffeyi* (Figure 1C) was obtained on White, B5 and MS media. For HR of *T. laui* (Figure 1D),

incremento de 2 veces en IPF con el medio B5, y de una vez con el medio MS; en el presente estudio, el IPF aumentó ocho veces con los medios MS y B5. Por lo demás, sus resultados de IPF para *T. lophophoroides* fueron similares a los obtenidos en el presente estudio. Es importante señalar que usaron un tiempo de cosecha de 30 d y 0.5 g de inóculo, lo cual explica algunas de las diferencias entre ambos estudios, si consideramos que las RP de esta especie no había alcanzado el crecimiento máximo al tiempo de cosecha usado en el presente estudio, y que el medio MS tiene más nitrógeno total (N Total) que otros medios. Según Jacob y Malpathak (2005), existen dos factores importantes en el medio de cultivo que ejercen una gran influencia sobre el crecimiento y la morfogénesis de las RP: El N Total y la proporción de amonio/nitrato (proporción  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ ). La mayoría de las plantas crecen mejor en medios que contienen  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  juntos, y ese crecimiento de la raíz se inhibía con frecuencia por iones de  $\text{NH}_4^+$  o se promovía por iones de  $\text{NO}_3^-$  (Cuadro 2).

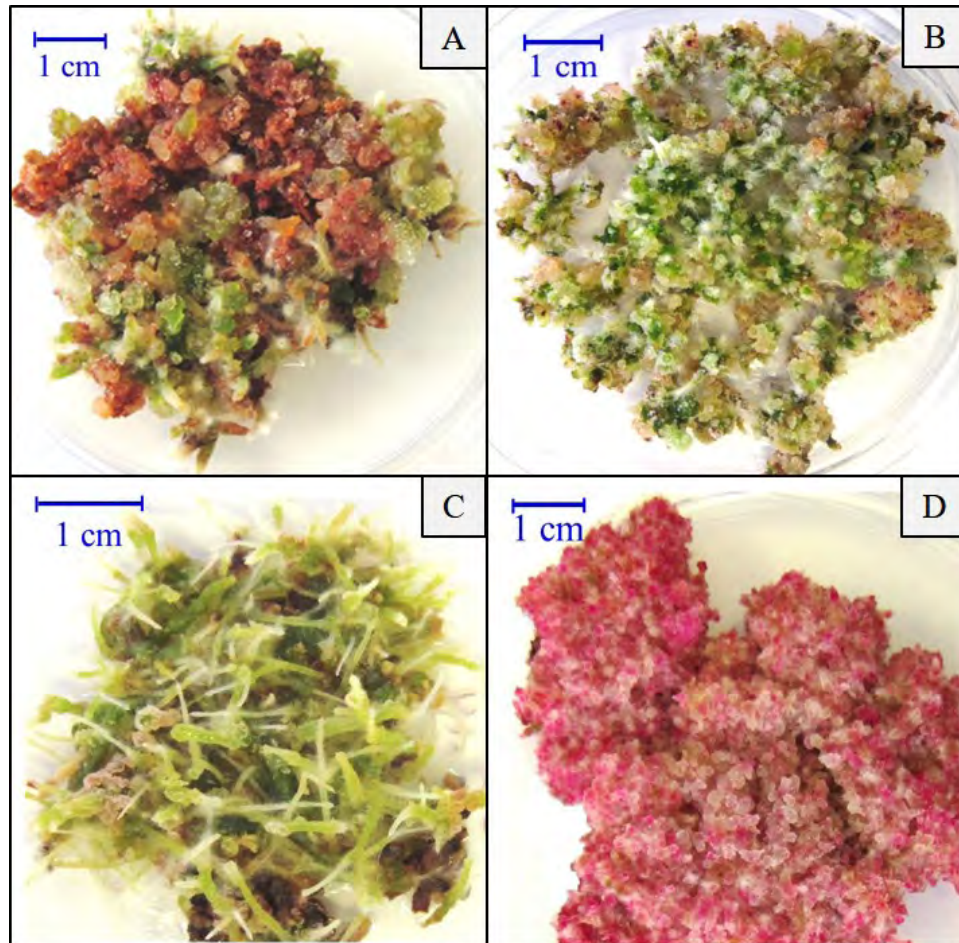
Los niveles altos de N Total y proporciones adecuadas de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  promueven la producción de biomasa, pero esto varía según la especie. El crecimiento de *E. chaffeyi* estuvo acorde con esta observación, ya que el crecimiento mayor se obtuvo en los medios N6 y MS con los niveles mayores de N Total, mientras que B5, DKW, Heller y MS conservaron las características morfológicas de las RP sin producir callos

**Table 2.** Inorganic nitrogen content (Total,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) and  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  ratios for different basal media.

