



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE
CALLOGÉNESIS *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTES DE
HOJA DE DULCAMARA (*Kalanchoe gastonis bonnierii* Raym.-
Hamet & H.Perrier) PARA POSTERIOR DETERMINACIÓN DE
CONTENIDO DE FENOLES Y CARÁCTER ANTIOXIDANTE”.**

AUTOR: ROMERO CALVACHE, DANIELA JOHANNA

DIRECTOR: JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ, Ph.D. (c)

SANGOLQUÍ

2017

CERTIFICACIÓN

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, "ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE CALLOGÉNESIS *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", realizado por la señorita **DANIELA JOHANNA ROMERO CALVACHE**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **DANIELA JOHANNA ROMERO CALVACHE** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 21 agosto del 2017



MÓNICA BEATRIZ JADÁN GUERRERO

DIRECTORA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA****CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA****AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **DANIELA JOHANNA ROMERO CALVACHE**, con cédula de identidad N° 1716295900, declaro que este trabajo de titulación “**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE CALLOGÉNESIS *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJA DE DULCAMARA (*Kalanchoe gastonis bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier) PARA POSTERIOR DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE FENOLES Y CARÁCTER ANTIOXIDANTE**”, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 21 de agosto del 2017



DANIELA JOHANNA ROMERO CALVACHE

C. C. 1716295900

AUTORIZACIÓN

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **DANIELA JOHANNA ROMERO CALVACHE**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE CALLOGÉNESIS *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJA DE DULCAMARA (*Kalanchoe gastonis bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier) PARA POSTERIOR DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE FENOLES Y CARÁCTER ANTIOXIDANTE”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 21 de agosto del 2017.


DANIELA JOHANNA ROMERO CALVACHE

C.C. 1716295900

DEDICATORIA

A mi amado creador, todopoderoso que derramó su gracia sobre mí, me llenó de bendiciones y me mostró el camino a seguir, con todo el amor de mi corazón y humildad, le dedico este proyecto de Tesis a Dios.

A mi madre, Laury que me dio la vida y desde pequeña supo forjar en mí las bases de la responsabilidad y el trabajo duro, mi modelo a seguir como madre, que nunca se cansó de apoyarme y alentarme para que cumpla mis objetivos.

A mi padre, Luis por haber realizado un esfuerzo tan grande para que nunca me falte lo necesario, siempre fue mi ejemplo de esfuerzo y superación, gracias a su sacrificio y paciencia puedo culminar este proyecto con éxito.

A mi princesita, Martina mi mayor bendición, que me ha acompañado durante todos estos años de estudio y su sonrisa ha sido mi mayor inspiración a seguir adelante para que algún día pueda sentirse orgullosa de mí.

A mi abuelita Nelly, por darme tanto cariño desde niña, y ser mi segunda madre, nunca ha dejado de creer en mí, y así mismo lo hace con mi pequeña Martina, la llevo en mi corazón.

A mis hermanas Nicky y Domy, mis primeras mejores amigas, que me han apoyado y alentado para que pueda ser mejor, siempre las voy a cuidar y retribuir su cariño.

A Davinci, mi mejor amigo y mi alma gemela, siempre me animó diciendo que soy la mejor, que la culminación de mis estudios sea el inicio de una vida llena de victorias juntos.

Daniela Romero

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco de todo corazón a mi directora de tesis Mónica Jadán PhD (c) ha sido su guía, orientación, confianza, paciencia, y sobretodo su amistad lo que me han permitido dar un paso más en el camino para mi formación como ser humano y profesional, que Dios la bendiga eternamente.

A Claudia Segovia PhD, por todos los conocimientos, experiencias humanas, profesionales, y toda la ayuda compartida a los chicos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de manera desinteresada, estoy segura que todos al igual que yo, estamos eternamente agradecidos.

A Dra. Blanca Naranjo por toda la guía, paciencia y conocimientos compartidos, los cuales hicieron que surja mayor interés en mí por los metabolitos secundarios.

A Raluca Mihai PhD por su ayuda y guía en el principio de este proyecto, que siga cosechando muchos éxitos en su carrera profesional.

A MsC. Cristian Peña, por haber sido una guía desinteresada en el procesamiento de datos estadísticos, estoy eternamente agradecida.

A mis chavitas: Kari, Jen, Jasi, Gaby, por toda su ayuda, apoyo y por los momentos vividos durante esta larga etapa universitaria, que nuestra amistad dure muchas décadas más.

