



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DEL METIL JASMONATO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE  
COMPUESTOS FENÓLICOS DE UN CULTIVO CELULAR DE  
*KALANCHOE DAIGREMONTIANA* RAYM.-HAMET Y H. PERRIER.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

DAVID MEJIA SANCHEZ



DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARÍA ELENA ESTRADA ZUÑIGA

COASESOR ACADEMICO:  
DR. AURELIO NIETO TRUJILLO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo *in vitro* y Fitoquímica del Centro de Investigación en Recursos Bióticos (CIRB) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Con el apoyo del Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) se sustentó una parte de este trabajo, bajo el proyecto con folio 2136-2018

## Índice

Índice de Tablas .....	vi
Índice de Figuras .....	vii
Lista de abreviaturas y símbolos.....	viii
Resumen .....	x
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 Importancia y usos medicinales del género <i>Kalanchoe</i> .....	3
2.2 Fitoquímica del género <i>Kalanchoe</i> .....	4
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas y su aplicación en la producción de MS .....	16
2.4 La elicitación como estrategia para incrementar la producción de MS por CTV..	19
2.5 Botánica, usos y cultivo <i>in vitro</i> de <i>K. daigremontiana</i> . .....	21
3. Justificación .....	28
4. Hipótesis.....	29
5. Objetivos.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivo particular.....	30
6. Materiales y métodos.....	31
6.1 Material vegetal.....	31
6.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación .....	31
6.2.1 Inducción de callo y establecimiento de cultivos de células en suspensión .....	31
6.3 Elicitación con MeJa. ....	31
6.3.1 Obtención de extractos.....	32
6.4 Análisis fitoquímico.....	32
6.5 Análisis estadístico.....	32
7. Resultados y Discusión.....	33
7.1 Establecimiento de cultivos de callo y de células suspensión .....	33
7.2 Efecto del MeJa sobre la producción de compuestos fenólicos .....	37
8. Conclusiones .....	42
9. Perspectivas .....	43
10. Referencias.....	44

11.	Anexos.....	58
11.1	Anexo 1.....	58
11.2	Anexo 2.....	65

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Metabolitos secundarios reportados para especies del género <i>Kalanchoe</i> .....	9
<b>Tabla 2.</b> Actividad biológica de algunos metabolitos secundarios reportados en <i>Kalanchoe</i> .....	12

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Distribución de especies del género <i>Kalanchoe</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Clasificación de los metabolitos secundarios de plantas .....	5
<b>Figura 3.</b> Diferentes especies medicinales del género <i>Kalanchoe</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Estructura química de algunos metabolitos secundarios reportados en <i>Kalanchoe</i> .....	16
<b>Figura 5.</b> Proceso del CTV y método de la producción de MS .....	18
<i>Kalanchoe</i> .....	21
<b>Figura 6.</b> Aspectos físicos de <i>K. daigremontiana</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> Mapa de la distribución de <i>K. daigremontiana</i> .....	23
<b>Figura 8.</b> Biosíntesis de los MS con el uso de elicitores MeJa, SA y MeJa-SA en <i>K. daigremontiana</i> y <i>K. x houghtonii</i> .....	26
<b>Figura 9.</b> Callo formado con la combinación de PIC 0.1 y BAP 1.0 mg/L. ....	37
<b>Figura 10.</b> Promedio y desviación estándar de los compuestos fenólicos y flavonoides totales usando distintas concentraciones de MeJa .....	39

## Lista de abreviaturas y símbolos

μM	Micromolar
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
μg	Microgramos
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Acido desoxirribonucleico
AF	Ácidos fenólicos
ANA	Acido 1-naftalenacético
BAP	6-Bencilaminopurina
Ca <sup>2+</sup>	Ion Calcio
CAM	Crassulacean Acidic Metabolism (Metabolismo acido crasuláceo)
CFT	Contenido de fenoles totales
CFvT	Contenido de flavonoides totales
Cl <sup>-</sup>	Ion Cloro
cm	Centímetros
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DW	Dry weight (Peso seco)
EAG	Equivalente de ácido gálico
EQ	Equivalente de quercitina
F	Flavonoides
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
H <sup>+</sup>	Ion hidrogeno
HPLC	High performance liquid chromatography (Cromatografía liquida de alta resolución)
h	Horas
IBA	ácido indol-3-butírico
JA	Jasmonato
K <sup>+</sup>	Ion Potasio
L	Litros
m	Metro
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases (Proteína quinasa activada por mitógenos)
MeJa	Metil Jasmonato
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MS	Metabolitos Secundarios
NF-κβ	Factor nuclear kappa de las células β
p. Ej.	Por ejemplo

p/p	Peso de soluto/peso de una solución
PIC	Picloram
QTOF	Quadrupole time-of-flight
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revolución por minuto
SA	Ácido salicílico
T	Triterpenos
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta



## Resumen

*Kalanchoe daigremontiana* ha tomado gran importancia como modelo en investigaciones sobre el metabolismo ácido crasuláceo y su uso como medicina tradicional. Posee distintas propiedades biológicas, como actividad antihistamínica, antiinflamatoria, citotóxica, para tratamiento de abscesos, quemaduras, úlceras gástricas, reumatismo, tos, fiebre y actividad antimicrobiana. En *K. daigremontiana* se han aislado e identificado distintos metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, carotenoides y bufadienólidos. Se ha probado la actividad citotóxica de los bufadienólidos, y los compuestos fenólicos han demostrado poseer actividad antiinflamatoria, antioxidante, así como citotóxica contra algunas líneas celulares. La producción de estos compuestos en *K. daigremontiana* es variada por lo que implementar herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* representa una alternativa para su obtención, además de permitir el empleo de estrategias como la elicitación para activar el metabolismo secundario y el incremento de la producción de estos compuestos. Se ha observado que la elicitación con metil jasmonato potencia la producción de compuestos fenólicos en especies de *Kalanchoe*, sin embargo, siguen siendo pocas las investigaciones sobre cultivo de tejidos vegetales y elicitación con metil jasmonato para la producción de fenoles y flavonoides totales. El objetivo del presente trabajo fue establecer un cultivo celular de *K. daigremontiana* y evaluar el efecto de diferentes concentraciones de metil jasmonato, sobre el contenido de fenoles y flavonoides totales. Se estableció un cultivo de callo y células en suspensión usando medio Murashige y Skoog (100%) suplementado con los reguladores de crecimiento vegetal; Picloram y Bencilaminopurina (0.1+1.0 mg/L). Se realizó la elicitación usando distintas concentraciones de metil jasmonato (50, 100, 150 y 200  $\mu$ M). Posteriormente se realizó un análisis fitoquímico para determinar el contenido de fenoles totales (método Folin Ciocalteu) y el Contenido de flavonoides totales. Todas las concentraciones evaluadas con metil jasmonato incrementaron significativamente el contenido de flavonoides totales (3.18, 1.77, 3.91 y 1.96 mg equivalentes de quercetina por gramo de biomasa (mg EQ/g) respectivamente) al compararse con el control (0.81 mg EQ/g), mientras que solo las concentraciones

50 y 150  $\mu\text{M}$  de metil jasmonato incrementaron el contenido de fenoles totales (5.84 y 5.39 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa (EAG/g) respectivamente), al compararse con el control (3.4 mg EAG/g). Se logró establecer un cultivo celular en suspensión de *K. daigremontiana*, la adición de metil jasmonato en dicho cultivo establecido, provocó un incremento en la producción de fenoles y flavonoides totales. Compuestos con actividades biológicas que podrían ser caracterizados y probados en investigaciones futuras.

## Abstrac

*Kalanchoe daigremontiana* has taken great importance as models in research on crassulacean acid metabolism and its use in traditional medicine. It has different biological activities, such as antihistamine, anti-inflammatory, cytotoxic activity, for treatment of abscesses, burns, gastric ulcers, rheumatism, cough, fever, its antimicrobial activity has been evaluated. In *K. daigremontiana*, different secondary metabolism have been isolated and identified as phenolic compounds, carotenoids and bufadienolides; the bufadienolides have been tested for their cytotoxic activity against different cancer cell lines, the phenolic compounds have been shown to have anti-inflammatory, antioxidant, as well as cytotoxic activity against some cell lines. The production of these compounds in *K. daigremontiana* is varied, so implementing biotechnological techniques such as in vitro culture represents an alternative for obtaining them, in addition to allowing the use of strategies such as elicitation to activate secondary metabolism and increase the production of these compounds. It has been observed that elicitation with methyl jasmonate has enhanced the production of phenolic compounds in *Kalanchoe* species. However, there is still little research on plant tissue culture and elicitation with methyl jasmonate on the content of phenols and total flavonoids. The objective of this work was to establish a cell culture of *K. daigremontiana* and evaluate the effect of methyl jasmonate, at different concentrations, on the content of phenols and total flavonoids of cell culture of *K. daigremontiana*. A callus and cell suspension culture was established using Murashige and Skoog medium (100%) supplemented with the plant growth regulators; picloram and benzylaminopurine (0.1+1.0 m/L). Elicitation was carried out using different concentrations of methyl jasmonate (50, 100, 150 y 200  $\mu$ M). Subsequently, the phytochemical analysis was performed. To determine total phenol content (The Folin Ciocalteau Method) and total flavonoid content was determined; all the evaluated concentrations of methyl jasmonate significantly increased total flavonoid content (3.18, 1.77, 3.91 y 1.96 mg of quercetin equivalents per gram of biomass (EQ/g) respectly), when compared to the control (0.81 mg EQ/g), while only the 50 and 150  $\mu$ M concentrations of methyl jasmonate increased total phenol

content (5.84 y 5.39 mg of gallic acid equivalent per gram of biomass (EAG/g) respectively), when compared to the control (3.4 mg EAG/g). It was possible to establish a suspension cell culture of *K. daigremontiana*, the addition of methyl jasmonate in the established culture, caused an increase in the production of phenols and total flavonoids. Compounds with biological activities that could be characterized and tested in future research.

## 1. Introducción

El género *Kalanchoe* es un buen modelo de estudio en investigaciones sobre fisiología vegetal, particularmente sobre el metabolismo ácido crasuláceo (CAM) y sobre la capacidad regenerativa en plantas. También tiene gran importancia porque engloba a varias especies medicinales que poseen diversas actividades biológicas (Milad *et al.*, 2014; Garcia-Perez *et al.*, 2018; Kolodziejczyk-Czepas y Stochmal, 2017). Se ha reportado que producen metabolitos secundarios (MS) relacionados con propiedades medicinales; dicho género se caracteriza por producir MS tipo terpeno, tales como triterpenos (McKenzie *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 2006), incluyendo bufadienólidos, esteroides (Gaiko *et al.*, 1976) y MS tipo fenólico como los flavonoides (Siti-Aisyah *et al.*, 2016). Estos últimos son reconocidos por su propiedad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras, mientras que, en las plantas, pueden actuar como atrayentes o elementos disuasivos de otros organismos, o como protectores contra plagas de insectos al afectar su comportamiento, crecimiento y desarrollo (Chomel *et al.*, 2016).

Las plantas producen MS en respuesta a su interacción con el medio ambiente, por lo que su concentración puede ser fluctuante (Wink, 2015; Kabera *et al.*, 2014). Los reportes en la literatura muestran que el contenido de compuestos fenólicos totales entre especies pertenecientes al género *Kalanchoe* es variado. En *Kalanchoe gastonis-bonnierise* Raym.-Hamet and H. Perrier se reportan 20 mg equivalentes de ácido gálico por gramo (mg EAG/g) de hoja seca (Romero-Calbache, 2017); en *Kalanchoe pinnata* Lam. (Pers.) se reportan 56.35 mg EAG/g de hoja seca (Torres-Molina, 2017); en *K. daigremontiana* Raym.-Hamet y H. Perrier se reportan 4.96 mg EAG/g de hoja seca (Sharker *et al.*, 2013).

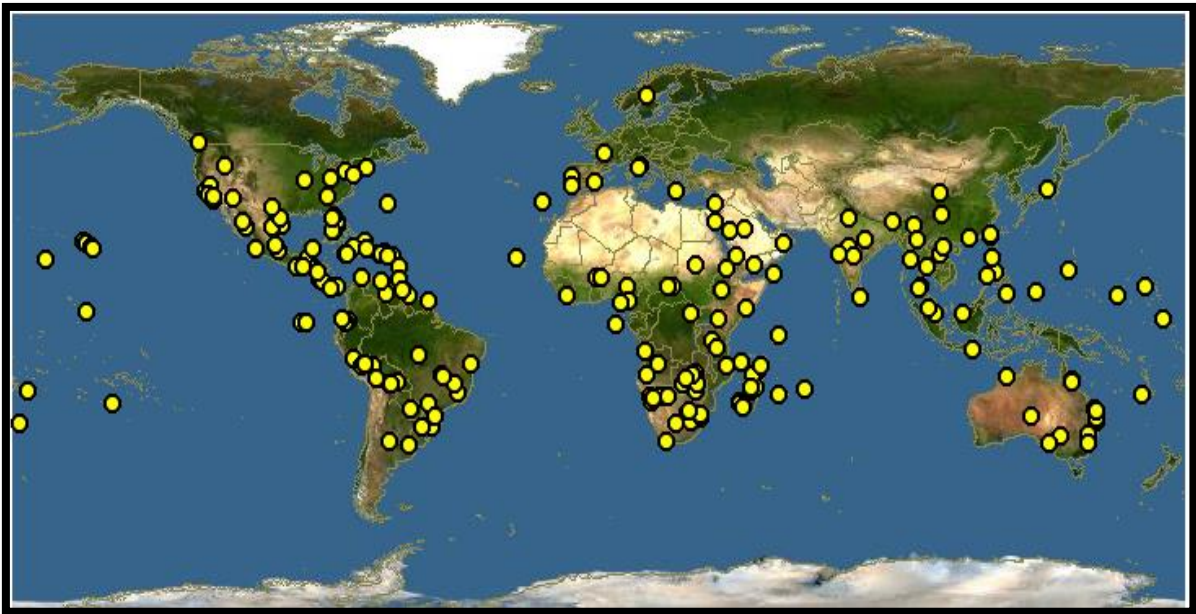
Una herramienta biotecnológica que representa una alternativa para la producción de MS de plantas es el cultivo de tejidos vegetales (CTV, también conocido como cultivo *in vitro*) pues se lleva a cabo en condiciones nutricionales y ambientales controladas (Wei. *et al.*, 2016). Además, el CTV permite el empleo de estrategias para incrementar la producción de MS, como la elicitación con metil jasmonato (MeJa), que cuando se aplica exógenamente a cultivos de células vegetales de una variedad, estimula positivamente las vías biosintéticas del metabolismo secundario,

lo que lleva a una mayor producción de diversos MS, incluidos los terpenoides, alcaloides y fenólicos (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016). En *K. daigremontiana* existen pocos reportes sobre CTV y elicitación con MeJa sobre el contenido de fenoles y flavonoides totales.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Importancia y usos medicinales del género *Kalanchoe*

El género *Kalanchoe* es un conjunto de especies pertenecientes a la Familia Crassulaceae y a la subfamilia Kalanchoideae, la cual está formada por tres géneros *Kitchingia*, *Bryophyllum* y *Kalanchoe*, aunque hay autores que consideran que la subfamilia solamente está formada por el género *Kalanchoe* y que los otros dos géneros son secciones de este último (Mort *et al.*, 2001; Baltwin, 1938). Las especies del género *Kalanchoe* son originarias de zonas extremadamente secas de Madagascar y de regiones áridas de África oriental (Gehrig *et al.*, 2001; Kluge *et al.*, 1991), aunque se encuentran ampliamente distribuidas en países tropicales y subtropicales (Figura 1) (Beckett y Schuster, 1990; Karuppusamy, 2009). Ninguna especie del género *Kalanchoe* es endémica de México, pero diversas especies fueron introducidas al país y se distribuyen en los Estados de Chiapas, México, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Meyran-García y López-Chavez, 2003; Remib, 2008).