**Cuadro 2.** Contenido de nitrógeno inorgánico (Total,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) y proporciones  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  para diferentes medios basales.

Basal medium	Total nitrogen (mM)	$\text{NO}_3^-$ (mM)	$\text{NH}_4^+$ (mM)	Ratio $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$
B5 <sup>†</sup>	27.0	25.0	2.0	12.5
DKW <sup>‡</sup>	47.1	29.4	17.7	1.6
Heller <sup>§</sup>	7.1	7.05	-	-
MS <sup>¶</sup>	60.0	39.4	20.6	1.9
N6 <sup>°</sup>	35.0	28.0	7.0	4.0
White <sup>††</sup>	3.3	3.3	-	-
WV3 <sup>**</sup>	9.0	9.0	-	-

Adapted from Palomeque-Carlín *et al.* (2015). <sup>†</sup>Gamborg *et al.* (1968), <sup>‡</sup>Driver and Kuniyuki (1984), <sup>§</sup>Heller (1953), <sup>¶</sup>Murashige and Skoog (1968), <sup>°</sup>Chu *et al.* (1975), <sup>††</sup>White (1963), <sup>\*\*</sup>Coke (1996) ♦ Adaptado de Palomeque-Carlín *et al.* (2015). <sup>†</sup> Gamborg *et al.* (1968), <sup>‡</sup>Driver y Kuniyuki (1984), <sup>§</sup>Heller (1953), <sup>¶</sup>Murashige y Skoog (1968), <sup>°</sup>Chu *et al.* (1975), <sup>††</sup> White (1963), <sup>\*\*</sup> Coke (1996).



**Figure 3.** Morphology of cacti hairy roots in selected basal culture media. A) *Escobaria chaffeyi* on MS; B) *Turbinicarpus laui* on B5; C) *T. lophophoroides* in B5; D) *T. pseudopectinatus* on MS.

**Figura 3.** Morfología de raíces pilosas de cactáceas en medios de cultivo basales elegidos. A) *Escobaria chaffeyi* en MS; B) *Turbinicarpus laui* en B5; C) *T. lophophoroides* en B5; D) *T. pseudopectinatus* en MS.

the maximum content of betacyanin pigments was obtained on Heller medium but this result was only statistically different from those obtained with N6 and White media, which yielded the lowest levels. The maximum content of betaxanthins was obtained in DKW medium, but similar results were obtained with Heller or MS; lower levels were obtained with the other media. For HR of *T. lophophoroides* (Figure 2C), the maximum content of betacyanins was obtained in N6 and Heller media, but these values were only different from those obtained with DKW, MS and WV3 media, which produced the lowest levels. The highest content of betaxanthins was obtained with the same media than that of betacyanins: N6 and Heller. For HR of *T. pseudopectinatus* (Figure 2D), the highest content of betacyanins was obtained on

(Figure 3A). Para *T. laui*, los medios DKW, Heller y B5 fueron los mejores para el crecimiento, pero la morfología se conservó con B5, DKW y MS (Figura 3B). Los resultados de crecimiento para *T. lophophoroides* contradijeron a Jacob y Malpathak (2005) porque, aunque MS, N6, DKW y B5 fueron algunos de los mejores medios, hubo una acumulación de biomasa mayor en el medio White, mientras que la morfología característica se conservó en los medios B5 y DKW (Figura 3C). Para *T. pseudopectinatus*, los medios MS, B5 y N6 produjeron los mejores resultados en términos de acumulación de biomasa, pero la morfología se conservó en los medios Heller, MS y N6 (Figura 3D).

El contenido más alto de betacianinas en las RP de *E. chaffeyi* (Figura 1C) se obtuvo con los medios

B5 medium but the same results were obtained on Heller and White media; the other media yielded lower levels of these pigments. The maximum content of betaxanthins was obtained in White medium; the other media yielded lower levels. In general, in all cultures analyzed betaxanthins production was between 2 and 2.5 times higher than that of betacyanins.