A todos los miembros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, en especial a las jefas: Nenis y Jen, que gracias a su tiempo invertido, nuestro “labo” es ahora uno de los mejores y mi lugar preferido de toda la Universidad.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|--------------|
| CARÁTULA | |
| CERTIFICACIÓN | ii |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD | iii |
| AUTORIZACIÓN | iv |
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTOS | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xii |
| ÍNDICE DE CUADROS | xiv |
| RESUMEN | xvii |
| ABSTRACT | xviii |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| INTRODUCCIÓN | |
| 1.1. Formulación del problema | 1 |
| 1.2. Justificación..... | 2 |
| 1.3. Objetivos | 3 |
| 1.3.1. Objetivo General | 3 |
| 1.3.2. Objetivos Específicos..... | 4 |
| 1.4. Marco Teórico | 4 |
| 1.4.1. Dulcamara o Kalanchoe (<i>Kalanchoe gastonis bonnieri</i>) | 4 |
| 1.4.1.1. Origen y Distribución..... | 4 |
| 1.4.1.2. Clasificación taxonómica | 5 |
| 1.4.1.3. Características Morfológicas..... | 6 |
| 1.4.1.6. Ciclo de vida. | 9 |
| 1.4.1.7. Posibles Polinizadores..... | 9 |

| | | |
|-----------------------------|---|----|
| 1.4.1.8. | Plagas y enfermedades | 9 |
| 1.4.1.9. | Composición Química..... | 11 |
| 1.4.1.10. | Usos..... | 12 |
| 1.4.2. | Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales..... | 12 |
| 1.4.2.1. | Componentes del medio de cultivo | 13 |
| 1.4.2.2. | Etapas del cultivo <i>in vitro</i> | 16 |
| 1.4.2.2.1. | Establecimiento | 16 |
| 1.4.2.2.2. | Organogénesis | 16 |
| 1.4.2.2.3. | Multiplicación | 17 |
| 1.4.2.2.4. | Callogénesis | 18 |
| 1.4.3. | Metabolitos Secundarios | 22 |
| 1.4.3.1. | Clasificación de Metabolitos Secundarios | 22 |
| 1.4.3.1.1. | Terpenos | 22 |
| 1.4.3.1.2. | Compuestos Fenólicos | 23 |
| 1.4.3.1.3. | Glicósidos..... | 24 |
| 1.4.3.1.4. | Alcaloides..... | 25 |
| 1.4.3.2. | Actividad Antioxidante | 25 |
| 1.4.3.3. | Reactivo de Folin-Ciocalteu..... | 26 |
| 1.4.3.4. | 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)..... | 26 |
| 1.5. | Hipótesis..... | 26 |
| CAPÍTULO 2..... | 27 | |
| MATERIALES Y MÉTODOS | | |
| 2.1. | Localización del ensayo | 27 |
| 2.1. | Fase de Campo | 27 |
| 2.1.1. | Obtención de plantas | 27 |
| 2.1.2. | Tratamiento Fitosanitario | 28 |
| 2.2. | Fase de Laboratorio..... | 29 |

| | | |
|------------------------|---|-----------|
| 2.2.1. | Desinfección e Introducción de explantes..... | 29 |
| 2.2.2. | Multiplicación | 33 |
| 2.2.3. | Inducción de callo | 33 |
| 2.2.4. | Análisis Químico..... | 35 |
| 2.2.4.1. | Determinación de contenido de fenoles | 35 |
| 2.2.4.2. | Determinación de Capacidad Antioxidante | 37 |
| CAPÍTULO 3..... | | 39 |