**Figura 1.** Distribución de especies del género *Kalanchoe* (imagen tomada de [https://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make\\_map](https://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map))

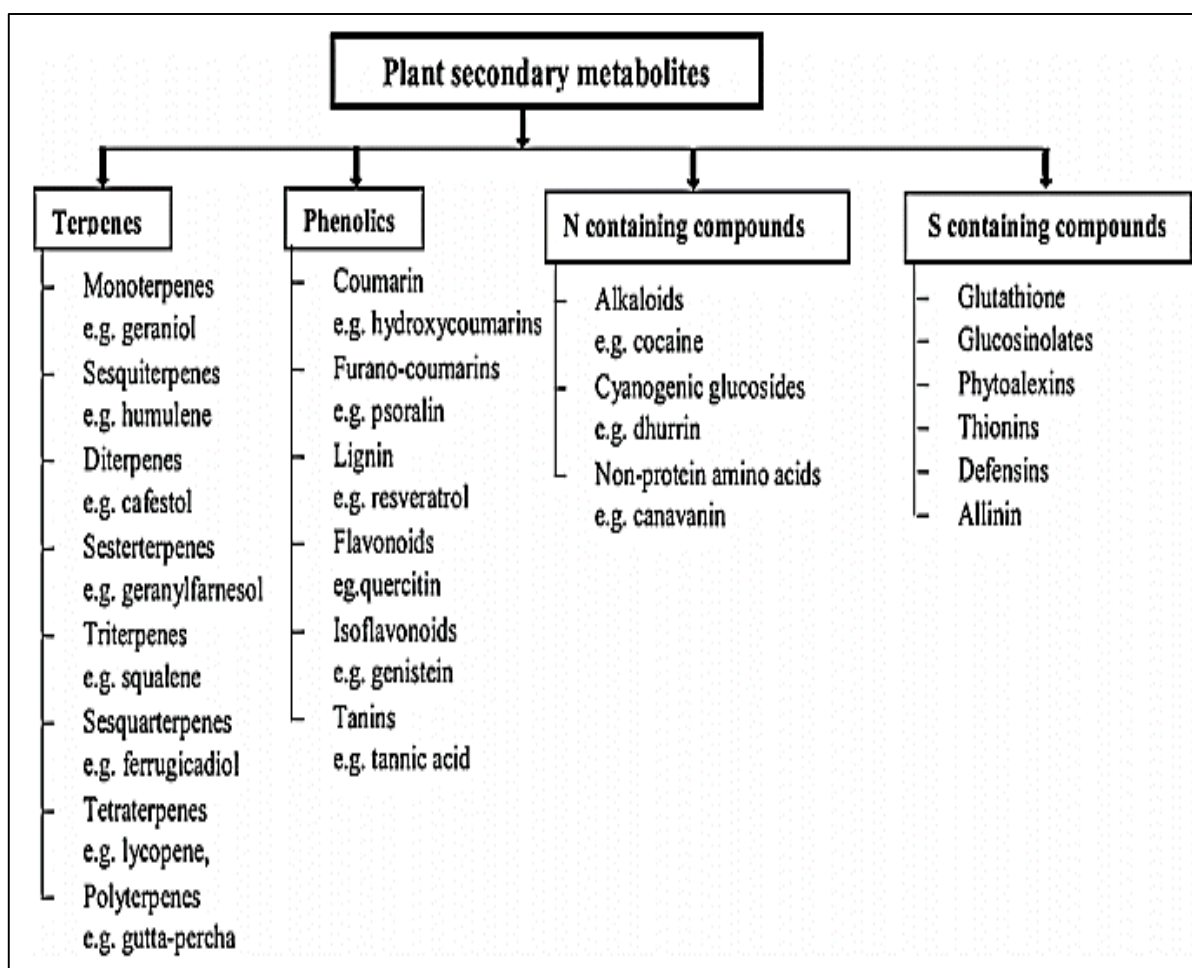
El género *Kalanchoe* se distingue por sus órganos florales los cuales consisten en: cuatro sépalos, cuatro pétalos, cuatro carpelos sin condensar y ocho estambres (Milad *et al.*, 2014). Es un buen modelo de estudio en investigaciones sobre fisiología vegetal, particularmente sobre el metabolismo ácido crasuláceo (CAM), el cual representa una modificación adaptativa de la vía de asimilación fotosintética del carbono; así como estudios bioquímicos; ecofisiológicos (Milad *et al.*, 2014; Kluge y Brufert, 1996). También, este género desempeña un papel importante en la investigación de plantas sobre la regeneración de células vegetales y la reproducción asexual (Guo *et al.*, 2014; Milad *et al.*, 2014). Esta última en las especies de *Kalanchoe* se observa a través de la formación de plántulas en los márgenes de las hojas de las plantas adultas, ya sea de manera inducida por estrés o constitutiva, a través de un mecanismo complejo que involucra procesos hormonales, genéticos, morfológicos y embriogénicos (Garces y Sinha, 2009). Además del interés sobre su reproducción y metabolismo, las especies del género *Kalanchoe* han ganado mucho interés debido a su uso en la medicina tradicional, principalmente en África, Asia y América del Sur, donde se han utilizado para el tratamiento de diversos padecimientos, como las picaduras de insectos, heridas, quemaduras, fiebre, infecciones, tos, artritis, úlceras gástricas, dolores de cabeza, diabetes, reumatismo entre otros (Nwadinigwe, 2011; Ojewole, 2005; Da Silva *et al.*, 1995).

## 2.2 Fitoquímica del género *Kalanchoe*

Los MS también llamados productos secundarios o productos naturales, son compuestos orgánicos que aparentemente no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo de la planta (Taiz y Ziegen, 2010), aunque tienen un papel importante en la interacción entre las plantas y su entorno (por ejemplo, defensa contra herbívoros y patógenos, protección contra la luz ultravioleta, etc.). Los MS son compuestos diferentes a los producidos durante el metabolismo primario (amino ácidos, nucleótidos, azúcares, ácidos lipídicos), su distribución en el reino vegetal está restringida y solo pueden encontrarse en algunas especies o grupos de plantas



(Taiz y Ziegen, 2010). Son compuestos que se acumulan en tejidos y estructuras específicas (por ejemplo, vacuolas, glándulas especializadas, tricomas, etc.) y su producción se ve afectada por varios factores, como el genotipo, la fisiología de las plantas, el clima, las condiciones ambientales y los patógenos; en algunos casos, solo se producen durante ciertas etapas de desarrollo (Isah *et al.*, 2018; Shitan, 2016). Los MS pueden clasificarse según su ruta de biosíntesis en: compuestos que contienen nitrógeno, compuestos que contienen azufre, terpenoides y compuestos fenólicos (Wink, 2015; Kabera *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2017), y en cada caso se presentan diferentes tipos (Figura 2).



**Figura 2.** Clasificación de los metabolitos secundarios de plantas (imagen tomada de Jamwal *et al.*, 2018)

Las plantas continúan siendo la fuente principal de moléculas bioactivas, muchas de las cuales son MS; alrededor del 25–28% de las medicinas modernas se derivan de MS bioactivos de plantas superiores. Por lo anterior, en las últimas décadas, los esfuerzos se han dirigido a la extracción, purificación y el esclarecimiento de la estructura de muchos MS, así como de sus efectos biológicos (Samuelsson, 2004). Tal es el caso de los compuestos fenólicos, los cuales comprenden una amplia gama de metabolitos que se pueden clasificar acorde a su estructura química, destacándose los fenoles simples (esqueleto C6), ácidos fenólicos (C6-C1 o C6-C3), taninos ((C6-C3-C6)*n*) y flavonoides (C6-C3-C6) (Kabera *et al.*, 2014; Chomel *et al.*, 2016). Algunos flavonoides como las antocianinas son antioxidantes bien conocidos que eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS), tal como la cianidina-3-glucósido que tiene una gran capacidad de absorción de radicales de oxígeno *in vitro* (Wang *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado que las antocianinas reducen los factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares (Wallace *et al.*, 2016), suprimen el crecimiento celular en varias líneas celulares de cáncer (Lin *et al.*, 2017), poseen efecto antiinflamatorio (p.Ej. cianidina-3-glucósido, delphinidina-3-glucósido y petunidina-3-glucósido) ya que inhiben las actividades del factor nuclear kappa de las células B (NF-κB) a través de las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), así como la actividad de la enzima ciclooxigenasa (Afaq *et al.*, 2005; Vendrame y Klimis-Zacas, 2015; Wang *et al.*, 1999).

El género *Kalanchoe* también tiene gran importancia porque presenta especies medicinales con potencial antifúngico (Misra & Dixit, 1979), antiinflamatorio (Afzal *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 1999), antiulcérico (Pal *et al.*, 1999), antimicrobiano (Akinpelu, 2000), insecticida (Supratman *et al.*, 2000; Supratman *et al.*, 2001a), anticancerígeno (Supratman *et al.*, 2001b; Mahata *et al.*, 2012), antihipertensivo (Ojewole, 2002), antidiabético (Goyal, *et al.*, 2013; Matthew, *et al.*, 2013c) hepatoprotector (Yadav and Dixit, 2003), analgésico (Nguelefack *et al.*, 2006), inmunomodulador (Cruz *et al.*, 2008), y con efectos en desórdenes asociados al sistema nervioso central (Kukuia *et al.*, 2015).

En las especies del género *Kalanchoe*, se han aislado e identificado MS, tales como: triterpenos, esteroides, fenantrenos (Baladrin *et al.*, 1985; Wink, 2015), bufadienólidos (Kabera *et al.*, 2014; Bourgaud *et al.*, 2001; Dornenburg y Knorr, 1995; Bhalsingh y Maheshwari, 1998), antocianinas y flavonoides (Namdeo *et al.*, 2002; Rao y Ravishankar, 2002). Los datos publicados sobre los MS aislados de diferentes órganos de especies de *Kalanchoe* (Figura 3) se resumen en la Tabla 1. Algunos de estos MS presentan actividades biológicas como se muestra en la Tabla 2, de la que se puede observar que los MS tipo bufadienólidos se han identificado en diferentes especies (Tabla 1). Éstos son compuestos tipo triterpeno esteroide de 24 carbonos y tienen como característica la presencia de 6 anillos de lactona ( $\alpha$ -pirona) y una doble insaturación en la posición 17- $\beta$  del núcleo perhidrofenantreno (Gaussmann, 2001), los cuales han presentado actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer (Tabla 2, Figura 4). Además, se han identificado MS tipo flavonoide como otra clase predominante en especies del género *Kalanchoe* (Tabla 1) presentando actividad antiinflamatoria, antioxidante, así como citotóxica contra algunas líneas celulares (Tabla 2, Figura 4).

a



b



c



d





**Figura 3.** Diferentes especies medicinales del género *Kalanchoe*. a) *K. blossfeldiana*, b) *K. brasiliensis*, c) *K. daigremontiana*, d) *K. gracilis*, e) *K. pinnata*, f) *K. spathulata* (Imágenes tomadas de <https://www.naturalista.mx/>)

**Tabla 1:** Metabolitos secundarios reportados para especies del género *Kalanchoe*

Especie	Parte de la planta	Tipo de MS	Nombre de MS aislado	Referencia
<i>K. blossfeldiana</i>	Flores	F	Cianidina	Nielsen <i>et al.</i> , 2005
			Delfinidina	
			Malvidina	
			Peonidina	
			3,5-o-b-D-diglucosido de pelargonidina	
			Quercetin	
			Quercetrin	
<i>K. brasiliensis</i>		F	Patuletin-3-O-(4"-O-acetyl-	

	Hojas y tallo		$\alpha$ -L- rhamnopyranosyl)-7-O-(2'''-O-acetyl- $\alpha$ -Lrhamnopyranoside) Patuletin-3-O- $\alpha$ -Lrhamnopyranosyl-7 O-(2'''-O-acetyl- $\alpha$ -Lrhamnopyranoside) Patuletin-3-O-(4''-O-acetyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-7-Orhamnopyranoside	Costa <i>et al.</i> , 1994
<i>K. daigremontiana</i>	Flores	F	Cianidina-3-glucósido	M. A. Puertas Mejía <i>et al.</i> , 2014
	Hojas	AF	Ácido gálico Ácido ferúlico Ácido cafeico Ácido p-cumárico Ácido protocateico.	Chernetsky <i>et al.</i> , 2018
	Hojas	T	Daigremontianina	Supratman <i>et al.</i> , 2001a, b
	Raíces	T	Kalandaigremoside A Kalandaigremoside B Kalandaigremoside C Kalandaigremoside D Kalandaigremoside E Kalandaigremoside F Kalandaigremoside G Kalandaigremoside H	Moniuszko-Szajwaj <i>et al.</i> , 2016
<i>K. daigremontiana x tubiflora</i>	Hojas	T	Bersaldegenin-3-acetate	Supratman <i>et al.</i> , 2001a
			Bryophyllin A	
			Bryophyllin C	
<i>K. gracilis</i>	Parte aérea	F	Eupafolin	Liu <i>et al.</i> , 1989
			Eupafolin-3-7 di-o-rhamnoside	
			Eupafolin-3-O-rhamnosyl-7-O-(4-O-acetyl-rhamnoside)	
			Eupafolin-3-O-(3-O-acetyl-rhamnosyl)- 7-O-(3-O- acetyl-rhamnoside)	
			Eupafolin-4'-o-rhamnoside	

			Luteolin	
			Kaempferol	
			Quercitrin	
			Quercetin	
	Parte aérea	T	Hellebrigenin	Wu <i>et al.</i> , 2006
			Hellebrigenin-3-acetate	
			Kalanchoside A	
			Kalanchoside B	
			Kalanchoside C	
<i>K. pinnata</i>	Hojas	F	Quercitrin	Muzitano <i>et al.</i> , 2006
			Quercetin-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1 2) $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	
	Planta completa	F	Afzelin	Tatsimo <i>et al.</i> , 2012
			$\alpha$ -rhamnoisorobin	
			Kaempferitrin	
			Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-(2-acetyl)rhamnopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	
			Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-(3-acetyl)rhamnopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	
			Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-(4-acetyl)rhamnopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	
			Kaempferol 3-O- $\alpha$ -D-glucopyranoside-7-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	
Hojas	T	Bryophyllin A	Supratman <i>et al.</i> , 2001b; Supratman <i>et al.</i> , 2000	
		Bryophyllin C		
<i>K. spathulata</i>	Hojas y flores	F	Kaempferol	Gaind <i>et al.</i> , 1981
			Kaempferol-3-o-rhamnoside	
			Patuletin	

			Patuletin-3,7-di-Orhamnoside	
			Quercetin	
			Quercetin-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside	
<i>K. streptantha</i>	Hojas	F	4'''-acetylsagittatin A	Costa <i>et al.</i> , 1996