Jacob and Malpathak (2005) mentioned that low levels of nitrogen stimulate secondary metabolite production and high  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  ratios decrease production of solasodine in HR of *Solanum khasianum*. However, in this study the production of betalains in HR from *E. chaffeyi*, *T. laui*, and *T. lophophoroides*, did not show a clear pattern with these parameters. For *T. pseudopectinatus*, the production of betacyanin pigments was stimulated in media with low nitrate levels or nitrate as the only source of nitrogen; this result is slightly different to that reported by Neelwarne (2012) for beet HR cultures, who found that the concentration of nitrate in the medium did not affect the production of betacyanins, and that the production of betaxanthin pigments was stimulated by low levels of nitrogen (as nitrate). Neelwarne (2012) also reported that when the culture medium is depleted of phosphate ions, the content of betacyanins increases; in our study, the White medium, which had the lowest levels of this chemical species (besides low levels of nitrate, potassium and absence of ammonium ions) yielded some of the best results, not only for betacyanins but also for betaxanthins.

In a previous assay the highest FWG was obtained in *T. pseudopectinatus* and *E. chaffeyi*, and the lowest FWG with *T. laui* and *T. lophophoroides*. The highest levels of betacyaninic pigments were recorded in *T. pseudopectinatus*, followed by *T. laui*, *T. lophophoroides* and *E. chaffeyi*. Regarding betaxanthin pigments, the highest levels were achieved in *E. chaffeyi*, followed by *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus* and *T. laui*. The total betalain content was relatively low compared to that of *B. vulgaris* (50 mg 100 g<sup>-1</sup> fresh beet) (Azeredo, 2009), beet HR cultures (10 – 150 mg per 100 g FW) (Neelwarne, 2012) and red and purple cactus pear fruits (7 – 114 mg 100 g<sup>-1</sup> fresh pulp) (Stintzing *et al.*, 2005), but the betacyanin content of some HR cacti species was similar to that of yellow and orange varieties of *Opuntia* fruits (1.46 and 1.05 BE 100 g<sup>-1</sup> fresh pulp) (Stintzing *et*

White, B5 y MS. Para la RP de *T. laui* (Figura 1D), el contenido máximo de pigmentos de betacianina se logró con el medio Heller, pero este resultado solo fue estadísticamente diferente de lo hallado con los medios N6 y White, que produjeron los niveles más bajos. El contenido máximo de betaxantinas se obtuvo en el medio DKW, pero también Heller o MS causaron resultados similares; con los otros medios se obtuvieron niveles menores. Para las RP de *T. lophophoroides* (Figura 2C), el contenido máximo de betacianinas se obtuvo con los medios N6 y Heller, pero estos valores sólo fueron diferentes a los hallados con los medios DKW, MS y WV3, los cuales produjeron los valores más bajos. El contenido más alto de betaxantinas se obtuvo con los mismos medios que en el caso de las betacyanins: N6 y Heller. Para la RP de *T. pseudopectinatus* (Figura 2D), el contenido más alto de betacianinas se obtuvo con un medio B5, pero los medios Heller y White arrojaron los mismos resultados; los otros medios produjeron niveles menores de estos pigmentos. El contenido máximo de betaxantinas se obtuvo con el medio White; los otros medios produjeron niveles menores. En general, en todos los cultivos analizados, la producción de betaxantinas fue de 2 a 2.5 veces mayor que la de las betacianinas.

Jacob y Malpathak (2005) mencionaron que los niveles bajos de nitrógeno estimulan la producción secundaria de metabolitos y que las proporciones altas de  $\text{NO}_3^-$ :  $\text{NH}_4^+$  reducen la producción de solasodina en las RP de *Solanum khasianum*. Sin embargo, en este estudio, la producción de betalainas en las RP de *E. chaffeyi*, *T. laui* y *T. lophophoroides* no presentaron un patrón claro con estos parámetros. Para *T. pseudopectinatus*, medios con bajos niveles de nitrato o de nitrato como fuente única de nitrógeno estimularon la producción de los pigmentos de betacianina; este resultado es ligeramente diferente al documentado por Neelwarne (2012) para cultivos de RP de betabel, quienes encontraron que la concentración de nitrato en el medio no afectó la producción de betacianinas, y que niveles bajos de nitrógeno (como nitrato) estimulaban la producción de pigmentos de betaxantina. Neelwarne (2012) también informó que cuando se reduce la cantidad de iones de fosfato en el medio de cultivo, el contenido de betacianinas se incrementa. En este estudio, el medio White, que presentaba los niveles menores de esta especie de químicos (además de niveles bajos de nitratos, potasio y