RESULTADOS

| | | |
|----------|---|----|
| 3.1. | Desinfección e Introducción de explantes..... | 39 |
| 3.1.1. | Contaminación del explante..... | 40 |
| 3.1.1.1. | Análisis exploratorio de datos | 40 |
| 3.1.1.2. | Análisis Inferencial | 43 |
| 3.1.2. | Oxidación del explante..... | 49 |
| 3.1.2.1. | Análisis exploratorio de datos | 49 |
| 3.1.2.2. | Análisis Inferencial | 51 |
| 3.1.3. | Viabilidad Total de explantes..... | 53 |
| 3.1.3.1. | Análisis exploratorio de datos | 53 |
| 3.1.3.2. | Análisis Inferencial | 55 |
| 3.2. | Inducción a callo | 57 |
| 3.2.1. | Presencia de callo | 57 |
| 3.2.1.1. | Análisis exploratorio de datos | 57 |
| 3.2.1.2. | Análisis Inferencial | 59 |
| 3.2.2. | Oxidación del explante..... | 62 |
| 3.2.2.1. | Análisis exploratorio de datos | 62 |
| 3.2.2.2. | Análisis Inferencial | 64 |
| 3.3. | Análisis Químico..... | 66 |
| 3.3.1. | Determinación del Contenido de Fenoles | 67 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.1.1. Análisis exploratorio de datos | 67 |
| 3.3.1.2. Análisis Inferencial | 69 |
| 3.3.2. Determinación de la Capacidad Antioxidante..... | 71 |
| 3.3.2.1. Análisis exploratorio de datos | 71 |
| 3.3.2.2. Análisis Inferencial | 74 |
| CAPÍTULO 4..... | 77 |
| DISCUSIÓN | |
| 4.1. Dulcamara como modulador biológico | 77 |
| 4.2. Desinfección e Introducción de explantes de hoja. | 77 |
| 4.3. Inducción a callogénesis <i>in vitro</i> de explantes de hoja. | 79 |
| 4.4. Determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante | 81 |
| CAPÍTULO 5..... | 84 |
| CONCLUSIONES | |
| CAPÍTULO 6: | 85 |
| RECOMENDACIONES | |
| CAPÍTULO 7..... | 86 |
| BIBLIOGRAFÍA | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Tratamientos de concentración de NaClO y tiempo de inmersión. | 29 |
| Tabla 2. Tratamientos para la inducción a callogénesis de hoja de Dulcamara | 34 |
| Tabla 3. Tabla de contingencia de la variable contaminación del explante de <i>Kalanchoe gastonis bonnieri</i> a los 7 días de la siembra. | 41 |
| Tabla 4. Tabla de contingencia para los resultados obtenidos para la variable contaminación del explante a los 21 días de la siembra..... | 42 |
| Tabla 5. Resultados obtenidos de oxidación del explante a los 7 días de siembra. ... | 49 |
| Tabla 6. Tabla de contingencia para los resultados de la variable oxidación del explante a los 21 días de siembra. | 50 |
| Tabla 7. Resultados de Viabilidad Total de explantes a los 21 días de siembra..... | 54 |
| Tabla 8. Resultados de la variable Presencia de Callo a los 30 días de siembra | 58 |
| Tabla 9. Tabla de contingencia de la variable Presencia de Callo a los 60 días de siembra. | 59 |
| Tabla 10. Tabla de contingencia de la Oxidación del explante a los 30 días de la siembra. | 62 |
| Tabla 11. Tabla de contingencia para la Oxidación del explante a los 60 días de siembra. | 63 |
| Tabla 12. Datos del análisis de la cuantificación de fenoles totales. | 69 |
| Tabla 13. Capacidad Antioxidante, se indica el porcentaje de reducción de radical DPPH | 72 |
| Tabla 14. Resultados reales de capacidad antioxidante. | 74 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Planta de Dulcamara en cultivo <i>ex vitro</i> | 7 |
| Figura 2. Plántulas en el ápice de la hoja de Dulcamara..... | 7 |
| Figura 3. <i>Oidium kalanchoe</i> sobre superficie de planta del género <i>Kalanchoe</i> | 11 |
| Figura 4. Organogénesis directa e indirecta <i>in vitro</i> | 17 |
| Figura 5. Multiplicación <i>in vitro</i> | 18 |
| Figura 6. Esquema de la organogénesis indirecta a partir de un explante de hoja de una planta adulta | 19 |
| Figura 7. Tipos de callos.. | 20 |
| Figura 8. Estructura de Terpenos. | 23 |
| Figura 9. Esqueletos de diferentes tipos de Flavonoides | 24 |
| Figura 10. Transferencia de átomo de hidrogeno..... | 25 |
| Figura 11. Plantas de Dulcamara en el invernadero del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. | 28 |
| Figura 12. Protocolo de desinfección..... | 31 |
| Figura 13. Explante de Dulcamara <i>Kalanchoe gastonis bonnieri</i> contaminado con hongo..... | 39 |
| Figura 14. Explante de Dulcamara <i>Kalanchoe gastonis bonnieri</i> contaminado con bacteria. | 40 |
| Figura 15. Explante de Dulcamara <i>Kalanchoe gastonis bonnieri</i> contaminado con bacteria endógena en el tratamiento “T2” a los 21 días de la siembra..... | 40 |
| Figura 16. Gráfica de porcentajes de contaminación de los explantes a los 7 días.... | 41 |
| Figura 17. Gráfica de porcentajes de contaminación para los explantes a los 21 días. | 43 |
| Figura 18. Gráfica de porcentajes de oxidación de explantes a los 7 días de siembra. | 50 |
| Figura 19. Porcentajes de los resultados de oxidación de los explantes a los 21 días de siembra. | 51 |
| Figura 20. Gráfica de porcentajes de los 9 tratamientos de desinfección para la Viabilidad Total de explantes a los 21 días de siembra. | 55 |
| Figura 21. Gráfica de porcentajes para la Presencia de Callo tomado a los 30 días de siembra. | 58 |