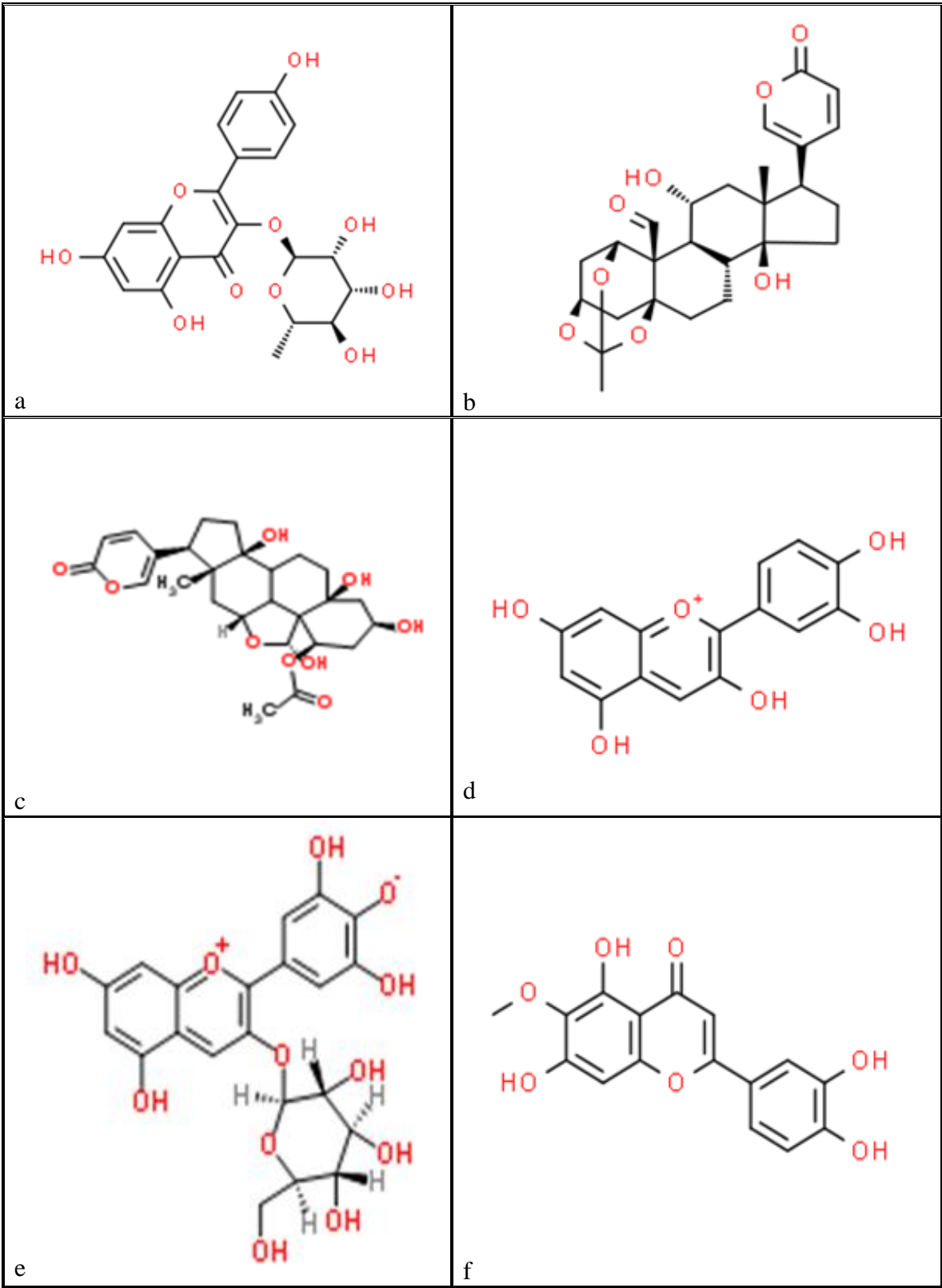
AF= Ácidos Fenólicos, F= Flavonoide, T= Triterpenos,

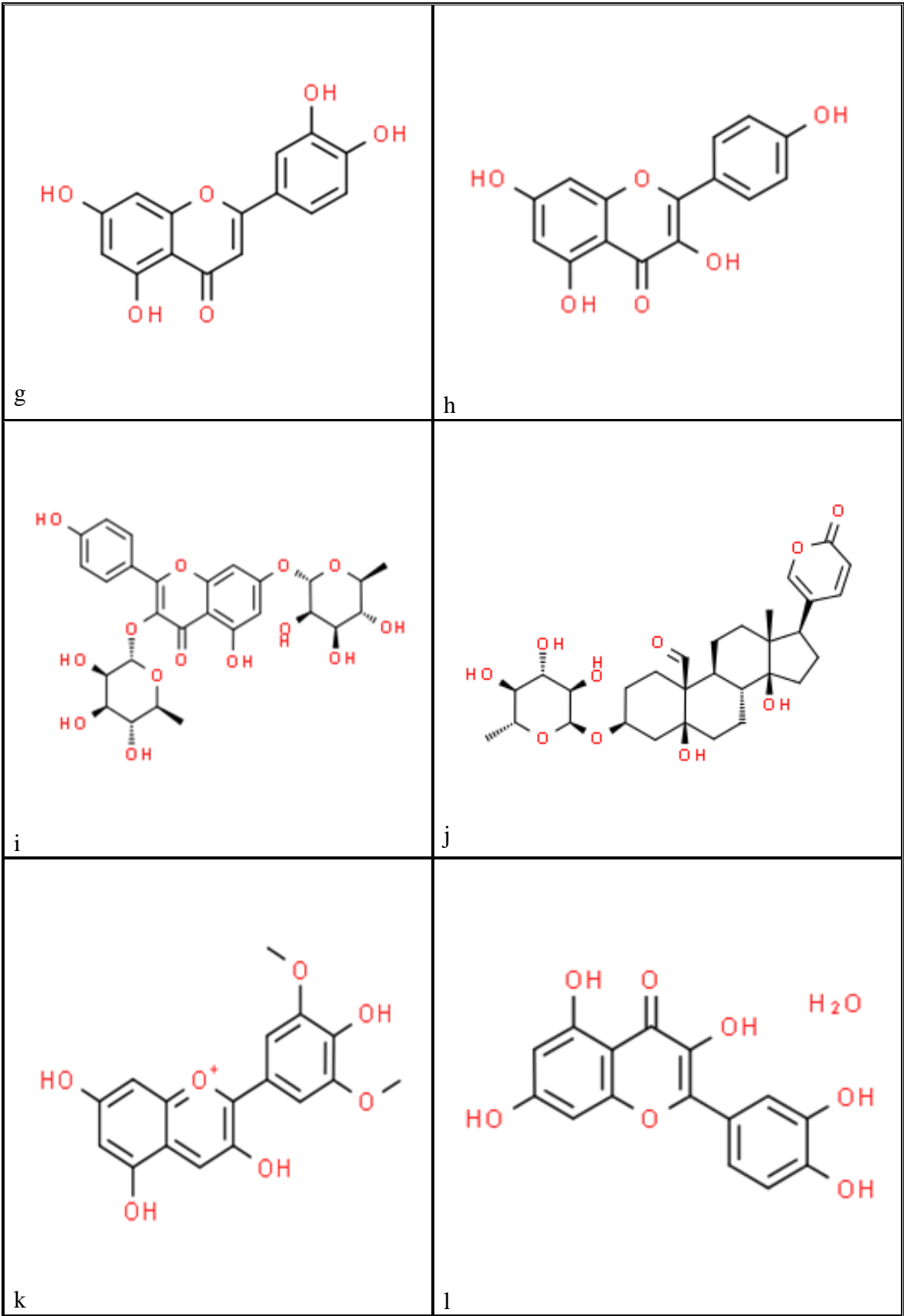
**Tabla 2.** Actividad biológica de algunos metabolitos secundarios reportados en *Kalanchoe*

Nombre del metabolito secundario	Actividad biológica	Referencia
Afzelin	Protección del ADN, antipalúdica, antioxidante, antiinflamatoria y actividad absorbente de rayos UV Actividad antioxidante	Liu <i>et al.</i> , 2007; Shin <i>et al.</i> , 2013
Bryophyllin A	Insecticida	Supratman <i>et al.</i> , 2001b
Bryophyllin B	Inhibición de la replicación del VIH en linfocitos H9	Wu <i>et al.</i> , 2006
Bryophyllin C	Insecticida	Supratman <i>et al.</i> , 2000
Cianidina	Antiinflamatoria y antioxidante	Liang <i>et al.</i> , 2017
Delfinidina	Hepatoprotectora, antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena	Patel <i>et al.</i> , 2013
Eupafolin	Antiangiogénico, antitumoral	Jiang <i>et al.</i> , 2017;



		Ko <i>et al.</i> , 2014
Luteolin	Antioxidante, antiinflamatoria antimicrobiana y anticancerígena	Lopez-lazaro, 2009
Kaempferol	Antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante	Wang <i>et al.</i> , 2018
Kaempferitrin	Hipoglucemiante, antiinflamatoria, anticancerígena, inmunoestimulante, antidepresiva, antifúngica y antibacteriana.	Ramos-Hernández <i>et al.</i> , 2018
Kalanchosides	Actividad citotóxica en líneas de células tumorales humanas [nasofaríngeas (KB), su MDR variante (KB-VIN), pulmón (A549), ovario (1A9), próstata (PC3), ileocecal (HCT-8) y epidermoide (A431)	Wu <i>et al.</i> , 2006
Malvidina	Antioxidante	Costa <i>et al.</i> , 2014
Quercetin	Antiinflamatoria, anticancerígena, antiulcerica, antibacterial	Anand-David <i>et al.</i> , 2016

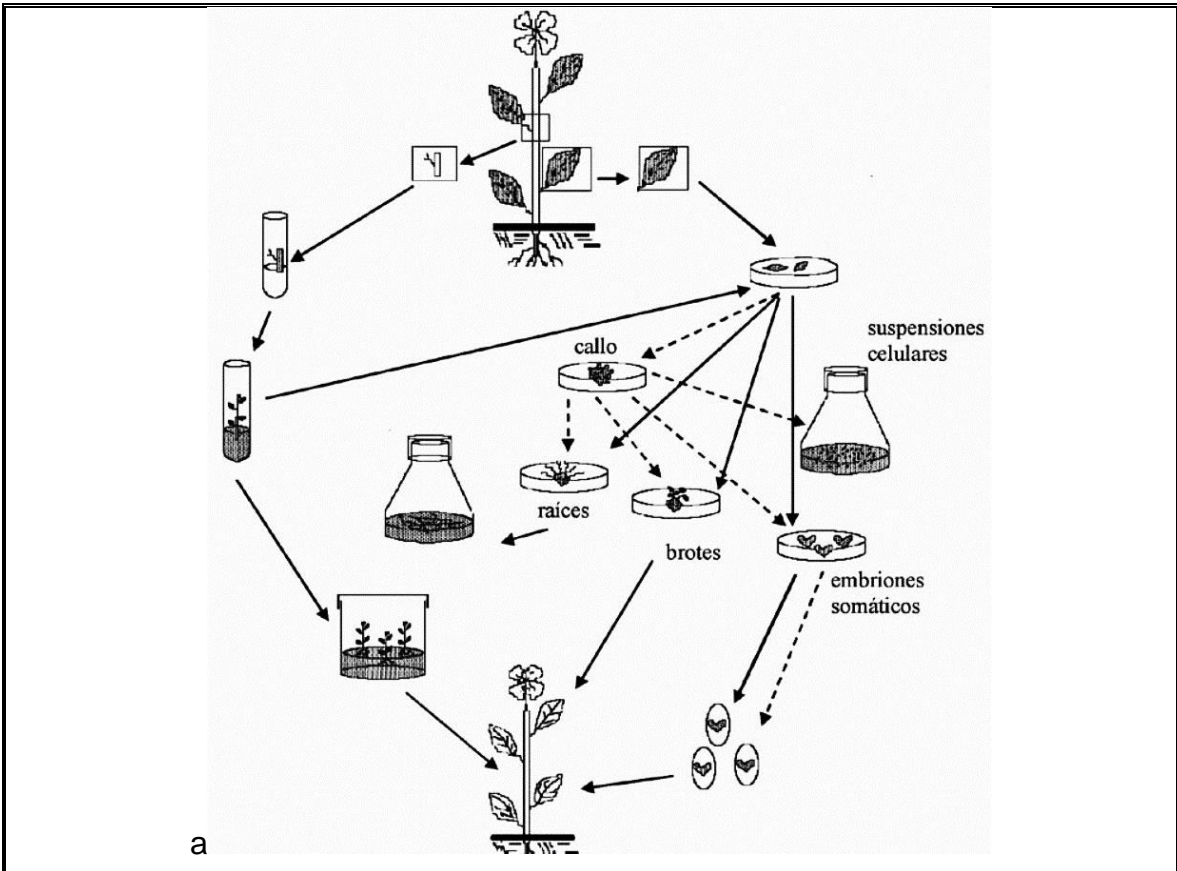




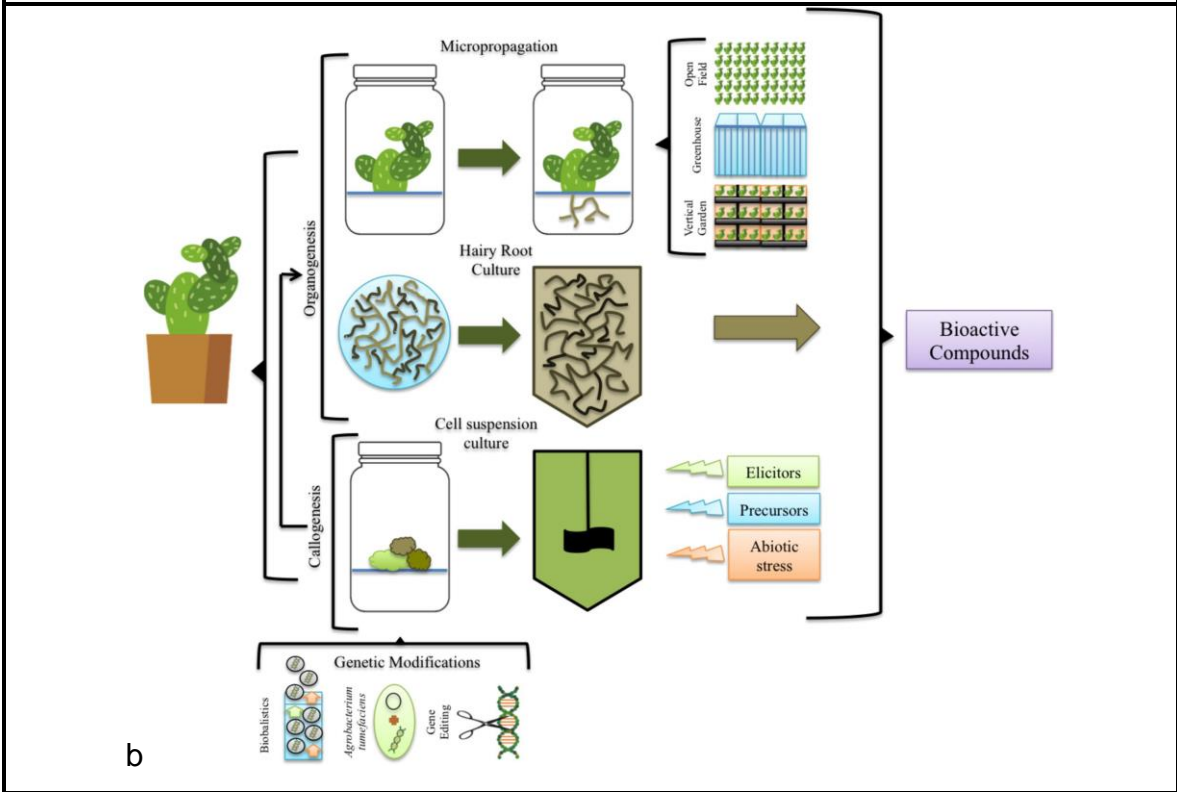
**Figura 4.** Estructura química de algunos metabolitos secundarios reportados en *Kalanchoe*: a) afzelin, b) bryophyllin A, c) bryophyllin B, d) cianidina, e) delphinidina, f) eupafolin, g) luteolin, h) kaempferol, i) kaempferitrin, j) kalanchosides A, k) malvidina, l) quercetin (Imágenes obtenidas de <http://www.chemspider.com/>)

### 2.3 Cultivo *in vitro* de plantas y su aplicación en la producción de MS

El cultivo de tejidos vegetales (CTV), también conocido como cultivo celular o *in vitro*, es una herramienta importante en los estudios básicos y aplicados, así como en la aplicación comercial. El CTV es el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes en condiciones físicas y químicas definidas *in vitro*. El CTV es una herramienta importante en la biotecnología vegetal, su fundamento es la totipotencialidad de las células vegetales, que se refiere a la capacidad de una sola célula para expresar el genoma completo por división celular, además de la capacidad de las células para alterar su metabolismo, crecimiento y desarrollo (Thorpe 2007). La base teórica para el cultivo de tejidos vegetales fue propuesta por Gottlieb Haberlandt, en su discurso ante la Academia Alemana de Ciencias en 1902 sobre sus experimentos sobre el cultivo de células individuales (Neumann *et al.*, 2009; Thorpe 1990).



a



b

**Figura 5.** Proceso del CTV y método de la producción de MS, a) obtención de CTV por organogénesis o embriogénesis directa (línea continua) y morfogénesis indirecta (línea punteada) (imagen tomada de Radice, 2004), b) diagrama de la obtención de CTV para producción de MS (imagen obtenida de Espinosa-Leal *et al.*, 2018)

Dependiendo de la parte de la planta que se cultiva, podemos referirnos a ellos como cultivo celular (células gaméticas, suspensión celular y cultivo de protoplastos), cultivo de tejidos (callos y tejidos diferenciados) y cultivo de órganos (cualquier órgano como embriones cigóticos, raíces, brotes y anteras, entre otros); cada tipo de cultivo se utiliza para diferentes aplicaciones básicas y biotecnológicas (Hussain *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, se han realizado progresos considerables con respecto a la producción de MS mediante el uso de técnicas de cultivo de tejidos vegetales debido a las ventajas de esta plataforma sobre otros sistemas de producción. La producción de MS por cultivos *in vitro* generalmente ocurre en un proceso de dos pasos, acumulación de biomasa y síntesis de metabolitos secundarios, en el que ambos pasos deben optimizarse de forma independiente (Goncalves y Romano, 2008; Isah *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2014). La producción podría lograrse mediante el uso de callos indiferenciados, cultivos en suspensión celular o estructuras organizadas como brotes, raíces o embriones somáticos. En algunos casos, puede ser necesario un cierto grado de diferenciación para que ocurra la biosíntesis (Karuppusamy, 2009). Se requiere el uso de cultivos de órganos diferenciados, por ejemplo, cuando el metabolito objetivo solo se produce en tejidos o glándulas vegetales especializadas, como es el caso de los aceites esenciales (Karuppusamy, 2009; Rao y Ravishanka, 2002).