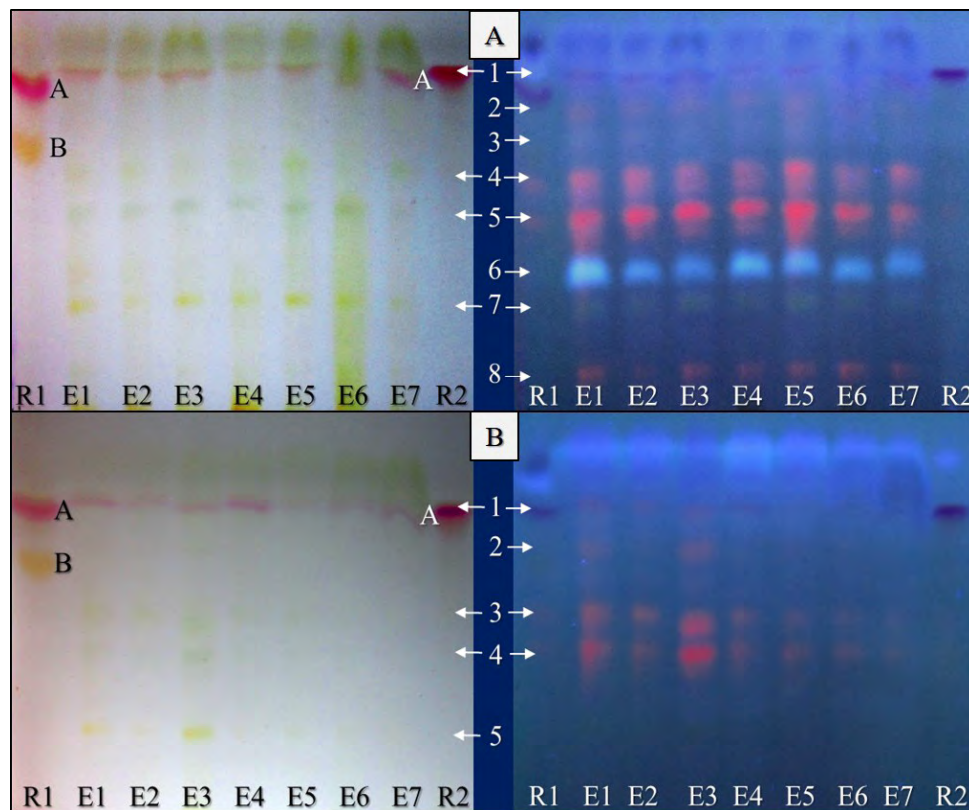
al., 2005). In summary, the production of betalains and the accumulation of biomass in HR of cacti were strongly influenced by the type of culture medium, but each individual species had their own nutritional requirements, and thus it is necessary to look for an optimum culture medium for each case.

#### TLC of cacti hairy roots in different basal media

Betalain pigments and other compounds were detected in HR extracts (Figures 4 and 5). Bands of different compounds were observed under visible (whitish plate) and UV light (bluish plate). *E. chaffeyi* (bands 4 and 5), *T. lophophoroides* (bands 4 and 5) and *T. pseudopectinatus* (bands 2 and 3) showed similar yellow pigments ( $R_f = 0.56$  and  $0.49$  respectively),