| | |
|--|----|
| Figura 22. Gráfica de porcentajes para la Presencia de Callo tomado a los 60 días de la siembra. | 59 |
| Figura 23. Gráfica de porcentajes para la Oxidación del Explante a los 30 días de la siembra. | 63 |
| Figura 24. Gráfica de porcentajes de Oxidación del explante a los 60 días de siembra. | 64 |
| Figura 25. Callo de hoja <i>in vitro</i> de <i>Kalanchoe gastonis bonnieri</i> (0.8X)..... | 67 |
| Figura 26. Curva de calibración de Ácido gálico..... | 68 |
| Figura 27. Concentración de fenoles..... | 69 |
| Figura 28. Curva de calibración de Radical libre DPPH en mgL ⁻¹ | 71 |
| Figura 29. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH..... | 73 |
| Figura 30. Gráfica de Correlación entre los resultados de contenido de fenoles y capacidad antioxidante..... | 76 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada con el software <i>SPSS</i> para determinar correlación entre la variable contaminación total y el tratamiento de desinfección..... | 44 |
| Cuadro 2. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada con el software <i>SPSS</i> para determinar correlación entre la variable contaminación total y la variable concentración de hipoclorito de sodio..... | 44 |
| Cuadro 3. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada con el software <i>SPSS</i> para determinar correlación entre la variable contaminación total y la variable concentración de hipoclorito de sodio..... | 45 |
| Cuadro 4. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada con el software <i>SPSS</i> para determinar correlación entre la variable contaminación por hongo y la variable tratamiento de desinfección..... | 45 |
| Cuadro 5. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada con el software <i>SPSS</i> para determinar correlación entre la variable contaminación por hongo y la variable concentración de hipoclorito de sodio..... | 46 |
| Cuadro 6. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada con el software <i>SPSS</i> para determinar correlación entre la variable contaminación por hongo y la variable tiempo de inmersión..... | 46 |
| Cuadro 7. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada con el software <i>SPSS</i> para determinar correlación entre la variable contaminación por bacteria y la variable tratamiento de desinfección..... | 47 |
| Cuadro 8. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre las contaminación por bacteria y concentración de hipoclorito de sodio. | 47 |
| Cuadro 9. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la variable contaminación por bacteria y el tiempo de inmersión.. | 48 |
| Cuadro 10. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la oxidación y el tratamiento de desinfección. | 52 |
| Cuadro 11. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre las variables oxidación y concentración de hipoclorito de sodio... | 52 |
| Cuadro 12. Prueba de Independencia $\chi^2(x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable tiempo de inmersión..... | 53 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 13. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la viabilidad total y la variable tratamiento de desinfección..... | 55 |
| Cuadro 14. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la viabilidad total y la variable concentración de hipoclorito de sodio. | 56 |
| Cuadro 15 . Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la viabilidad total y la variable tiempo de inmersión. | 56 |
| Cuadro 16 . Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la variable presencia de callo y la variable tratamiento. | 60 |
| Cuadro 17. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre las variables presencia de callo y concentración de BAP. | 60 |
| Cuadro 18. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre las variables presencia de callo y concentración de 2,4-D..... | 61 |
| Cuadro 19. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable tratamiento. | 65 |
| Cuadro 20. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable concentración de BAP. | 65 |
| Cuadro 21. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada en <i>SPSS</i> que determina la correlación entre la oxidación y la concentración de 2,4-D..... | 66 |
| Cuadro 22. Análisis de la varianza (ANOVA) en <i>Infostat</i> para el ensayo de determinación de contenido de fenoles. | 70 |
| Cuadro 23 . Test de comparación de Tukey para los resultados del ensayo de determinación de contenido de fenoles | 70 |
| Cuadro 24. Análisis de la varianza (ANOVA) en <i>Infostat</i> para el ensayo de determinación de capacidad antioxidante. | 75 |
| Cuadro 25 . Test de comparación de Tukey para los resultados del ensayo de determinación de capacidad antioxidante. | 75 |