Los cultivos de tejido celular y de suspensión celular puede interpretarse como células libres o pequeños grupos de células de callos de plantas cultivadas en un medio líquido dispersado que puede producir una masa de MS (Moscatiello *et al.*,

2013); han sido investigados por métodos biotecnológicos y proporcionan una plataforma de bioproducción prometedora para los productos naturales deseados. Aparte de la producción de metabolitos mediada por el cultivo de células vegetales, también existe la oportunidad de identificar líneas celulares que pueden producir cantidades de compuestos iguales o incluso mayores que las de la planta. Además, ciertos compuestos que no están presentes o sintetizados en las plantas pueden producirse mediante cultivos celulares (Bhatia y Bera, 2015).

Las células vegetales cultivadas en suspensión pueden mantenerse en un estado desdiferenciado con una división celular poco coordinada durante largos períodos de tiempo. Con respecto a la homogeneidad y la estabilidad genética, las células en suspensión proliferan más rápidamente que las células del callo. Se puede seguir al crecimiento simplemente evaluando varios parámetros que están asociados directa o indirectamente con el crecimiento, como el número de células, la masa fresca y seca, el índice mitótico, los componentes del medio, la conductividad del medio (Kayser y Quax, 2006).

Los cultivos de células en suspensión de plantas son un sistema modelo confiable para la investigación y la producción *in vitro* de MS para uso farmacéutico. La principal ventaja de esta tecnología es que puede llevarse a cabo bajo condiciones controladas y se pueden utilizar varios inductores para aumentar la acumulación de metabolitos. Es independiente de las condiciones geográficas, estacionales y ambientales, y contribuye a un sistema de producción estable que garantiza la acumulación continua de productos con calidad y rendimiento uniformes. Se han obtenido numerosos medicamentos naturales con diversas actividades como; antitumorales, antipalúdicos, antioxidantes y antidiabéticos, etc. Además, muchos compuestos nuevos se han aislado de células suspendidas de plantas medicinales combinadas con biotransformación (Yue *et al.*, 2014).

#### 2.4 La elicitación como estrategia para incrementar la producción de MS por CTV

Hay varios factores que pueden optimizarse para mejorar el crecimiento y la productividad de los metabolitos de los cultivos *in vitro*. Entre ellos, se pueden nombrar los siguientes: la composición del medio de cultivo, el pH del medio, la densidad del inóculo, el entorno del medio de cultivo (p. Ej., temperatura, calidad de la luz, etc.), la agitación y la aireación, etc. (Isah *et al.*, 2018; Murphy *et al.*, 2014; Ochoa-Villareal *et al.*, 2016). El medio de cultivo afecta fuertemente la productividad de la biomasa y los metabolitos, y por lo tanto, la selección de la formulación adecuada del medio de cultivo es un paso imprescindible (Isah *et al.*, 2018). Debe seleccionarse de acuerdo con los requisitos fisiológicos de las especies de plantas, y hay varios parámetros que pueden optimizarse, a saber, la composición de nutrientes, concentración de sal, niveles de nitrato y fosfato, tipo y concentración de reguladores del crecimiento de las plantas, fuente de carbono, etc.

No obstante, la estrategia disponible que suele emplearse en CTV para mejorar la productividad de los metabolitos secundarios, es la elicitación, que tiene como objetivo activar la señalización y metabolismo en células o tejidos mediante el uso de agentes que desencadenan la respuesta de defensa (Zhao *et al.*, 2005). Los elicitores tienen la capacidad de controlar una variedad de actividades celulares a nivel bioquímico y molecular, ya que inducen la regulación positiva de los genes (Zhao *et al.*, 2005). Los elicitores pueden ser bióticos o abióticos y pueden comprender moléculas de señalización como MeJa, ácido salicílico (SA), extractos de la pared celular microbiana (p. Ej., Extracto de levadura, quitosano), sales inorgánicas, metales pesados, agentes físicos (p. Ej., Radiación UV) entre otros (Narayani y Srivastava, 2017; Ramirez-Estrada *et al.*, 2016). El SA y MeJa son probablemente los inductores más utilizados (Giri y Zaheer, 2016). Los jasmonatos (JA), particularmente MeJa, desempeñan un papel importante en los procesos de transducción de señales que regulan los genes de defensa en las plantas; cuando se aplica exógenamente a cultivos de células vegetales de una variedad de especies, el MeJa estimula positivamente las vías biosintéticas del metabolismo secundario, lo que lleva a una mayor producción de diversos MS, incluidos los terpenoides, alcaloides y fenólicos, por lo que es considerado un elicitador biótico que

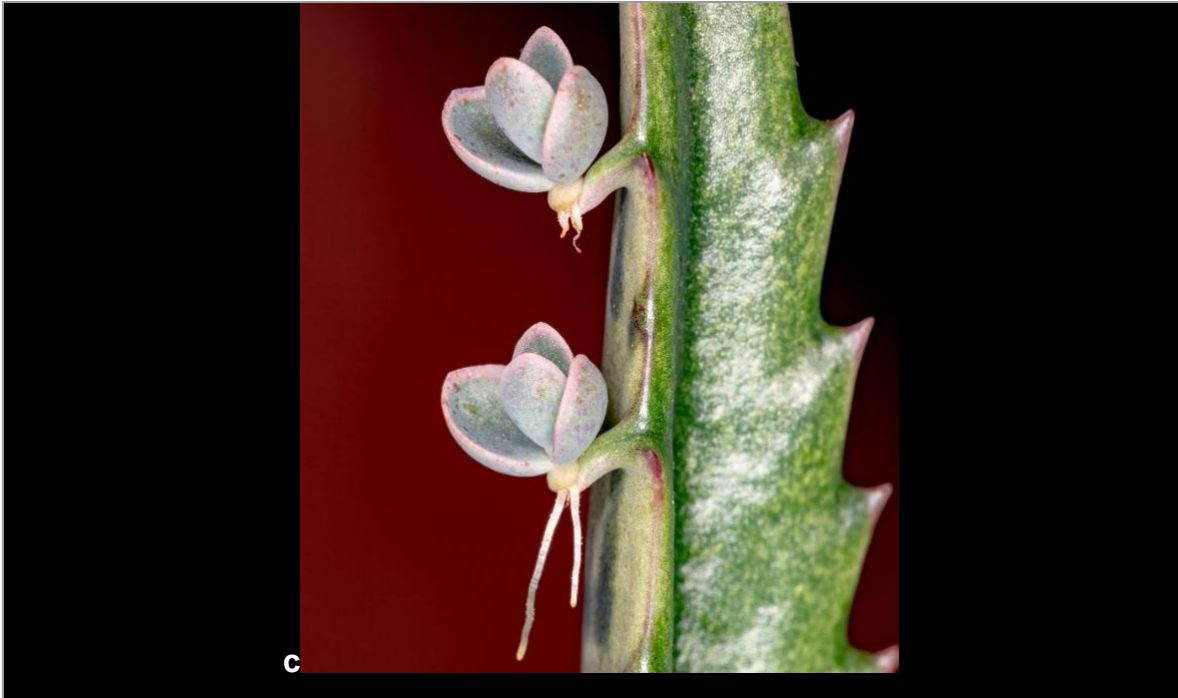


incrementa la producción de compuestos de interés farmacéutico (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016).

### 2.5 Botánica, usos y cultivo *in vitro* de *K. daigremontiana*.

*Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet y H. Perrier. también es conocida comúnmente como aranto, espinazo del diablo, madre de miles, etc. La planta desarrolla un tallo erecto que puede alcanzar hasta 1 m de altura con hojas opuestas, carnosas oblongo-lanceoladas que llegan a los 15-20 cm de largo y de 1-3.5 cm de ancho, los márgenes aserrados de la hoja producen pequeñas plántulas o pseudobulbillos (Johnson, 1934; Descoings, 2003) (Figura 6). La especie es originaria de Madagascar (Chittenden, 1951; Descoings, 2003) pero se ha distribuido en países tropicales y subtropicales, se han encontrado en diferentes Estados de México (Figura 6)





**Figura 6.** Aspectos físicos de *K. daigremontiana*, a) aspecto de las hojas de *K. daigremontiana*, b) floración en *K. daigremontiana*, c) brotes saliendo las aserraduras de las hojas en *K. daigremontiana* (imágenes tomadas de <https://www.naturalista.mx/>)



**Figura 7.** Mapa de la distribución de *K. daigremontiana* en México (imagen tomada de [https://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make\\_map](https://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map))

*Kalanchoe daigremontiana* es usada tradicionalmente para tratar quemaduras, úlceras gástricas, reumatismo, tos, y fiebre (Anisimov *et al.*, 2009), siendo algunos de dichos usos atribuidos a compuestos fenólicos, carotenoides, polisacáridos y bufadienólidos (Tabla 1,2). Posee distintas actividades biológicas, como actividad antihistamínica, antiinflamatoria, citotóxica, para tratamiento de abscesos, quemaduras, úlceras gástricas, reumatismo, tos, fiebre, así como actividad antimicrobiana (Wu *et al.*, 2009; Supratman *et al.*, 2001b),

Pocas investigaciones han sido realizadas para establecer cultivos *in vitro* de callo y de células en suspensión y la variación en la producción de MS de *K. daigremontiana*. García-Pérez y colaboradores en 2020 realizaron el cultivo *in vitro* de tres especies diferentes de *Kalanchoe* (*K. daigremontiana*, *K. tubiflorum* y *K. x houghtonii*), bajo estrés nutricional para inducir la biosíntesis de compuestos fenólicos, además de optimizar la extracción fenólica utilizando cuatro disolventes con diferentes proporciones de MeOH. Para el establecimiento del cultivo *in vitro* se usaron plántulas de 18 meses de un invernadero, se desinfectaron y colocaron en recipientes con 25 mL de medio usándose dos formulaciones; medio Murashige y Skoog al 100% y al 50%, suplementado con 3% de sacarosa, para la extracción se usaron combinación de MeOH:agua (v/v); 40%, 60%, 80% y MeOH absoluto, el valor máximo se obtuvo de las partes aéreas de *K. x houghtonii* cultivadas en medio MS 50% y extraídas con MeOH 80% (50 mg EAG/g DW), para flavonoides las partes aéreas mostraron mejores resultado usando MeOH absoluto como extracción, y la composición del medio no afecto la acumulación de flavonoides siendo *K. daigremontiana* la que mostro un valor significativamente mayor (16.0 mg EQ/g DW). Por otra parte, López (2011) utilizando medio de cultivo Murashige y Skoog al 100% adicionado con sacarosa al 3%, 6-bencilaminopurina (BAP) y acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a diferentes concentraciones, encontró que la combinación 1.0 mg/L y 0.5 mg/L respectivamente, promovió la mayor inducción de

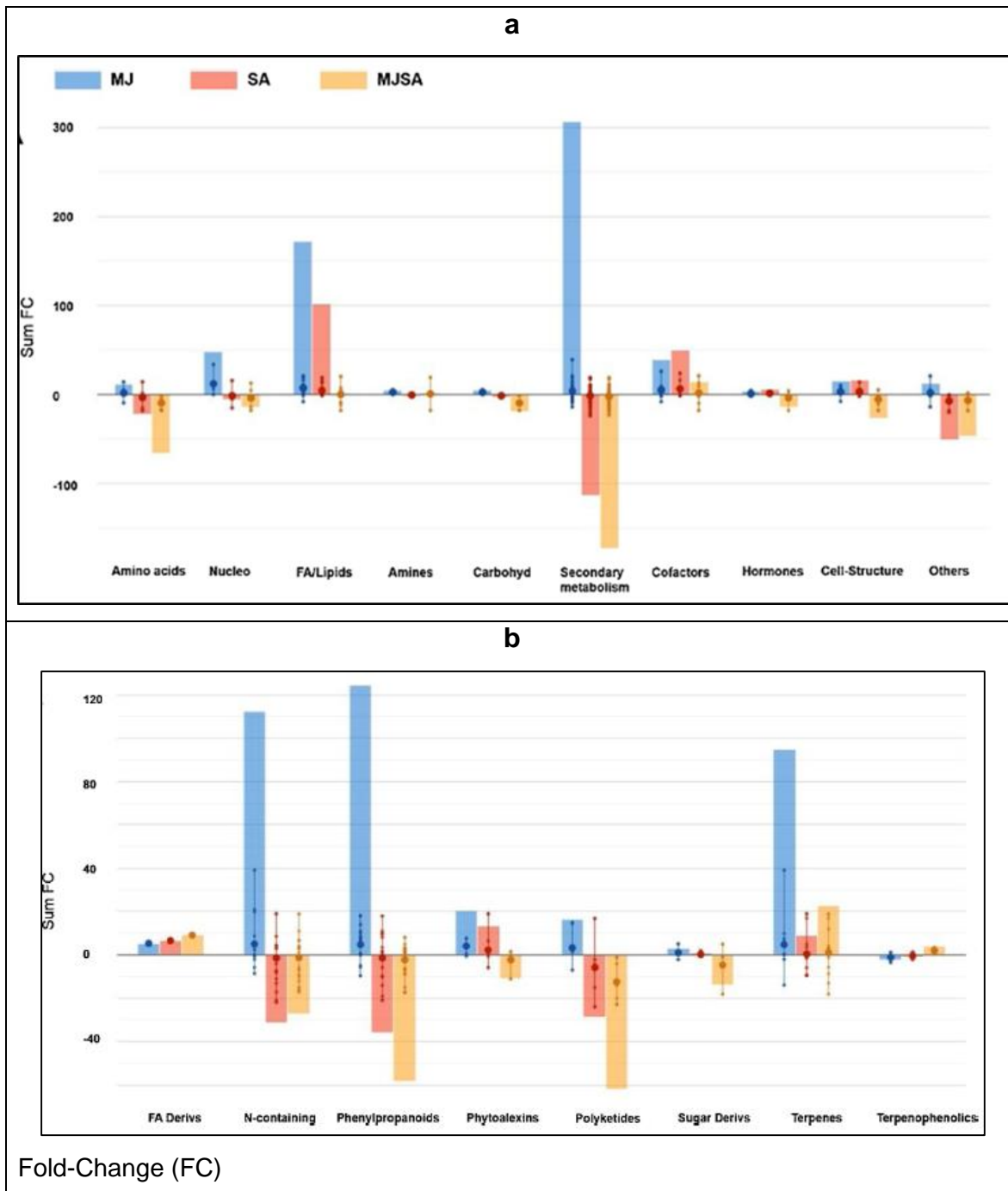
callo en explantes de hoja. Por otro lado, Pérez (2015) re-estableció un cultivo de callo utilizando las condiciones descritas por López (2011), el cual empleó para desarrollar un cultivo en suspensión. Este último cultivo fue estudiado a través del tiempo, realizando un análisis cualitativo de flavonoides y triterpenos.