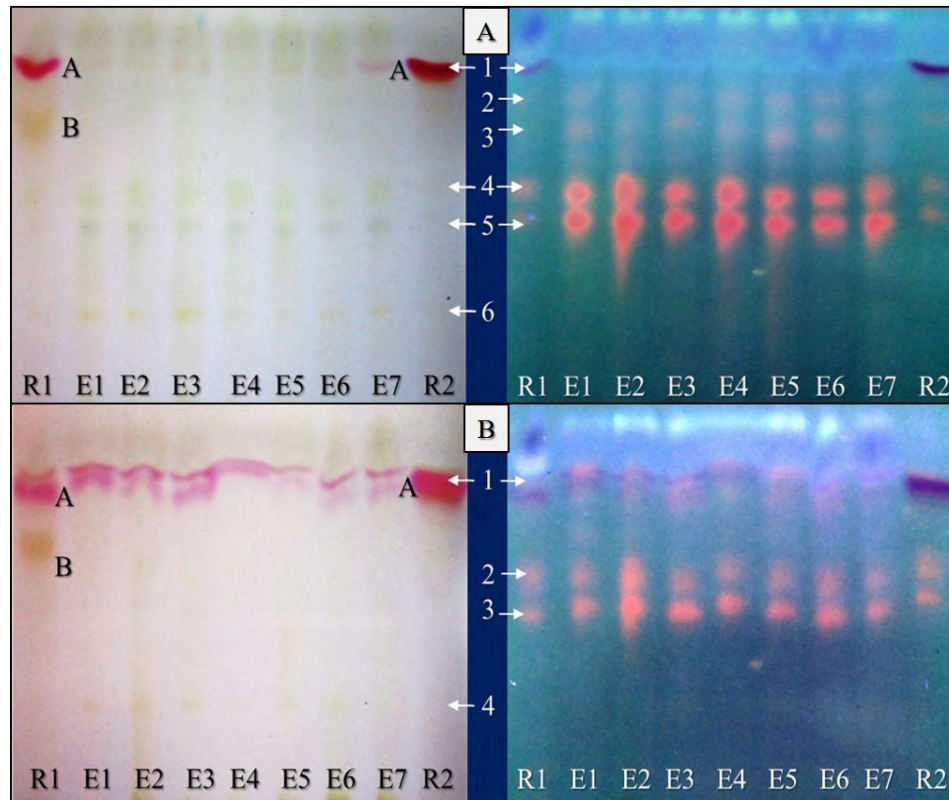
ausencia de iones amonio) dio algunos de los mejores resultados, no solo para betacianinas, sino también para betaxantinas.

En una prueba anterior, el IPF mayor se obtuvo en *T. pseudopectinatus* y *E. chaffeyi*, y el menor, con *T. laui* y *T. lophophoroides*. Los niveles más altos de pigmentos de betacianina se registraron en *T. pseudopectinatus*, seguidos de *T. laui*, *T. lophophoroides* y *E. chaffeyi*. Con respecto a los pigmentos de betaxantina, los niveles más altos se alcanzaron en *E. chaffeyi*, seguidos de *T. lophophoroides*, *T. pseudopectinatus* y *T. laui*. El contenido total de betalaína fue relativamente bajo, en comparación con el de *B. vulgaris* ( $50 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$  betabel) (Azeredo, 2009), cultivos de RP de betabel ( $10 - 150 \text{ mg por } 100 \text{ g FW}$ ) (Neelwarne, 2012) y tunas rojas y moradas ( $7 - 114 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$



**Figure 4.** Thin layer chromatography of cacti hairy roots on different culture media. A) *E. chaffeyi*; B) *T. laui*. Left plate: under visible light; right plate: under UV light. R1: betalain reference extract (cactus pear fruit), R2: betalain reference extract (beetroot). E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3. A and B: identifiers for bands from betalain reference extracts. 1-8 and 1-5: identifiers for bands from hairy root extracts.

**Figura 4.** Cromatografía de capa fina de raíces pilosas de cactáceas en diferentes medios de cultivo A) *E. chaffeyi*; B) *T. laui*. Placa izquierda: bajo luz visible; placa derecha: bajo luz UV. R1: extracto de referencia de betalaína (tuna), R2: extracto de referencia de betalaína (betabel). E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3. A y B: identificadores para bandas de extracto de betalaína de referencia. 1-8 y 1-5: identificadores para bandas de extractos de raíces pilosas.



**Figure 5.** Thin layer chromatography of cacti hairy roots on different culture media. A) *T. lophophoroides*; B) *T. pseudopectinatus*. Left plate: under visible light; right plate: under UV light. R1: betalain reference extract (cactus pear fruit), R2: betalain reference extract (beetroot). E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3. A and B: identifiers for bands from betalain reference extracts. 1-6 and 1-4: identifiers for bands from hairy root extracts.

**Figure 5.** Cromatografía de capa fina de raíces pilosas de cactácea en diferentes medios de cultivo. A) *T. lophophoroides*; B) *T. pseudopectinatus*. Placa izquierda: bajo luz visible; placa derecha: bajo luz UV. R1: extracto de referencia de betalaína (tuna), R2: extracto de referencia de betalaína (betabel). E1: B5, E2: DKW, E3: Heller, E4: MS, E5: N6, E6: White, E7: WV3. A y B: identificadores para bandas de extractos de referencia de betalaína. 1-6 y 1-4: identificadores para bandas de extractos de raíces pilosas.