LISTADO DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|-----------------------------------|
| % P/V: | Porcentaje en peso sobre volumen. |
| 2,4-D: | Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético |
| BAP: | 6-Benzil Aminopurina |
| DPPH: | 2,2-difenil-1-picrilhidracilo |
| g: | gramos |
| KIN: | Kinetina |
| L: | litros |
| mg: | miligramos |
| MS: | Medio Murashige &Skoog (1962) |
| m. s. n. m.: | metros sobre el nivel del mar |

RESUMEN

La Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri* Raym.-Hamet & H.Perrier) es una planta endémica de Madagascar cuyo extracto se ha utilizado como principio activo del modulador biológico BIRM (Cevallos, 1997), su importancia en el Ecuador radica en el conocimiento empírico de las tribus indígenas sobre su potencial para curar enfermedades que van desde el Alzheimer hasta distintos tipos de cáncer. Hasta la fecha no se tiene una base científica sustentable del alto poder antioxidante, antibacteriano e inmunoestimulante que poseen las hojas de la planta. Esta investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo de desinfección e introducción de hojas de Dulcamara *in vitro*, obtener un tratamiento ideal para la inducción a callogénesis de hoja *in vitro*, para determinar la cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de muestras de callo *in vitro* de 60 y 270 días, y de hoja *in vivo* e *in vitro* de la planta. Se probaron 9 tratamientos para la etapa de desinfección, con distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y distintos tiempos de inmersión; 3 tratamientos fueron utilizados para la inducción a callogénesis *in vitro* de explantes de hoja de Dulcamara con distintas concentraciones de BAP y 2,4-D y finalmente se comparó los resultados de las cuatro muestras obtenidas con los ensayos de Folin Ciocalteu y DPPH para determinar contenido de fenoles y obtener el porcentaje de reducción de radicales DPPH. Los resultados indicaron que el tratamiento de desinfección “T3” (1.5% Hipoclorito de sodio NaClO; 25 min) obtuvo 100% de explantes viables a los 60 días; el tratamiento de inducción a callogénesis “T2”, obtuvo el mayor porcentaje de explantes con presencia de callo y no oxidados (65%; 25%) a los 60 días, mientras que el análisis del extracto de hoja *in vivo* presentó el mayor contenido de fenoles (20,20 mg equivalentes de ácido gálico/g de muestra seca) y el mayor porcentaje de reducción de radicales DPPH (76,42 %).

PALABRAS CLAVE:

- **DULCAMARA** (*Kalanchoe gastonis bonnieri*)
- **CALLOGÉNESIS IN VITRO**
- **CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

ABSTRACT

Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri* Raym.-Hamet & H.Perrier) is an endemic plant from Madagascar whose extract has been used as the active principle of biological modulator BIRM (Cevallos, 1997), its importance in Ecuador lies in the empirical knowledge of indian tribes about its potential to cure diseases ranging from Alzheimer to various cancers types, however to the date the antioxidant, antibacterial and immunostimulating power of its leaves doesn't have a sustainable scientific basis. The present research aimed to establish a protocol for disinfection and introduction of Dulcamara leaves *in vitro*, to obtain an ideal treatment for induction of leaf callogenesis *in vitro*, and finally determine the amount of phenolic compounds and antioxidant capacity of *in vitro* callus samples of 60 and 270 days, & *in vivo* and *in vitro* leaf. Nine treatments were tested for the disinfection essay, with different concentrations of sodium hypochlorite and immersion times. Three treatments were used for the *in vitro* callogenesis induction of Dulcamara leaf explants with different concentrations of BAP and 2,4-D and finally DPPH and Folin Ciocalteu assays were carried out to determine the phenol content and the percentage of DPPH reduction. As a result, "T3" disinfection treatment (1.5% NaClO; 25 min) obtained 100% of viable explants at 60 days; "T2" callogenesis induction treatment, obtained the highest percentage of explants with presence of callus and non-oxidized (65%, 25%) at 60 days, while the *in vivo* leaf extract analysis presented the higher phenol content (20,20 mg galic acid / g dry sample), and the highest percentage of DPPH radical reduction (76,42%).