Recientemente García-Pérez y colaboradores (2021) combinaron el cultivo de células en suspensión y la metabolómica para mostrar el efecto de dos elicitores (MeJa y SA) sobre el potencial biosintético de 3 especies de *Kalanchoe* (*K. daigremontiana*, *K. tubiflorum* y *K. x houghtonii*). Para el establecimiento del cultivo de células en suspensión de las tres especies se probó el medio Murashige y Skoog 100 y 50% suplementado con las combinaciones de (0.5 y 1.0 mg/L) 2,4-D + (0.5, 1.0 y 2.0 mg/L) BAP, eligiendo el medio adecuado para cada especie, siendo la combinación Murashige y Skoog 100% con 0.5 + 1.0 mg/L (2,4-D + BAP) la usada para *K. daigremontiana*, Murashige y Skoog 50% con 0.5 + 1.0 mg/L (2,4-D + BAP) para *K. x houghtonii* y Murashige y Skoog 100% con 1.0 + 0.5 mg/L (2,4-D + BAP) para *K. tubiflorum*, mientras que para la elicitación usaron 0, 50 y 100  $\mu$ M de MeJa y 0, 100, 500 y 1000  $\mu$ M de SA por separado y en combinación. Para el estudio metabolómico se realizó un análisis de los metabolitos de *K. daigremontiana* y *K. x houghtonii* usando un espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) acoplado a un sistema ultra-HPLC, los datos derivados de la metabolómica se analizaron e interpretaron estadísticamente mediante la herramienta de software Mass Profiler Professional el análisis reveló que ambos elicitores (solos o combinados) tuvieron efecto en el metabolismo primario y secundario de los cultivos de células en suspensión de las tres especies, el cual dependió del tipo del elicitador, así como de la especie. Usando corrección de prueba múltiple Benjamini-Hochberg, el análisis reveló que el metabolismo fue estimulado por los elicitores usados, principalmente compuestos fenólicos, compuestos que contienen N y terpenos. En *K. x houghtonii* el uso de MeJa reguló positivamente los compuestos derivados de fenilpropanoides, los glicósidos de antocianidinas, flavonas, flavonoles y las cumarinas. El uso de SA reguló positivamente a un grado menor la biosíntesis de glicósidos de antocianidina, mientras que las flavonas y flavanoles fueron

fuertemente inhibidas. Con el uso de MeJa-SA se obtuvo un efecto sinérgico, estimulando positivamente flavonoles y negativamente las flavonas, antocianinas. Para los compuestos que contienen N, MeJa estimuló positivamente los alcaloides, SA estimuló positivamente los alcaloides en un grado menor, reprimió el 6-(metilsulfanil) hexil-desulfoglucosinolato y glucoiberberina, por otra parte MeJa-SA estimularon positivamente a los alcaloides y negativamente a algunos glucosinolatos alifáticos.

En *K. daigremontiana* el uso de MeJa reguló positivamente el contenido de derivados de ácidos fenólicos, flavonoles, flavonas, isoflavonas, se estimuló negativamente los pterocarpanos y lignanos. Por otra parte, SA estimuló positivamente pero en menor cantidad que MeJa; los flavonoles, las flavonas y algunas isoflavonas, los lignanos se estimularon negativamente. La combinación MeJa-SA estimuló positivamente flavonas, algunas isoflavonas y pterocarpanos, se estimuló negativamente flavonoles y lignanos. Por otra parte, los compuestos que contienen N fueron el segundo grupo que mostró mayor estimulación; MeJa estimuló positivamente la acumulación de alcaloides, alcaloides indólicos, glucosinolatos alifáticos. El SA estimuló positivamente la acumulación de alcaloides, glucosinolatos alifáticos, estimuló negativamente algunos alcaloides de isoquinolina. MeJa-SA mantuvo una sinergia de ambos elicitors en la acumulación de alcaloides. La familia de los terpenoides fue la tercera familia que se estimuló con el uso de elicitors; el MeJa estimuló positivamente saponinas, carotenoides y fitoalexinas, se estimuló de forma negativa los sesquiterpenoides. El SA estimuló positivamente algunas fitoalexinas, mientras que la estimulación negativa se observó en sesquiterpenoides, saponinas y carotenoides. MeJa-SA estimuló de forma positiva saponinas, carotenoides y fitoalexinas, se estimuló de forma negativa la producción de sesquiterpenoides.

En este estudio se observó que el metabolismo está estimulado por el uso de elicitors, donde todos los tratamientos causaron un efecto positivo con respecto al control, en *K. daigremontiana* y el uso de MeJa-SA provocó el mayor efecto seguido de SA y MeJa en tres familias de MS, para *K. x houghtonii* se observó un efecto antagónico entre MeJa y SA (Figura 8).



**Figura 8.** Biosíntesis de los MS con el uso de elicitores MeJa, SA y MeJa-SA en *K. daigremontiana* y *K. x houghtonii*; a) MS estimulados por el uso de elicitores en *K. daigremontiana*, b) MS estimulados por el uso de elicitores en *K. x houghtonii*. (Imagen modificada de Garcia-Perez, 2011)

Además, se observó que ambos elicitores (solos o combinados) tuvieron efecto en la cantidad de biomasa producida por los cultivos de células en suspensión de las tres especies, el cual dependió del tipo y la concentración del elicitador, así como de la especie. En *K. tubiflorum*, únicamente el uso de 500 y 1000  $\mu\text{M}$  de SA disminuyó la biomasa, mientras que la concentración de 100  $\mu\text{M}$  de SA no mostró un efecto en la biomasa, con respecto al control. El uso de MeJa en ambas concentraciones disminuyó la biomasa en casi un 50%. Además, al usar ambos elicitores disminuyó la biomasa en valores menores al 50%. En el caso de *K. x houghtonii* únicamente el uso de 500 y 1000  $\mu\text{M}$  de SA disminuyó la biomasa, mientras que la concentración de 100  $\mu\text{M}$  de SA no mostró un efecto en la biomasa, con respecto al control. Mientras que MeJa 50  $\mu\text{M}$  disminuyó la biomasa respecto al control. Ambos elicitores en todas las concentraciones y combinaciones disminuyeron la biomasa hasta aproximadamente un 70%. En *K. daigremontiana*, el uso de SA en todas las concentraciones disminuyó la cantidad de biomasa con respecto al control, mientras que únicamente MeJa 50  $\mu\text{M}$  incrementó la biomasa. Además, la combinación de ambos elicitores disminuyó más del 50% la biomasa, respecto al control.

### 3. Justificación

El MeJa ha potenciado la producción de flavonoides tipo antocianinas en plantas de *Kalanchoe blossfeldiana*. Cuando MeJa (0.1, 0.5 y 1.0 % p/p) se aplicó alrededor del tallo de plantas jóvenes de *K. blossfeldiana*, causó la acumulación de antocianinas (alrededor de 0.3  $\mu\text{M/g}$  peso fresco contra 0.03  $\mu\text{M/g}$  peso fresco del control) en brotes después de 7 días de tratamiento (Saniewski *et al.* 2003). Por otro lado, al aplicar MeJa en las raíces de *K. blossfeldiana* a concentraciones de 5.0 a 40.0 mg/L, incrementó sustancialmente la acumulación de antocianinas, la cual dependió de la edad de la planta; siendo mayor en raíces de plantas viejas después de 14 días de tratamiento (379.31 mg/g peso fresco contra 74.69  $\mu\text{g/g}$  peso fresco) (Goraj-Koniarska *et al.* 2014). Sin embargo los tiempos de producción y costos se pueden reducir con el uso de métodos biotecnológicos como el CVT que proporcionan una bioproducción prometedora para la obtención de los productos naturales deseados. Además de la producción de metabolitos mediada por el cultivo de células vegetales, también existe la oportunidad de identificar líneas celulares que pueden producir cantidades de compuestos iguales o incluso mayores que las de la planta (Bhatia y Bera, 2015); las muestras vegetativas *in vivo* y cultivos *in vitro* presentan diferentes perfiles de MS, lo que está relacionado con factores genéticos, pero también con condiciones ambientales de crecimiento que conducen a diferentes condiciones de estrés oxidativo y por lo tanto, respuesta disímil en términos de metabolismo secundario. Con respecto a las CVT combinada con la elicitación de *Kalanchoe* se dispone de información muy limitada. Un cultivo de *K. x houghtonii* se sometió a elicitación con ciclodextrinas (García-Pérez, 2019). Los resultados demostraron que solo se necesitaron 7 días para lograr un crecimiento celular estable y producción de compuestos fenólicos.

En particular no se ha cuantificado la producción de compuestos fenólicos en un cultivo de células en suspensión de *K. daigremontiana* establecido y propagado con picloram (PIC) y 6-bencilaminopurina. El CTV es una herramienta importante en aplicaciones biotecnológicas, como la producción de MS y en particular, para *K. daigremontiana* podría representar una estrategia para la producción de compuestos fenólicos.



#### 4. Hipótesis

El contenido de fenoles y flavonoides totales en un extracto de un cultivo celular de *Kalanchoe daigremontiana* se incrementará por el MeJa ya que es una molécula que estimula positivamente las vías biosintéticas del metabolismo secundario.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Establecer un cultivo de células en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana* capaz de producir compuestos fenólicos, incluyendo aquellos de tipo flavonoide.

### 5.2 Objetivos particulares

Establecer un cultivo celular de *Kalanchoe daigremontiana*.

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de metil jasmonato, sobre el contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto del cultivo celular de *Kalanchoe daigremontiana*

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Material vegetal

Se obtuvo planta madre de *K. daigremontiana* de un vivero ubicado en la ciudad de Toluca, Estado de México y se emplearon brotes vegetativos de las hojas, de aproximadamente 0.5 cm de diámetro.

### 6.2 Medio de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo fue el medio Murashige y Skoog al 100%, suplementado con 30 g/L de glucosa. Para formular un medio de cultivo semisólido (empleado en inducción de callo) se suplementó con phytigel al 2%; éste se omite en la formulación de medio líquido. Para la inducción de callo, se agregó al medio de cultivo una combinación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) citocinina 6-bencilaminopurina (BAP) 1mg/L combinada con picloram (PIC) 0.1 mg/L. Los explantes se incubaron por 30 días. Todos los cultivos se incubaron bajo luz fluorescente blanca a 16/8 horas luz/oscuridad y a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; además, los cultivos en suspensión se colocaron en un agitador orbital a 110 rpm.

#### 6.2.1 Inducción de callo y establecimiento de cultivos de células en suspensión

Los cultivos celulares en medio líquido se establecieron a partir de callo friable procedente de cultivos obtenidos en medio semisólido. Se pesaron 1.5 g y se sembraron en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo líquido. Para proliferar el callo en medio semisólido y medio líquido se realizaron subcultivos cada 17 días.

### 6.3 Elicitación con MeJa.

La biomasa proliferada de células en suspensión (17 días) se trató con MeJa (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones (0, 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ ) e

incubando por 24 h Posteriormente se cosechó la biomasa por filtración al vacío. Cada tratamiento consistió de 3 unidades experimentales y se realizó por triplicado.

### 6.3.1 Obtención de extractos

La biomasa filtrada se secó (en estufa a 60°C durante 48 horas), se pesó y pulverizó. Posteriormente la biomasa se extrajo con metanol (MeOH) (100 mg de biomasa seca / 100 mL de MeOH) por 20 min en un ultrasonificador (SSLA-950W). El extracto se filtró y posteriormente se concentró a un volumen final de 10 mL en un rotaevaporador (Buchi) acoplado a una bomba de vacío; el extracto concentrado se empleó en el análisis fitoquímico.

### 6.4 Análisis fitoquímico

Se determinó el contenido de fenoles totales (CFT) empleando el método Folín-Ciocalteau (Singleton *et al.*, 1999), flavonoides totales (CFvT) por el método descrito por Woisky y Salatino (1998). En CFT se empleó ácido gálico como estándar para elaborar curva patrón ( $y=10.196x + 0.0184$ ;  $R^2 = 0.9988$ ) con concentraciones de 0.1 a 0.0008 mg/L, mientras que en CFvT se empleó quercitina como estándar para elaborar curva patrón ( $y= 41.355x - 0.0097$  y  $R^2= 0.9945$ ) en concentraciones de 0.006 a 0.0004 mg/L. Los resultados del CFT se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa seca (mg EGA/g), mientras que los resultados del CFvT se expresaron como mg equivalentes de quercitina por gramo de biomasa seca (mg EQ/g). Cada muestra de extracto se procesó por duplicado.

### 6.5 Análisis estadístico

Se empleó el software NCSS 12 para realizar análisis estadístico (cuadrado latino). Se realizó un análisis de varianza; una vez obtenida la normalidad de los datos y homogeneidad de varianza se realizó la prueba ANOVA para la comparación múltiple de medias sobre el CFT y CFvT, bajó un 5 % de nivel de significancia.

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Establecimiento de cultivos de callo y de células suspensión

La combinación de los RCV PIC 0.1 mg/L y BAP 1.0 mg/L promovió la formación de callo en explantes de hoja, después de 30 días de incubación. El callo formado era friable de color blanco-verdoso y apareció en los bordes de los explantes (Figura 9a). Dicho callo al subcultivarse mantuvo sus características durante 8 ciclos de subcultivo (Figura 9b). El callo mantenido para subcultivo al transferirse a matraces con medio líquido se disgregó y mantuvo una coloración más uniforme (Figura 9c). Los efectos de distintos tipos de RCV y de concentraciones en brotes de *K. daigremontiana* para establecer un cultivo de callos ha sido previamente reportado Mejía-Sánchez et al., 2016 probaron que la combinación de 2,4-D + BAP a distintas concentraciones ((0+0, 0.0+0.5, 0.5+0.5, 0.5+1 y 0+2.4 mg/L respectivamente) promovieron distintas respuestas; el uso de BAP 2.0 mg/L promovió la producción de brotes, mientras que las combinaciones 0.5+0.5 y 0.5+1.0 de 2,4- D y BAP respectivamente promovieron la formación de callo, estas últimas combinaciones se consideran una alternativa para establecer una línea celular capaz de producir distintos tipos MS. Los RCV juegan un papel esencial en la determinación de la vía de desarrollo y metabolismo de las células y tejidos cultivadas *in vitro* (Sagare et al., 2000).