and the same happened with the compounds from *T. lophophoroides* (band 6) and *T. pseudopectinatus* (band 4,  $R_f = 0.24$ ), as well as with those of *E. chaffeyi* and *T. lophophoroides* (band 2 of both species,  $R_f = 0.72$ ). Although band no. 3 had the same  $R_f$  (0.65) in both *E. chaffeyi* and *T. lophophoroides*, they do not seem to correspond to the same compound because the bands were different in color (whitish and reddish, respectively); this could be due to the presence of compounds with similar physicochemical characteristics and different chemical structure. *E. chaffeyi* had the highest number of bands compared to the other species analyzed, indicating that it had the highest number of compounds. Bands of different color (green and greyish) were present in *E. chaffeyi*, *T. laui* and *T. lophophoroides*, which might indicate the presence of other types of pigments or even

pulpa fresca) (Stintzing *et al.*, 2005), pero el contenido de betacianina de algunas RP de especies de cactáceas fue similar al de las variedades de frutas amarillas y anaranjadas de *Opuntia* (1.46 y 1.05 BE 100 g<sup>-1</sup> pulpa fresca) (Stintzing *et al.*, 2005). En resumen, la producción de betalaínas y la acumulación de biomasa en las RP de las cactáceas tuvo una fuerte influencia del tipo de medio de cultivo, aunque cada especie individual tuvo sus propios requisitos nutricionales, por lo que se hace necesario buscar un medio de cultivo óptimo para cada caso.

#### CCF de raíces pilosas de cactáceas en diferentes medios basales

Pigmentos de betalaína y otros compuestos se detectaron en extractos de RP (Figuras 4 y 5). Las bandas

betalains; further studies will be needed to verify it.

Betacyanins from cacti HR samples were similar to those of beetroot ( $R_f = 0.80$ ) and cactus pear fruit ( $R_f = 0.78$ ). *E. chaffeyi* (bands 4 and 7), *T. laui* (bands 3 and 5), *T. lophophoroides* (bands 4 and 6) and *T. pseudopectinatus* (band 4) showed yellow pigments, possibly of betaxanthin-type, but were different from cactus pear fruits ( $R_f = 0.62$ ). Some bands barely visible under visible light, appeared well defined under UV light. Pigments of cactus pear fruits and beetroot were present in higher concentrations than in HR and were easily separated and detected. Despite the low concentration of pigments in cacti HR, the use of TLC was very useful for fast qualitative identification.

As already discussed, the culture medium strongly affected betalain production. Regarding the type of betalain pigments, TLC did not reveal a significant difference between betalains composition as influenced by the culture media. Red-violet pigments were always well defined in all the media tested, and only some yellow pigments of a few species were barely defined. Finally, it is important to note the wide variety of compounds obtained from cacti HR cultures and their potential use as a source of bioactive compounds for industrial applications; hence the importance of this type of research.

## CONCLUSIONS

The biomass and betalain production of cacti HR is dependent on the culture medium. Culture media with high Total N levels promoted growth and biomass accumulation, while low nutrient culture media (e.g. White medium) inhibited it. However, culture media with low nitrate levels favors the betacyanins production in *T. pseudopectinatus*, while low levels of nitrogen, as nitrate, stimulated the production of betaxanthins in this species.

Low phosphate culture media stimulated the production of betalain pigments (betacyanins and betaxanthins) in the tested cacti HR cultures. The morphology of HR of the cacti species studied was affected by the culture media. DKW and B5 culture media promoted well-differentiated HR and, in some species, DKW yielded the highest values of biomass accumulation and production of betalain pigments.

de los diferentes compuestos se observaron bajo luz (placa blanquecina) y luz UV (placa azulada). *E. chaffeyi* (bandas 4 y 5), *T. lophophoroides* (bandas 4 y 5) y *T. pseudopectinatus* (bandas 2 y 3) presentaron pigmentos amarillos similares ( $R_f = 0.56$  y  $0.49$  respectivamente), y lo mismo ocurrió con los compuestos de *T. lophophoroides* (banda 6) y *T. pseudopectinatus* (banda 4,  $R_f = 0.24$ ), así como con los de *E. chaffeyi* y *T. lophophoroides* (banda 2 de ambas especies,  $R_f = 0.72$ ). Si bien la banda no. 3 tuvo el mismo  $R_f$  ( $0.65$ ), tanto en *E. chaffeyi* como en *T. lophophoroides*, no parecen corresponder al mismo compuesto, ya que las bandas mostraron colores diferentes (blanquecina y rojiza, respectivamente); esto pudo deberse a la presencia de compuestos con características fisicoquímicas semejantes y estructuras químicas diferentes. *E. chaffeyi* produjo el mayor número de bandas en comparación con las otras especies analizadas, indicando que tenía el mayor número de compuestos. La presencia de bandas de diferentes colores (verde y grisáceo) se observó en *E. chaffeyi*, *T. laui* y *T. lophophoroides*, lo cual podría indicar la presencia de otros tipos de pigmentos, o incluso betalainas; estudios futuros se requerirán para verificarlo.