KEYWORDS:

- **DULCAMARA** (*Kalanchoe gastonis bonnieri*)
- **CALLOGENESIS IN VITRO**
- **ANTIOXIDANT CAPACITY**

1. CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

La Ciencia moderna busca fuentes naturales de antioxidantes que puedan contrarrestar el efecto causado por radicales libres (Dimitrios, 2006). Estos se forman en el cuerpo humano por efecto de diferentes factores internos y externos (Dong *et al.*, 2011). Entre los primeros se encuentra el estrés oxidativo, y en los externos la prolongada exposición a la luz UV o a distintas fuentes de radiación (Dai *et al.*, 2010). La excesiva acumulación de estos radicales libres en el organismo puede jugar un papel importante en el desencadenamiento de enfermedades degenerativas tales como el Alzheimer, así como distintos tipos de cáncer (Dong *et al.*, 2011).

Es de gran interés el estudio de ciertas plantas cuyo poder curativo de algunos males relacionados con el daño celular y la destrucción del ADN se conoce empíricamente (Dasgupta *et al.*, 2013). Se ha comprobado que la Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) posee un extracto que contiene una concentrada mezcla de bufadienolides (Dasgupta *et al.*, 2013). Estos son importantes componentes activos en el género *Kalanchoe* (Dong *et al.*, 2011) y poseen efectos citotóxicos y de inhibición tumoral, así como propiedades antioxidantes, antibacterianas e inmunoestimulantes (Supratman *et al.*, 2001).

El extracto de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) es la base para la elaboración del Modulador Biológico de la Respuesta Inmune (BIRM) (Cevallos, 1997). Este es un medicamento natural capaz de detener el progreso del SIDA y algunos tipos de cáncer, entre otras enfermedades (Cevallos, 1997). La producción masiva del BIRM ha permitido que los sectores más necesitados tengan acceso a tratamientos de enfermedades muy comunes que antes fueron inalcanzables por su elevado costo (Cevallos, 1997). Pese a esta ventaja, la comunidad científica local e internacional mira con escepticismo las propiedades de dicha planta y de especies relacionadas en la misma familia, puesto que ningún fitofármaco elaborado con su

extracto ha pasado las distintas fases de pruebas de preclínica, por lo que se considera que no tiene un respaldo científico contundente (González, 1997).

Sin embargo, según datos obtenidos por la CORPEI, desde 2012 ha existido un incremento del 7% para las exportaciones de la Dulcamara, especialmente hacia Estados Unidos con el fin de ejecutar investigaciones relacionadas con el tratamiento de distintos tipos de cáncer, SIDA y otras enfermedades (Silva, 2013). Debido a este panorama es necesario realizar nuevos estudios que respalden las diversas propiedades curativas que posee la Dulcamara y las especies relacionadas, tanto a nivel de laboratorio como medicinal (Silva, 2013).

1.2. Justificación

A través del establecimiento de cultivo *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* se obtienen nuevas plantas libres de semillas de malas hierbas, patógenos así como de diversas sustancias fitotóxicas (Ikeuchi *et al.*, 2013). Estas generalmente interfieren en su crecimiento normal *in vivo*, y afectan la calidad y cantidad de metabolitos secundarios que produce la planta normalmente (Catucuago, 2009).

El cultivo *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* es una alternativa preferida para la obtención de metabolitos secundarios de interés frente al cultivo tradicional (Arash *et al.*, 2016). La totipotencia activada en el tejido vegetal permite a las células obtenidas producir los mismos compuestos que las células parentales (Karakas *et al.*, 2013). Sin que influya en dicha producción las variaciones geográficas, estacionales o de otros factores ambientales (Orhan, 2012). Además, esta técnica ofrece un sistema de producción definido que asegura el suministro continuo de productos de calidad y con rendimientos uniformes (Ramachandra *et al.*, 2002).

Los metabolitos secundarios al no ser esenciales en el crecimiento de las plantas se producen en cantidades pequeñas, en tejidos específicos y en etapas determinadas (Ávalos *et al.*, 2009). Su obtención y extracción a través de los métodos de cultivo tradicional es difícil y costosa (Srivastava *et al.*, 2007). Por ende, la callogénesis *in vitro* constituye una alternativa óptima ya que permite obtener

metabolitos a partir de cualquier tejido de la planta, en condiciones controladas y en una escala aumentada (Srivastava *et al.*, 2007).

La extracción de metabolitos secundarios a partir del tejido calloso obtenido *in vitro* supera la interferencia de la clorofila (Azofeifa, 2009). Este es un problema recurrente en los métodos tradicionales de extracción de dichos metabolitos a partir del tejido foliar de la planta cultivada *in vivo* (Azofeifa, 2009). Para la extracción de metabolitos secundarios de material *in vitro* se requiere solamente de un solvente polar o no polar según sea el caso, que permita la disolución de componentes para su extracción (Carrión *et al.*, 2010).