En 2018, Mejía-Sánchez et al. establecieron una línea celular en suspensión de *K. daigremontiana* adicionada con 2,4-D 0.5 mg/L y BAP 1 mg/L, la cual fue capaz de producir compuestos fenólicos ( $1.43 \pm 0.12$  mg EAG/g) y en callo fresco de *K. pinnata* se reportaron 0.59 mg EAG/ g (Romero-Calvache, 2017), observándose una mejor producción de compuestos fenólicos en la línea celular de *K. daigremontiana*. No obstante, se observó que después de 10 subcultivos en *K. daigremontiana* el crecimiento del callo y su morfología se vio afectado, ya que cambió de coloración y se incrementó la necrosis celular. Ozeki y Komamine (1986) reportaron que las auxinas son reguladores de crecimiento vegetal que inhibieron la síntesis de antocianinas en cultivo en suspensión de zanahoria, siendo el 2,4-D la auxina que

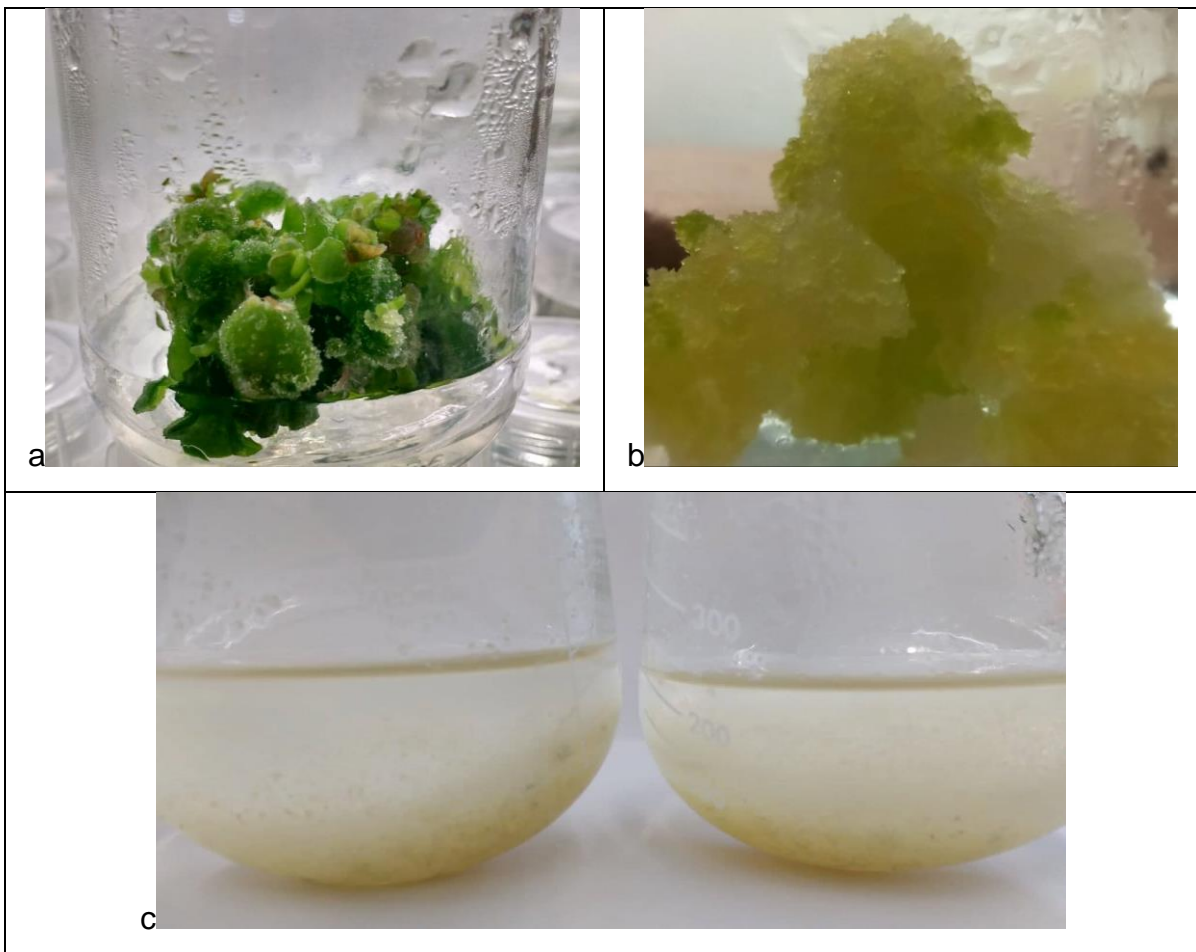
mostró el mayor efecto inhibitorio de antocianinas, incluso observaron degradación de estas, además al estar presente el 2,4-D mostró un buen crecimiento indiferenciado ya que existe una correlación inversa con la síntesis de antocianinas y el crecimiento indiferenciado. Al conocer esta información se realizó un estudio para comparar la respuesta a distintas auxinas y como alternativa para la inducción de callo en *K. daigremontiana* por lo que se probaron distintas concentraciones (0.5-5 mg/L) y combinaciones de IBA (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido 1-naftalenacético) y PIC con BAP. Con el uso de IBA se obtuvo una desdiferenciación lenta y presencia de raíces adventicias desarrolladas en los bordes de las hojas, además de necrosis en gran parte del explante. El uso de ANA provocó una elongación en los explantes sin desdiferenciación, pero con necrosis en el 50% de los explantes; el uso de 0.5 mg/L de ANA + 1.0 BAP propició el desarrollo de microbrotes en las hojas de los explantes, sin embargo, en ningún tratamiento probado se observó un callo friable. El uso de PIC en general estimuló la desdiferenciación, en algunos casos (1.0 mg/L PIC + 1.0 mg/L BAP) permitió el desarrollo de raíces adventicias, sin embargo el uso de 0.1 + 1.0 mg/L (PIC + BAP) fue el que presentó una desdiferenciación del 100%, desdiferenciación que solo se había observado con el uso de 2,4-D, se desarrolló un callo friable (blanco-verdoso) además se obtuvo buen crecimiento de callo; después de 10 subcultivos se mantuvo el crecimiento de este. Además que no hubo cambio en la conformación del callo por lo que se eligió como alternativa para la inducción y mantenimiento de la línea celular de *K. daigremontiana* para realizar los estudios de elicitación y determinar su capacidad para producir compuestos fenólicos.

López (2011) utilizando BAP 1.0 mg/L y 2,4-D 0.5 mg/L encontró que se promovió la mayor inducción de callo en explantes de hoja. Garcia-Perez y colaboradores (2021) para el establecimiento del cultivo de células en suspensión de *K. daigremontiana*, *K. tubiflorum* y *K. x houghtonii* usaron 0.5+1.0, 0.5+1.0 y 1.0+0.5 (mg/L) de 2,4-D + BAP respectivamente. 2,4-D es la auxina sintética más usada para la obtención de callo, por su potencial para revertir el metabolismo celular a un estado desdiferenciado (George *et al.*, 2008). El callo obtenido de la combinación de PIC + BAP en el presente trabajo, presentó una producción de compuestos

fenólicos (3.47 mg EAG/g (control)), mientras que Mejía-Sánchez (2018) reportó  $1.43 \pm 0.12$  mg EAG/g con el uso de 2,4-D, así con el uso de picloram se obtuvo una línea celular capaz de producir compuestos fenólicos. Picloram se ha reportado como una de las auxinas sintéticas con mayor similitud en su efecto con el 2,4-D, como fuente de auxina en cultivos de tejidos de varias especies, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, pero su valor principal ha sido que es eficaz a concentraciones inferiores que las del 2,4-D, disminuyendo la inhibición de la clorofila y la represión de la regeneración que a menudo se observa con 2,4-D (Beyl y Sharma 1983; Colins *et al.*, 1978), esta última ha sido la mayor causa en el uso de picloram por 2,4-D ya que se ha reportado que la regeneración de cultivos derivados de medios con picloram es más eficaz que el medio que contienen 2,4-D (Barro *et al.*, 1999). Por otra parte, Fitch y Moore (1990) determinaron la utilidad de picloram para el mantenimiento de cultivos de tejidos totipotentes para cultivares de caña (*Saccharum* spp. Híbrido y *Saccharum spontaneum* L.), se probó (0.0 – 3.0 mg/L) picloram y 2,4-D, se observó que la proporción de tipos de tejido cambió en función del tiempo, el cultivo, genotipo, cantidad y tipo de auxina. El callo verde en los medios picloram siempre se regeneran plantas verdes, nueve híbridos y diez parientes silvestres de la caña de azúcar produjeron callos verdes, mientras que sólo tres híbridos se cultivaron como callos verdes en medios 2,4-D en cultivo a largo plazo. Los callos verdes fueron inoculados en medio líquido MS con 0.5 mg/L de picloram para cultivo en suspensión. Estos cultivos fueron totipotentes después de 19 meses, aunque el picloram promovió el crecimiento de los callos, la iniciación de los mismos no fue tan rápida como con el 2,4-D. El uso de picloram representa una alternativa para el cultivo de callos friables y su posterior regeneración, además de que en algunas investigaciones se han establecido cultivos de células en suspensión. Farjaminezhad y Garoosi en 2017 probaron el efecto de 2,4-D, PIC, ANA (0.0, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/L) combinado con BAP y kinetina (0.0, 1.0 y 2.0 mg/L) en medio Murashige y Skoog de explantes de *Azadirachta indica*, además evaluaron la acumulación y producción de azadiractina, la mejor inducción y crecimiento de callos se obtuvo en un medio MS que contenía 1.5 mg/L de ANA y 3 mg/L de kinetina, el callo friable y con mayor porcentaje de callosidad (100%) se obtuvo con

los reguladores PIC + kinetina (1.0+2.0 mg/L), el medio suplementado con 1 mg/L de PIC y 2 mg/L de kinetina produjo la mayor cantidad de peso de biomasa fresca (493.02 g/L), peso de biomasa seca (77.27 g/L), acumulación de azadiractina (3.69 mg/g DW), y producción de azadiractina (285.64 mg/L).

Las auxinas y citoquininas se han utilizado ampliamente para generar callos, pero se sabe poco sobre cómo inducen callos a nivel molecular (Feher, 2019). En general, la inestabilidad genética es inherente en los cultivos *in vitro*; sin embargo, el método involucrado en la multiplicación determina la incidencia de variación somaclonal por lo que el papel de las hormonas exógenas va más allá de los rasgos fenotípicos y, en consecuencia, es obligatorio lograr un adecuado equilibrio fitohormonal para cada genotipo para lograr protocolos eficientes de cultivo de tejidos vegetales (Thorat *et al.*, 2018; Gallego *et al.*, 2011)





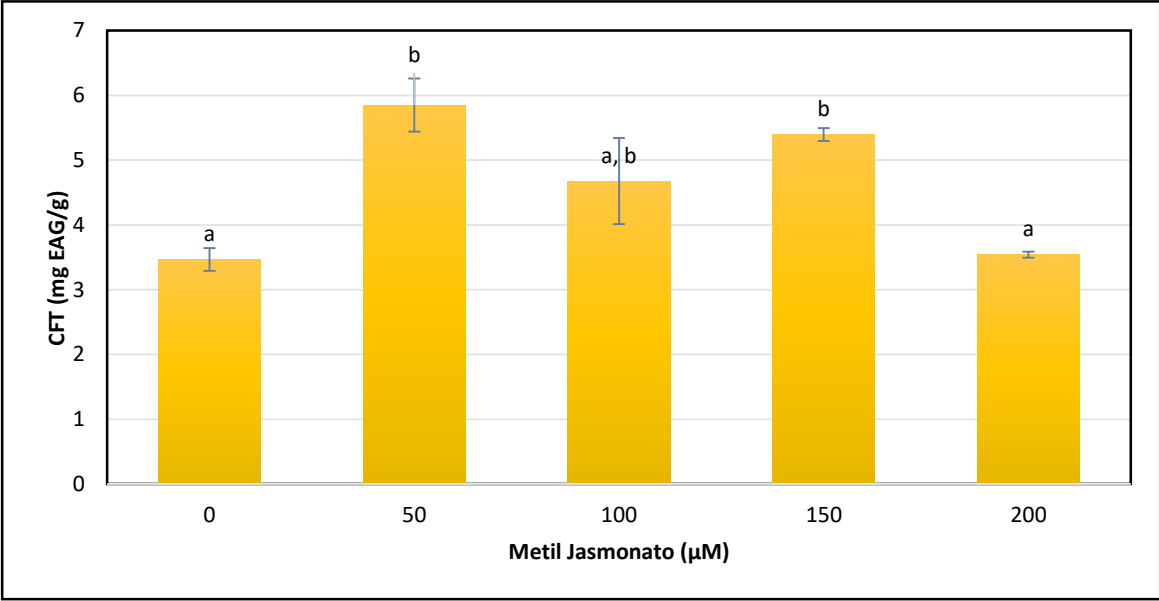
**Figura 9.** Callo formado con la combinación de PIC 0.1 y BAP 1.0 mg/L. a) callo friable en los bordes de los explantes de *K. daigremontiana*, b) callo con 8 subcultivos en medio semisólido, c) callo transferido a medio líquido.

## 7.2 Efecto del MeJa sobre la producción de compuestos fenólicos

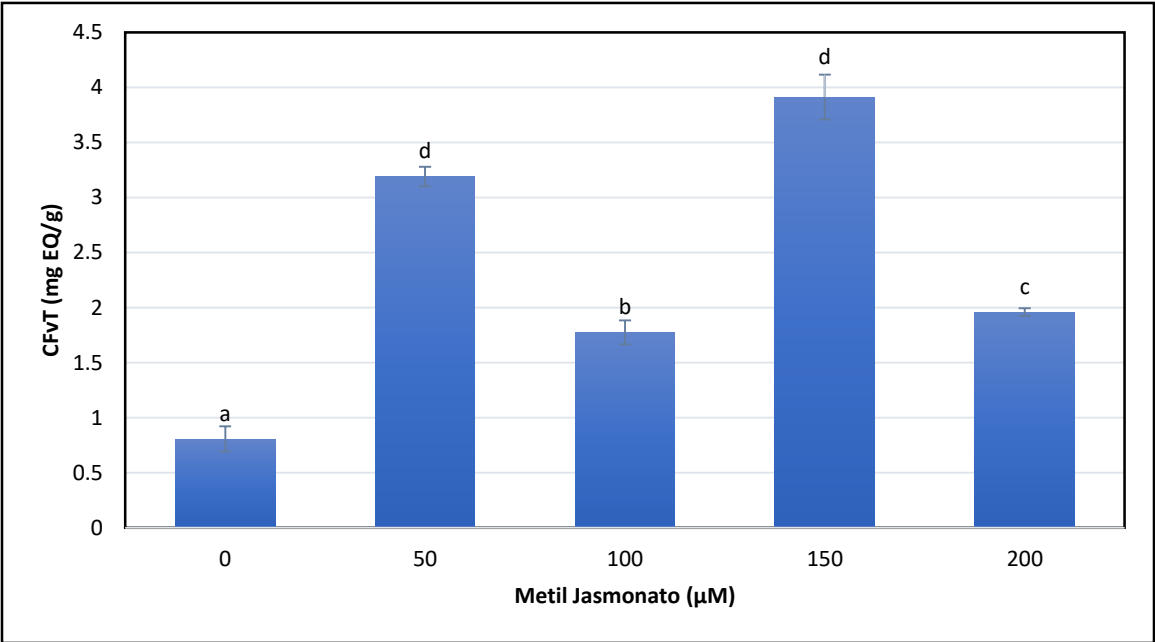
Únicamente MeJa a la concentración de 50 y 150  $\mu\text{M}$  incrementó de manera significativa el contenido de fenoles totales en las células de *K. daigremontiana* (Figura 10a), mientras que el contenido de flavonoides incrementó en todas las concentraciones probadas, siendo significativamente mayor en la concentración de 150  $\mu\text{M}$  (Figura 10b). El valor de  $p=.0045 < .05$  por lo que existen diferencias significativas. Se ha reportado que MeJa cuando se aplica de manera exógena para cultivos de células vegetales (100 a 200  $\mu\text{M}$ ) estimula positivamente las vías biosintéticas secundarias de estas últimas, produciendo terpenoides, flavonoides, alcaloides y fenilpropanoides (Uppalapati *et al.*, 2005; Rischer *et al.*, 2006; Wasternack y Hause, 2007). Garcia-Perez y colaboradores (2021) con el uso de técnicas de metabolómica en combinación de la técnica de elicitación lograron identificar las familias de metabolitos que son afectadas con el uso de dos elicitores (MeJa y SA) en dos especies de *Kalanchoe* (*K. daigremontiana* y *K. x houghtonii*). El uso de distintos elicitores presenta cambios en los grupos de MS sin embargo, hay variabilidad en la respuesta, en el caso de los compuestos fenólicos, las flavonas fueron las principalmente y positivamente afectadas, entre ellas el Kaempferol que es de los reportados en la especie. La actividad del Kaempferol (Tabla 2) ha sido ampliamente estudiada, principalmente sus actividades; antiinflamatoria, antitumoral y antioxidante. Sin embargo, siguen faltando estudios de cuantificación ya que el uso de distintas concentraciones del elicitor podría tener un efecto distinto en grupos específicos de MS. Los terpenoides son un grupo importante identificado en la especie de estudio, se observó un efecto positivo en este grupo en específico usando MeJa, seguido por MeJa-SA, así el presente estudio podría ayudar a ampliar la investigación tanto en compuestos fenólicos como algunos otros MS como los terpenoides que ampliamente se encuentran identificados en *K. daigremontiana* (Tabla 1), como los bufadienolidos