Las betacianinas de las muestras de RP de cactáceas fueron similares a las de betabel ( $R_f = 0.80$ ) y de tuna ( $R_f = 0.78$ ). *E. chaffeyi* (bandas 4 y 7), *T. laui* (bandas 3 y 5), *T. lophophoroides* (bandas 4 y 6) y *T. pseudopectinatus* (banda 4) presentaron pigmentos amarillos, posiblemente del tipo de las betaxantina, pero diferentes a los de las tunas ( $R_f = 0.62$ ). Algunas bandas, apenas visibles bajo la luz visible, aparecieron de manera definida y clara bajo la luz UV. Pigmentos de tunas y betabel estuvieron presentes en concentraciones mayores que en las RP y se detectaron y separaron con facilidad. A pesar de la concentración baja de pigmentos en RP de cactáceas, el uso de TLC fue muy útil para una identificación cualitativa rápida.

Ya se discutió que, el medio de cultivo tuvo gran efecto sobre la producción de betalainas. Con respecto al tipo de pigmentos de betalainas, la CCF no reveló una diferencia significativa entre la composición de las betalainas bajo la influencia de los medios de cultivo. Los pigmentos rojo-violáceos siempre estuvieron bien definidos en todos los medios probados, y solo se definieron en forma escasa algunos pigmentos

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) for providing financial support (CB-2011-01-168997) and for the grant awarded to NICO. We thank also Dr. Roberto Rico Martínez and Dr. Vladimir Barberena Chacón for their helpful advice in preparing this manuscript.

## LITERATURE CITED

- Anderson, E. F. 2001. The Cactus Family. Timber Press. Portland Oregon. 776 p.
- Azeredo, H. M. C. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44: 2365-2376.
- Castellanos-Santiago, E., and E. M. Yahia. 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5758-5764.
- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu, and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18: 659-668.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). 2015. Appendices I, II and III. [www.cites.org/esp/app/appendices.php](http://www.cites.org/esp/app/appendices.php) (Access: February 2015).
- Coke, J.E. 1996. Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of Loblolly pines. *In: United States Patent 5,534,433*. US Patent. [www.freepatentsonline.com/5534434.pdf](http://www.freepatentsonline.com/5534434.pdf) (Access: November 2014).
- Driver, J. A., and A. H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortSci.* 19: 507-509.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158.
- García-Cruz, L., S. Valle-Guadarrama, Y. Salinas-Moreno, and E. Joaquín-Cruz. 2013. Physical, chemical and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68: 403-410.
- Georgiev, V. M. Ilieva, T. Bley, and A. Pavlov. 2008. Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiol. Plant.* 30: 581-893.
- Guillon, S., J. Trémouillaux-Guiller, P. K. Pati, M. Rideau, and P. Gantet. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:341-346.
- Heller, R. 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14:1-223.
- Herbach, K. M., F. C. Stintzing, and R. Carle. 2006. Betalain stability and degradation - structural and chromatic aspects. *J. Food Sci.* 71: R41-R50.
- Hernández, H. M., y A. H., Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Bot. Mex.* 26: 33-52.
- Hoffman, W. A., and H. Poorter. 2002. Avoiding bias in calculations of relative growth rate. *Ann. Bot.* 90: 37-42.
- amarillos de un par de especies. Al final, es importante señalar la variedad amplia de compuestos obtenidos por los cultivos de RP de cactáceas y sus usos potenciales como fuente de compuestos bioactivos con aplicaciones industriales; de ahí la importancia de este tipo de investigación.

## CONCLUSIONES

La producción de biomasa y betalaína de RP de cactáceas depende del medio de cultivo. Los medios de cultivos con niveles altos de N Total promovieron el crecimiento y la acumulación de biomasa, mientras que los medios de cultivos de bajos nutrientes (por ejemplo, el medio de White) los inhibieron. Sin embargo, los medios de cultivo con bajos niveles de nitrato favorecieron la producción de betacianinas en *T. pseudopectinatus*, mientras que los niveles bajos de nitrógeno, como nitrato, estimularon la producción de betaxantinas en esta especie.