El cultivo *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* es una importante alternativa para el desarrollo de fitofármacos (Azofeifa, 2009). En esencia, permite una producción, extracción rápida y eficiente de metabolitos secundarios a partir de la inducción a callogénesis (Carrión *et al.*, 2010). Por medio de esta no existen barreras que impidan la obtención de dichos compuestos de forma pura (Gupta, 2016). Además, mediante el uso de técnicas de biología molecular combinadas con las técnicas de cultivo *in vitro*, y el uso de elicitores se puede modificar y aumentar la producción de compuestos según las necesidades del investigador y de la industria (Segretín, 2008).

Mediante el presente estudio se pretende establecer un protocolo de introducción y callogénesis *in vitro* de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* y la determinación del contenido de fenoles y carácter antioxidante de los callos resultantes. De esta forma se busca dar sustento a futuras investigaciones en el área humana que permitan determinar el mecanismo de acción de los compuestos de la Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* frente a células que enfrentan diversas enfermedades inmunosupresivas y neurodegenerativas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Establecer un protocolo de callogénesis *in vitro* a partir de explantes de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri* Raym.-Hamet & H.Perrier) para posterior determinación de contenido de fenoles y carácter antioxidante.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de desinfección de explantes *in vitro* de hoja de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*).
- Establecer un medio para callogénesis a partir de hoja *in vitro* de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*).
- Determinar el contenido de fenoles y el carácter antioxidante de hoja *in vivo*, *in vitro* & callos de hoja *in vitro* de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*).

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Dulcamara o Kalanchoe (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) Raym.-Hamet & H. Perrier

1.4.1.1. Origen y Distribución

Kalanchoe es un género de especies suculentas pertenecientes a la subfamilia *Kalanchoidea* de la familia *Crassulaceae*, designado de esa forma a partir de un vocablo chino por Harvey (1984) (Baldwin, 2015). Hamet & su colaborador Perrier en 1907 redujo *Bryophyllum* y *Kitchingia* a géneros inválidos de *Kalanchoe*, convirtiéndola en una subfamilia (Baldwin, 2015). Las especies de la subfamilia se distinguen del resto por sus flores con corola tubular y ocho estambres fusionados (Baldwin, 2015). En 1933, Mauritzon encontró que la subfamilia puede ser distinguida embrionalmente de las otras Crasuláceas (Baldwin, 2015). Actualmente, estudios de cromosomas revelan que la subfamilia es resultado de la evolución de tendencias citológicas reconocibles en la evolución de la familia (Baldwin, 2015).

La Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) es una especie endémica de Madagascar (África) que fue descubierta por el científico Gastón Bonnier en Francia en 1887 (Catucago, 2009). Algunos botánicos franceses llevaron su cultivo por el mundo desde el Congo (Lucas, 2002). Una vez que llegó a América, Manaus en Brasil se convirtió en un punto de distribución hacia los demás países a través de los afluentes del río Amazonas (Jaramillo, 2007). Al Ecuador llegó a ciudades costeras como Guayaquil, Chone y Vinces, así como a ciudades de la región amazónica como El Tena, El Puyo y Zamora gracias al comercio que se desarrolló en la época del auge cacaotero a finales del siglo XIX (Catucago, 2009). El hábitat original de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* son los bosques abiertos con rocas calcáreas en Madagascar, pero ha sido naturalizada en algunas regiones tropicales del Ecuador y de otros países Sudamericanos para luego ser exportados hacia el continente europeo (LLIFLE, 2013).

Las tribus aborígenes de los diferentes países americanos han utilizado ciertas especies de *Kalanchoe* para propósitos medicinales (Catucago, 2009). Sin embargo, en el Ecuador no existen plantaciones con fines de comercialización de la planta significativos para la industria (Censos, 2009). Su consumo se lo hace en pequeñas cantidades en el país, y el conocimiento de sus propiedades curativas es de tipo totalmente empírico (Catucago, 2009). Además no existen investigaciones académicas sobre el efecto de los metabolitos secundarios de la planta en células tumorales pese a que existe evidencia de que estos pueden contribuir a la cura para el cáncer (Scott, 2016).

1.4.1.2. Clasificación taxonómica

La clasificación Taxonómica de la Dulcamara según Strasburger (2004):

- Reino: *Plantae*
- Subreino: Viridiplantae
- Superdivisión: Embryophyta
- División: Tracheophyta
- Clase: Magnoliopsida

- Subclase: Rosidae
- Orden: Saxifragales
- Familia: Crassulaceae
- Subfamilia: Kalanchoideae
- Género: Kalanchoe
- Especie: *Kalanchoe gastonis-bonnierei* Raym.-Hamet & H.Perrier.