(Kalanchosides) que presentan en general actividad citotóxica (Tabla 2) en el rango de los nano gramos (Wu *et al.*, 2006). Estos reportes, demuestran que la aplicación eficaz de MeJa requiere estudios para encontrar la dosis para producir la mayor cantidad de metabolitos secundarios (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016).

a)



b)



**Figura 10.** Promedio y desviación estándar de los compuestos fenólicos y flavonoides totales usando distintas concentraciones de MeJa a) CFT b) CFvT. (a, b, c y d; representan grupos de medias, los grupos que contienen la misma letra no son estadísticamente diferentes)

Sun y colaboradores en 2016 investigaron el efecto de MeJa, ácido abscísico y su combinación en el metabolismo de callo de *Malus sieversii f. niedzwetzkyana*; mostraron que el MeJa promovió la acumulación de antocianinas al usar concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  mol/L, siendo la concentración  $10^{-3}$  mol/L la que incrementó a 1.4 veces respecto al control. El ácido abscísico (6  $\mu$ M/L) inhibió significativamente la biosíntesis de antocianinas en todos los tratamientos sin embargo la respuesta a los elicitores depende del tipo y concentración de estos, la especie vegetal y el tipo de cultivo. Por otra parte Mendoza y colaboradores (2018) probaron el efecto del SA (100, 300 y 600  $\mu$ M) y MeJa (1, 3, 5  $\mu$ M) sobre la producción de compuestos fenólicos en un cultivo de células en suspensión de *Thevetia peruviana*, a distintos tiempos de elicitación en cultivo (0, 24, 72, 96, 120 horas.) se observó el mayor incremento de compuestos fenólicos usando MeJa con respecto al control, este resultado fue a 3  $\mu$ M después de 24 h (4.4 mg EAG/g DW) y 96 h (4.2 mg EAG/g DW), sin embargo para SA el mayor incremento fue después de 24 h usando 300  $\mu$ M (5.983 mg EAG/g DW). El más alto nivel de flavonoides se observó después de 72 h con 3  $\mu$ M de MeJa (6.88 EQ/g DW). En el presente trabajo el uso de MeJa 50 y 150  $\mu$ M incrementó la concentración de CFT 3.29 y 3.875 veces respectivamente más con respecto al control, lo que representa una alternativa viable como propuesta de producción de compuestos fenólicos, sin embargo se podría ampliar el rango de concentraciones, además de probar distintos tiempos de elicitación; para potenciar aún más la producción de compuestos fenólicos además de que este tipo de investigaciones podrían ayudar a conocer mejor los mecanismos de acción de los elicitores. Además al compararse con un sistema de elicitación *in vivo* (Goraj-Koniarska *et al.* 2014) donde MeJa aplicado en las raíces de *K. blossfeldiana* a concentraciones de 5.0 a 40.0 mg/L, incrementó sustancialmente la acumulación de antocianinas, la cual dependió de la edad de la planta; siendo mayor en raíces de plantas viejas después de 14 días de tratamiento (379.31 mg/g peso

fresco contra 74.69  $\mu\text{g/g}$  peso fresco. El sistema *in vivo* se reporta una gran diferencia de acumulación de compuestos con respecto a nuestro sistema como se ha reportado, cabe mencionar que la producción de MS varía entre especies además está relacionado con factores genéticos, con condiciones ambientales de crecimiento que conducen a diferentes condiciones de estrés oxidativo. Así como la edad del cultivo es un parámetro importante en la producción de compuestos bioactivos por elicitación (Naik y Al-Khayri, 2016).

El mecanismo exacto de los elicitores bióticos y abióticos en la producción de MS en las plantas, es poco conocido. Se han planteado diversos mecanismos a este respecto como el mensajero de  $\text{Ca}^{2+}$ , los factores que afectan la integridad de la membrana celular, la inhibición/activación de las vías intracelulares y los cambios en el estrés osmótico, etc. (Kayser y Quax, 2006; Namdeo, 2007). La respuesta de las plantas al estrés inducido por el inductor usualmente comienza en la membrana celular. Aunque hay varios receptores en el citosol, asociados tanto con el núcleo como con la membrana citosólica. Se han identificado varios sitios de unión al elicitador en las membranas plasmáticas celulares para una variedad de elicitores de diferentes estructuras químicas. La transducción de la señal del inductor, percibida por los receptores, conlleva la acción de segundos mensajeros que amplifican aún más la señal para otras reacciones posteriores. Los eventos que ocurren secuencialmente en las respuestas inducidas por el inductor se pueden resumir como: la percepción del elicitador por el receptor; fosforilación y desfosforilación reversibles de proteínas de membrana plasmática y proteínas citosólicas; realce citosólico [ $\text{Ca}^{2+}$ ]; flujo de salida de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+ / \text{H}^+$ ; alcalinización extracelular y acidificación citoplásmica; activación de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK); activación de la NADPH oxidasa y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente); expresión temprana de genes de defensa; producción de jasmonato; la expresión de genes de respuesta de defensa tardía y la acumulación de MS (Ramírez-Estrada *et al.*, 2016).

El uso de MeJa en un cultivo *in vitro* en suspensión es una alternativa para la incrementar la producción de CFT ya que estos últimos como se ha mencionado (Figura 2) están dentro de la clasificación de MS producidos en el metabolismo secundario de las plantas y se ha demostrado tienen distintas actividades biológicas (Tabla 2). Dentro de los compuestos fenólicos podemos encontrar los ácidos fenólicos que se encuentran presentes en *Kalanchoe* y se han estudiado en distintos modelos vegetales. Bogucka-Kocka y colaboradores en 2018 estudiaron el contenido de ácidos fenólicos, la capacidad antioxidante y citotóxica de extractos de hojas de cuatro especies diferentes de *Kalanchoe* (*K. daigremontiana*, *K. pinnata*, *K. milloti* y *K. nyikae*). Solo el extracto de *K. pinnata* mostró una alta citotoxicidad contra la línea de células T humanas H-9 ( $IC_{50} = 116 \mu\text{g/mL}$ ). Otros extractos (*K. daigremontiana*, *Kalanchoe milloti*, *K. nyikae*) mostraron una citotoxicidad más pronunciada hacia las células J45.01 (células T de leucemia linfoblástica aguda humana), aunque todos los extractos dependen de la dosis en las líneas celulares, encontraron una correlación positiva entre la actividad antioxidante y citotóxica en las fracciones de *K. pinnata*, además mostraron que *K. daigremontiana* contenía la mayor cantidad de ácidos fenólicos ( $124 \mu\text{g/g}$  de peso seco), (ácido gálico [ $\mu\text{g/g}$  DW]  $0.9 \pm 0.12$  *K. daigremontiana* macerada y  $1.1 \pm 0.07$  *K. daigremontiana* ASE (Accelerated solvent extraction)), en el presente trabajo se obtuvo una concentración de  $5.8 \text{ mg EAG/g}$  de CFT con el uso del elicitador MeJa ( $50 \mu\text{M}$ ) por lo que podría considerarse una alternativa para obtener compuestos que presentan actividad antioxidante y citotóxica contra distintas líneas celulares de cáncer, por lo que para posteriores estudios se podría probar el extracto y su actividad además de identificar los compuestos presentes de manera mayoritaria.

## 8. Conclusiones

- Se logró establecer un cultivo celular en suspensión de *K. daigremontiana*, usando la concentración de 0.1 mg/L Picloram y 1.0 mg/L de BA en medio Murashige and Skoog al 100%
- La línea celular de *K. daigremontiana* establecida fue capaz de producir compuestos fenólicos incluidos los de tipo flavonoide
- La elicitación con MeJa incremento la producción de compuestos fenólicos incluyendo los tipos flavonoide.
- El uso de herramientas biotecnológicas en conjunto con el CVT y la elicitación incrementan la producción de MS de interés medicinal y con tiempos de producción más bajos que sistemas *in vivo*, donde se han usado plantas jóvenes de 12 a 14 meses (Goraj-Koniarska *et al.* 2014)

## 9. Perspectivas

- Realizar estudios usando técnicas analíticas (cromatografía de gases, HPLC) para identificar los compuestos que se están elicitando dentro del sistema establecido.
- Caracterización morfológica de los cultivos *in vitro*.
- Evaluar distintos medios de cultivo y modificaciones en macro y micro nutrientes para incrementar la producción de MS.
- Evaluar distintos elicitores tanto bióticos como abióticos para potenciar la producción de MS.
- Realizar estudios de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de los extractos elicitados.

## 10. Referencias

- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D. y Mukhtar, H. (2005). Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates mapk and nf-kappab pathways and inhibits skin tumorigenesis in cd-1 mice. *International Journal of Cancer*, 113, 423–433.
- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M.Z., Amjad, M., Sadaf, H., Riaz, I., Sabir, S., Ahmad, N. y Sabaoon, (2017). Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6, 205-214.
- Aisyah, L.S., Yun, Y.F., Herlina, T., Julaeha, E., Zainuddin, A., Nurfarida, I. y Shiono, Y. (2017). Flavonoid compounds from the leaves of *Kalanchoe prolifera* and their cytotoxic activity against p-388 murine leukimia cells. *Natural Product Sciences*, 23(2), 139.
- Akinpelu, D.A. (2000). Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Fitoterapia*, 71(2), 193–194.
- Anand-David, A.V., Arulmoli, R. y Parasuraman, S. (2016). Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn Reviews*, 10(20), 84-89.
- Anisimov, M.M., Gerasimenko, N.I., Chaikina, E.L. y Serebryakov, Y.M. (2009). Biological activity of metabolites of the herb *Kalanchoe diagremoniana* (Hamet de la Bathie) Jacobs et Perr. *Biology Bulletin*, 36(6), 568–574.
- Balandrin, M., Klocke, J., Wurtele, E. y Bollinger, W. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228(4704), 1154–1160.
- Baldwin, J.T. (1938). *Kalanchoe*: The genus and its chromosomes. *American Journal of Botany*, 25(8), 572.
- Barro, F., Martin, A., Lazzeri, P.A. y Barceló, P. (1999). Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature



inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum. *Euphytica*, 108(3), 161–167.

- Bhalsingh, S.B. y Maheshwari, V.L. (1998). Plant tissue culture-a potential source of medicinal compounds. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 57, 703-708.
- Bhatia, S. y Bera, T. (2015). Classical and nonclassical techniques for secondary metabolite production in plant cell culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 231-291.
- Beckett, K.A. (1990). *The Australian and New Zealand encyclopedia of house plants*. Simon and Schuster, Australia. 1, 312-314.
- Beyl, C.A. y Sharma, G.C. (1983). Picloram induced somatic embryogenesis in *Gasteria* and *Haworthia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2(2), 123-132.
- Bogucka-Kocka, A., Zidorn, C., Kasprzycka, M., Szymczak, G. y Szewczyk, K. (2018). Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 622-630.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. y Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839-851.
- Chernetsky, M., Woźniak, A., Skalska-Kamińska, A., Żuraw, B., Blicharska, E., Rejda, R., Donica, H. y Weryszko-Chmielewska, E. (2019). Structure of leaves and phenolic acids in *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 17(4), 137-155.
- Chittenden, F.J. (1951) *Dictionary of gardening: A practical and scientific encyclopedia of horticulture*. Oxford: Clarendon Press, 1-3.
- Chomel, M., Guittouy-Larchevêque, M., Fernandez, C., Gallet, C., DesRochers, A., Paré, D. y Baldy, V. (2016). Plant secondary metabolites: a key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *Journal of Ecology*, 104(6), 1527–1541.

- Collins, G.B., Vian, W.E. y Phillips, G.C. (1978) Use of 4-amino-3, 5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissues. *Crop Science*, 18, 286-288.
- Costa, S.S., Jossang, A., Bodo, B., Souza, M.L.M. y Moraes, V.L.G. (1994). Patuletin acetylramnosides from *Kalanchoe brasiliensis* as inhibitors of human lymphocyte proliferative activity. *Journal of Natural Products*, 57(11), 1503-1510.
- Costa, S.S., Jossang, A. y Bodo, B. (1996). 4'''- Acetylsagittatin A, a kaempferol triglycoside from *Kalanchoe streptantha*. *Journal of Natural Product*, 59, 327-329.
- Costa, E., Cosme, F., Jordão, A. M. y Mendes-Faia, A. (2014). Anthocyanin profile and antioxidant activity from 24 grape varieties cultivated in two Portuguese wine regions. *OENO One*, 48(1), 51–62.
- Cruz, E.A., Da Silva, S.A., Muzitano, M.F., Silva, P.M., Costa, S.S. y Rossi-Bergmann, B. (2008). Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immunopharmacol*, 8(12), 1616-21.
- Da Silva, S.A.G., Costa, S.S., Mendonça, S.C.F., Silva, E.M., Moraes, V.L. G. y Rossi-Bergmann, B. (1995). Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*, 60(3), 201-210.
- Descoings, B. (2003). *Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae*. In *Kalanchoe* (ed. U Eggli), pp. 143–180. Springer- Verlag.
- Dörnenburg, H. y Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8), 674-684.
- Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A. y García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18.
- Farjaminezhad, R. y Garoosi, G.A. (2019). New biological trends on cell and callus growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica*. *3 Biotech*, 9(8), 309.

- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontier in Plant Science*, 10, 536.
- Fitch, M.M.M. y Moore, P.H. (1990). Comparison of 2,4-D and picloram for selection of long-term totipotent green callus cultures of sugarcane. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 20, 157-163.
- Gaiko, K.N., Singla, A.K. y Boar, R.B. (1976). Triterpenoids and sterols of *Kalanchoe spathulata*. *Phytochemistry*, 15, 1999-2000.
- Gaiind, K. N., Singla, A. K. y Wallace, J. W. (1981). Flavonoid glycosides of *Kalanchoe spathulata*. *Phytochemistry*, 20(3), 530–531.
- Gallego, P.P., Gago, J. y Landin, M. (2011). Artificial neural networks technology to model and predict plant biology process. *Methodological Advances and Biomedical Applications*. (Suzuki, K., Ed.), pp 197-216, IntechOpen: Rijeka.
- Garces, H. y Sinha, N. (2009). The “Mother of thousands” (*Kalanchoe daigremontiana*): A plant model for asexual reproduction and cam studies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(10).
- García-Pérez, P., Barreal, M.E., Rojo-De Dios, L., Cameselle-Teijeiro, J.F. y Gallego, P.P. (2018). Bioactive natural products from the genus *Kalanchoe* as cancer chemopreventive agents: A review. *Studies in Natural Products Chemistry*, 49–84.
- García-Pérez, P., Losada-Barreiro, S., Gallego, P.P. y Bravo-Díaz, C. (2019). Cyclodextrin-elicited *Bryophyllum* suspension cultured cells: Enhancement of the production of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5180.
- García-Pérez, P., Lozano-Milo, E., Landín, M. y Gallego, P.P. (2020). Machine learning technology reveals the concealed interactions of phytohormones on medicinal plant in vitro organogenesis. *Biomolecules*, 10(5), 746.
- García-Pérez, P., Lucini, L. y Gallego, P. P. (2021). The metabolomics reveals intraspecies variability of bioactive compounds in elicited suspension

cell cultures of three *Bryophyllum* species. *Industrial Crops and Products*, 163, 113322-113322.