Los medios de cultivo bajos en fosfato estimularon la producción de pigmentos de betalaína (betacianinas y betaxantinas) en los cultivos de RP de cactáceas puestos bajo prueba. Los medios de cultivo afectaron la morfología de las RP de las especies de cactáceas estudiadas. Los medios de cultivo DKW y B5 promovieron unas RP bien diferenciadas y, en algunas especies, DKW causó los valores más altos de acumulación de biomasa y de producción de pigmentos de betalaína.

—Fin de la versión en Español—

-----\*-----

- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <http://www.iucnredlist.org/> (Access: February 2015).
- Jacob, A., and N. Malpathak. 2005. Manipulation of MS and B5 components for enhancement of growth and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 247-257.
- Jeong, J. A., C. H. Wu, H. Murthy, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2009. Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnol. Bioproc. E.* 14: 91-98.
- Jiménez-Sierra, C. L., and L. E. Eguiarte. 2010. Candy barrel cactus (*Echinocactus platyacanthus* Link & Otto): A traditional plant resource in Mexico subject to uncontrolled extraction and browsing. *Econ. Bot.* 64: 99-108.

- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nazareno, M. A., y C. A. Padrón-Pereira. 2011. Nuevas tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de las cactáceas en la elaboración de alimentos. Componentes funcionales y propiedades antioxidantes. *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.* 2: 202-238.
- Neelwarne, B. 2012. Red beet hairy root cultures. *In: Neelwarne, B. (ed). Red Beet Biotechnology.* Springer, New York. pp: 199-249.
- Ortega-Baes, P., S. Sührling, J. Sajama, E. Sotola, M. Alonso-Pedano, S. Bravo, and H. Godínez-Álvarez. 2010. Diversity and conservation in the cactus family. *In: Ramawat, K. G. (ed). Desert Plants.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. pp: 157-173.
- Palomeque-Carlín, A., F. Tafoya, A. G. Alpuche-Solís, and E. Pérez-Molphe-Balch. 2015. Effect of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 51: 332-339.
- Pavokovi, D., and M. Krsnik-Rasol. 2011. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. *Food Technol. Biotech.* 49: 145-155.
- Pérez-Molphe-Balch, E., M. S. Santos-Díaz, R. Ramírez-Malagón, and N. Ochoa-Alejo. 2015. Tissue culture of ornamental cacti. *Sci. Agric.* 72: 540-561.
- Santos-Díaz, M. S., E. Pérez-Molphe-Balch, R. Ramírez-Malagón, H. G. Nuñez-Palenius, and N. Ochoa-Alejo. 2010. Mexican threatened cacti: current status and strategies for their conservation. *In: Tepper, G. H. (ed). Species Diversity and Extinction,* Nova Science Publishers Inc., New York, pp: 1-60.
- SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFst/DO2454.pdf>. (Consulta: marzo 2014).
- Sharma, S., A. Shahzad, and A. Sahai. 2013. Hairy root culture: an efficient system for secondary metabolite production. *In: Shahid, M., A. Shahzad, A. Malik, and A. Sahai. (eds). Recent Trends in Biotechnology and therapeutic Applications of Medicinal Plants.* Springer, Netherlands. pp: 51-78.
- Shetty, A. A., M. K. Rana, and S. P. Preetham. 2012. Cactus: a medicinal food. *J. Food. Sci. Technol.* 49: 530-536.
- Strack, A. A., T. Vogt, and W. Schliemann. 2003. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry* 62: 247-269.
- Stintzing, F. C., K. M. Herbach, M. R. Mosshammer, R. Carle, W. Yi, S. Sellappan, C. C. Akoh, R. Bunch, and P. Felker. 2005. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 442-451.
- Veena, V., and C. Taylor. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43: 383-403.
- White, P. R. 1963. *The Cultivation of Animal and Plant Cells.* 2nd ed. Ronald Press Company, New York. 228 p.
- Zamudio-Flores, P. B., E. Ochoa-Reyes, J. de J. Ornelas-Paz, J. M. Tirado-Gallegos, L. A. Bello-Pérez, A. Rubio-Ríos, y R. G. Cárdenas-Felix. 2015. Caracterización fisicoquímica, mecánica y estructural de películas de almidones oxidados de avena y plátano adicionadas con betalaínas. *Agrociencia* 49: 483-498.