- Gehrig, H., Gaußmann, O., Marx, H., Schwarzott, D. y Kluge, M. (2001). Molecular phylogeny of the genus *Kalanchoe* (Crassulaceae) inferred from nucleotide sequences of the ITS-1 and ITS-2 regions. *Plant Science*, 160(5), 827–835.
- George, E.F., Hall, M.A. y De Klerk, G.J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Ed., Springer Dordrecht, Netherlands.
- Gonçalves, S. y Romano, A. (2018). Production of plant secondary metabolites by using biotechnological tools. *Secondary Metabolites - Sources and Applications*.
- Góraj-Koniarska, J., Stochmal, A., Oleszek, W., Moldoch, J. y Saniewski, M. (2015). Elicitation of anthocyanin production in roots of *Kalanchoe blossfeldiana* by methyl jasmonate. *Acta Biologica Cracoviensia S. Botanica*, 57(1), 141–148.
- Goyal, P., Jain, N., Panwar, N.S., Singh, G.K. y Nagori, B.P. (2013). Hypoglycemic and antidiabetic activities of ethanol extracts of *Kalanchoe pinnata* leaves in streptozocin-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmacology and Toxicology Sci.* 3, 9-18.
- Guo, J., Liu, H., He, Y., Cui, X., Du, X. y Zhu, J. (2014). Origination of asexual plantlets in three species of Crassulaceae. *Protoplasma*, 252(2), 591–603.
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H. y Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: Current status and opportunities. *Recent advances in plant in vitro culture*.
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M.P., Rajasekharan, P.E., Zafar, N. y Frukh, A. (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: Strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 265, 132-239.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S. y Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9, 26–38.

- Jiang, H., Wu, D., Xu, D., Yu, H., Zhao, Z., Ma, D. y Jin, J. (2017). Eupafolin exhibits potent anti-angiogenic and antitumor activity in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Biological Sciences*, 13(6), 701–711.
- Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R. y He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 1222-1239.
- Kayser O. y Quax W.J. (2006). *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications*. Germany, Wiley-VCH
- Kluge, M., Brulfert, J., Ravelomanana, D., Lipp, J. y Ziegler, H. (1991). Crassulacean acid metabolism in *Kalanchoes* species collected in various climatic zones of Madagascar: a survey by <sup>13</sup>C analysis. *Oecologia*, 88(3), 407–414.
- Kluge, M. y Brulfert, J. (1996). Crassulacean Acid metabolism in the genus *Kalanchoe*: Ecological, Physiological and biochemical aspects, in: K. Winter, J.A.C. Smith (Eds.), *Crassulacean Acid Metabolism. Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*, Ecological St vol 114.
- Ko, H.H., Chiang, Y.C., Tsai, M.H., Liang, C.J., Hsu, L.F., Li, S.Y. y Lee, C.W. (2014). Eupafolin, a skin whitening flavonoid isolated from *Phyllanthus nodiflorus*, downregulated melanogenesis: Role of MAPK and Akt pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 386–393.
- Kolodziejczyk-Czepas, J. y Stochmal, A. (2017). Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochemistry Reviews*, 16(6), 1155-1171.
- Kukuia, K. K. E., Asiedu-Gyekye, I. J., Woode, E., Biney, R. P. y Addae, E. (2015). Phytotherapy of experimental depression: *Kalanchoe integra* Var. *Crenata* (Andr.) Cuf, Leaf Extract. *Journal of Pharmacy & Bioallied*, 7(1), 26–31.

- Liang, T., Guan, R., Wang, Z., Shen, H., Xia, Q. y Liu, M. (2017). Comparison of anticancer activity and antioxidant activity between cyanidin-3-O-glucoside liposomes and cyanidin-3-O-glucoside in Caco-2 cells in vitro. *RSC Advances*, 7(59), 37359–37368.
- Lin, B.W., Gong, C.C., Song, H.F. y Cui, Y.Y. (2017). Effects of anthocyanins on the prevention and treatment of cancer. *British Journal of Pharmacology*, 174, 1226–1243.
- Liu, K.C.S., Yang, S.L., Roberts, M.F. y Phillipson, J.D. (1989). Eupafolin rhamnosides from *Kalanchoe gracilis*. *Journal of Natural Products*, 52(5), 970–974.
- Liu, Y., Murakami, N., Ji, H., Abreu, P. y Zhang, S. (2007). Antimalarial flavonol glycosides from *Euphorbia hirta*. *Pharmaceutical Biology*, 45(4), 278–281.
- López, D. (2011). Análisis del RNA del gen que codifica para la enzima escualeno sintasa (sq5) en cultivo de células de *Kalanchoe daigremontiana*. [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias en desarrollo de productos bióticos]. Instituto Politécnico Nacional.
- Lopez-Lazaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1), 31–59.
- Mahata, S., Maru, S., Shukla, S., Pandey, A., Mugesh, G., Das, B. C. y Bharti, A. C. (2012). Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 15.
- Matthew, S., Singh, D., Jaiswal, S., Jayakar, M.K.B. y Bhowmik, D. (2013c). Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. in alloxan induced diabetic rats. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Science*, 6, 1-7.
- Mejía-Sánchez D, Trejo-Hurtado CM, Vences-Contreras C, Cruz-Sosa F, Estrada-Zúñiga ME. (2016). Efecto de 2,4-D y BA en Brotes de hoja de *Bryophyllum daigremontianum* para la Obtencion de Cultivos in vitro. Memorias en extenso del XXXVII encuentro Nacional de la Academia

Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química “AMIDIQ”, 3 al 6 de mayo, Ciudad de Puerto Vallarta, México.

- Mejía-Sánchez, D., Ensastegui-Vazquez, E., Zepeda-Gómez, C., Burrola-Aguilar, C. y Estrada Zuñiga, M.E. (2018). Re-establecimiento de un cultivo celular de *Bryophyllum digremontanium*, productor de compuestos fenólicos. Memorias en extenso de XXI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas, 25 al 26 de octubre, Mexicali, Baja California, México.
- Mendoza, D., Cuaspud, O., Arias, J., Ruiz, O. y Arias, M. (2018). Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolic compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *Biotechnology Reports*, 19.
- Meyrán-García, J. y López-Chavez, L. (2003). *Las crasuláceas de México. Sociedad Mexicana de Cactología*. México, 52.
- Moniuszko-Szajwaj, B., Pecio, Ł., Kowalczyk, M. y Stochmal, A. (2016). New bufadienolides isolated from the roots of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae). *Molecules*, 21(3), 243.
- Mort, M.E., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Francisco-Ortega, J. y Santos-Guerra, A. (2001). Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from MATK sequence data. *American Journal of Botany*. 88. 76-91.
- Milad, R., El-Ahmady, S. y Nasser-singab, A. (2014). Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. *European Journal of Medicinal Plants*. 4(1), 86-104.
- Misra, S.B. y Dixit, S.N (1979). Antifungal activity of leaf extracts of some higher plants, *Acta Botanica Indica*, 7(2), 147-150.
- McKenzie, R.A., Franke, F.P. y Dunster, P.J. (1987). The toxicity to cattle and bufadienolide content of six *Bryophyllum* species. *Australian Veterinary Journal*, 64(10), 298–301.
- Moscatiello, R., Baldan, B. y Navazio, L. (2013). Plant cell suspension cultures – Springer. In: Yehuda S, Mostofsky DI, eds. *Plant mineral nutrients*. Totowa, NJ: Humana Press, 77–93.

- Murthy, H.N., Lee, E.J. y Paek, K.Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 118, 1-16.
- Muzitano, M.F., Cruz, E.A., De Almedia, A.P., Da Silva, S.A.G., Kaiser, C.R., Guette, C., Rosibergmann, B. y Costa, S.S. (2006). Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta medica*, 72, 81-83.
- Namdeo, A., Patil, S. y Fulzele, D.P. (2002). Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Progress*, 18(1), 159-62.
- Namdeo, A.G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy Reviews*, 1, 69-79.
- Narayani, M. y Srivastava, S. (2017). Elicitation: A stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry Reviews*, 16, 1227-1252.
- Naik, P.M., y Al-Khayri, J.M. (2016). Abiotic and biotic elicitors—role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*.
- Neumann, K., Kumar, A. y Imani, J. (2009). *Plant cell and tissue Culture - A tool in biotechnology*. 1st ed. [ebook] Giessen, Germany: Springer, pp.7-10. [Accessed 22 May 2020].
- Nguelefack, T.B., Nana, P., Atsamo, A.D., Dimo, T., Watcho, P., Dongmo, A.B., Tapondjou, L.A., Njamen, D., Wansi, S.L. y Kamanyi, A. (2006). Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 70-5.
- Nielsen, A.H., Olsen, C.E. y Moller, B.L. (2005). Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. *Phytochemistry*, 66, 2829–2835.



- Nwadinigwe, A. O. (2011). Antimicrobial activities of methanol and aqueous extracts of the stem of *Bryophyllum pinnatum* kurz (Crassulaceae). *African Journal of Biotechnology*, 10, 16342–16346.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M.O., Jin, Y.W., Lee, E.K. y Loake, G.J. (2016). Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Reports*, 49, 149-158.
- Ojewole, J.A. (2002). Antihypertensive Properties of *Bryophyllum pinnatum* {(Lam) Oken} Leaf Extracts. *American Journal of Hypertension*, 15(4), 34.
- Ojewole, J.A. (2005). Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacol*, 99(1), 13-9.
- Ortiz, D.G., López-Pujol, J., Laguna, E. y Puche, C. (2015). *Kalanchoe daigremontiana* Raym-Hamet & H Perrier ‘Iberian Coast’.
- Ozeki, Y. y Komamine, A. (1986). Effects of Growth Regulators on the Induction of Anthocyanin Synthesis in Carrot Suspension Cultures. *Plant and Cell Physiology*, 27(7), 1361–1368.
- Pal, S., Sen, T. y Chaudhari, A.K.N. (1999). Neuropsychopharmacological profile of the methanolic fraction of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 313-318.
- Patel, K., Jain, A. y Patel, D. K. (2013). Medicinal significance, pharmacological activities, and analytical aspects of anthocyanidins “delphinidin”: A concise report. *Journal of Acute Disease*, 2(3), 169–178.
- Pérez M.N. (2015) Perfil Fitoquímico de cultivos en suspensión de *Kalanchoe daigremontiana*. [Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias en desarrollo de productos bióticos], Instituto Politécnico Nacional.
- Puertas-Mejía, M.A., Tobón-Gallego, J. y Arango, V. (2014). *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 61-68.

- Radice S. (2004). Morfogénesis. En Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., y Mroginski L. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*. (pp. 29). Argenbio
- Ramos-Hernández, R., Sánchez-Medina, A., Bravo-Espinoza, I., Ramos-Morales, F.R., Domínguez-Ortíz, M.A., Fernández-Pomares C., Aranda-Abreu, G.E. y Hernández-Aguilar, M.E. (2018). Biological activities of kaempferitrin- a short review. *Pharmacology online*, 80, 79-90.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R.M. y Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of the bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21, 182.
- Rao, S.R. y Ravishankar, G.A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Remib (red mundial de información sobre biodiversidad) (2008) recuperado el 15 de julio 2020 de [http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib\\_esp.html](http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html)
- Rischer, H., Oresic, M., Seppänen-Laakso, T., Katajamaa, M., Lammertyn, F., Ardiles-Diaz, W., Van Montagu, M.C., Inzé, D., Oksman-Caldentey, K.M. y Goossens, A. (2006). Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 5614–5619.
- Romero-Calvache D. (2017). Establecimiento de un protocolo de calogénesis in vitro a partir de explantes de hoja de dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri* Raym.-Hamet & H.Perrier) para posterior determinación de contenido de fenoles y carácter antioxidante. [Tesis para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología]. Universidad de las Fuerzas armadas ESPE.
- Sagare, A.P., Lee, Y.L., Lin, T.C., Chen, C.C. y Tsay, H.S. (2000). Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae)- a medicinal plant. *Plant Science*, 160: 139-147
- Samuelsson, G. (2004). *Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy*. 5th ed. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press

- Saniewski, M., Horbowicz, M., Puchalski, J. y Ueda, J. (2003). Methyl jasmonate stimulates the formation and the accumulation of anthocyanin in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25 (2), 143-149.
- Sharker, S., Hossain, K., Haque, M., Kabir, H.N.A., Hasan, C. y Rashid, M. (2013). Phytochemical and Pharmacological Studies of *Bryophyllum daigremontianum* (Raym.). *American Journal of PharmTech Research*, 3.
- Shin, S.W., Jung, E., Kim, S., Kim, J.H., Kim, E.G., Lee, J. y Park, D. (2013). Antagonizing effects and mechanisms of afzelin against UVB-induced cell damage. *PloS one*, 8(4).
- Shitan N. (2016). Secondary metabolites in plants: Transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80, 1283-1293.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 14, 152-178.
- Sun, J., Wang, Y., Chen, X., Gong, X., Wang, N., Ma, L. y Feng, S. (2017). Effects of methyl jasmonate and abscisic acid on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130(2), 227–237.
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K. y Hayashi H. (2000). New, "Insecticidal Bufadienolide, Bryophytopal C, from *Kalanchoe pinnata*". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 1309-1311.
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K. y Hayashi H. (2001a). Insecticidal Compounds from *Kalanchoe daigremontiana* x *tubiflora*. *Phytochemistry*, 58, 311-314.
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., Hayashi H., Mukarami, A., Sakai, H., Koshimizu, K. y Ohigashi. H. (2001b). Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolide from *Kalanchoe pinnata* and *K. Daigremontiana* x *tubiflora*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 947-949.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2010) *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- Tatsimo, S.J.N., Tamokou, J.D., Havyarimana, L., Csupor, D., Forgo, P., Hohmann, J., Kuate, J.R. y Tane, P. (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of Kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Research Notes*, 5, 158.
- Thorat, A.S., Sonone, N.A., Choudhari, V.V., Devarumath, R.M. y Babu, K.H. (2018). Plant regeneration from direct and indirect organogenesis and assessment of genetic fidelity in *Saccharum officinarum* using DNA-based markers. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, 11, 60–69.
- Thorpe, T. A. (1990) The current status of plant tissue culture, *En Plant Tissue Culture: Applications and limitations* (Bhojwani, S. S., ed.), Elsevier, Amsterdam.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180.
- Uppalapati, S.R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D.A., Mitchell, R.E., Jones, W. y Bender, C.L. (2005). The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant Journal*, 42, 201–217.
- Vendrame, S. y Klimis-Zacas, D. (2015). Anti-inflammatory effect of anthocyanins via modulation of nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Nutrition Reviews*, 73, 348–358.
- Wallace, T.C., Slavin, M. y Frankenfeld, C.L. (2016). Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, 8, 32.
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.C., Booren, A.M., Gray, J.I. y DeWitt, D.L. (1999). Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 62, 294–296.
- Wang, H., Cao, G. y Prior, R.L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 304–309.
- Wasternack, C. y Hause, B. (2013). Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 111, 1021–1058.

- Wei Y., Qian-liang M., Bing L., Khalid R., Cheng-Jian Z., Ting H. y Lu-ping Q. (2016). Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Informa Healthcare*, 36(2), 215–232.
- Wink M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines*, 2, 251-286.
- Wu, P.L., Hsu, Y.L., Wu, T.S., Bastow, K.F. y Lee, K.H. (2006). Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *Kalanchoe gracilis*. *Organic Letters*, 23, 5207–5210.
- Yadav, N.P. y Dixit, V.K. (2003). Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. *J Ethnopharmacol*, 86(2-3), 197-202.
- Yue, W., Ming, Q., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.J., Han, T. y Qin, L. (2014). Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 215–232.
- Zhao, J., Davis, L.C. y Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to the production of the plant secondary metabolite. *Biotechnology Advances*, 23, 283-333.