1.4.1.3. Características Morfológicas

La Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnierei*) es un arbusto rastrero perenne que en época de floración llega a medir hasta un metro de alto, con entrenudos de hasta once centímetros de largo (Figura 1) (Lucas, 2002). Tiene hojas opuestas de forma lanceolada (Catucuago, 2009). Adicionalmente, la base de la superficie foliar es cuneada (Lucas, 2002). Los márgenes son gruesos y sus bordes son redondeados (Lucas, 2002). La Dulcamara posee inflorescencias en forma de un corimbo de 15 a 30 cm de alto que empiezan a crecer en otoño y se ramifican cerca de la parte superior de la hoja con racimos de brotes pálidos que al oscurecerse dan origen al cáliz (Eliovson, 1973). Por último, su cáliz es campanulado y puede llegar a medir hasta 23 mm de largo con una coloración roja verdosa, y su corola hasta 37 mm de largo de color amarillo o rojo (Catucuago, 2009).



Figura 1. Planta de Dulcamara en cultivo *ex vitro*

Fuente: (Bustani, 2015).

La Dulcamara (*Kalanchoe gastonis-bonnierei*) generalmente posee pequeñas plántulas que se desarrollan en el ápice o punta de sus hojas, mediante las cuales ocurre su propagación *ex vitro* (Figura 2) (Eliovson, 1973).



Figura 2. Plántulas en el ápice de la hoja de Dulcamara

Fuente: (Mederos, 2016).

1.4.1.4. Ecología

Esta especie se adapta a ambientes soleados, secos y rocosos, consecuentemente posee hojas gruesas (Maila, 2013). Es tolerante a condiciones extremas de sequía, y no se adapta a climas extremadamente húmedos puesto que podría causar putrefacción de sus hojas (Catucuago, 2009). En verano es recomendable que reciban un riego moderado, mientras que cuando baja la temperatura, es más beneficioso suprimir el riego por completo (Lucas, 2002). Se adapta muy bien a suelos ubicados sobre los 2900 m.s.n.m., aunque no es muy exigente en cuanto a la fertilidad del suelo, es recomendable colocarla en un suelo de tierra calcárea y volcánica que sea suave, permeable, con un eficiente sistema de drenaje y rico en materia orgánica (Maila, 2013).

1.4.1.5. Propagación

Las especies del género *Kalanchoe* se reproducen preferencialmente de manera asexual por medio de mecanismos de propagación vegetativa (Steeves *et al.*, 2001). Esto es debido a que poseen un gen defectuoso LEC1 que produce semillas no viables, ya que son intolerantes a la desecación y no llegan a completar su ciclo, lo que imposibilita su reproducción por vía sexual (Garcés *et al.*, 2007). Sin embargo la formación de plántulas en el margen de sus hojas ya sea por factores de inducción a estrés o de manera espontánea es muy similar al proceso de desarrollo de un embrión (Zhong *et al.*, 2013). La única diferencia radica en que en la plántula se producen raíces adventicias desde el hipocótilo basal (Garcés *et al.*, 2007).

La reproducción asexual de la Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) consiste en la formación de pequeños hijuelos en el ápice de sus hojas que al ser sembrados en suelo seco o permeable dará origen a las primeras raíces de una nueva planta (Catucuago, 2009). Algunas especies requieren de algún factor de inducción para la formación de dichos hijuelos (Zhong *et al.*, 2013). Sin embargo la Dulcamara posee la capacidad de producirlos constitutivamente o por sometimiento a condiciones de estrés (Garcés *et al.*, 2007). La separación de los hijuelos de la planta madre puede darse mecánica o espontáneamente según las condiciones en las que se encuentre la planta (Lucas, 2002).

1.4.1.6. Ciclo de vida.

Las especies del género *Kalanchoe* generalmente son consideradas como cultivos de maceta, por ello pueden tener un ciclo de vida anual o perenne, dependiendo de la manipulación de la planta por parte del jardinero u operario (Behe, 2003). Al cumplir el año de edad las plantas utilizan toda su energía para la formación de hijuelos en el ápice de sus hojas, los cuales al caer en el sustrato circundante de la planta dan origen a plántulas hijas que generan competencia por nutrientes, lo que puede causar estrés y consecuentemente la muerte de la misma (Behe, 2003). Por otro lado si las plántulas son removidas luego de su abscisión espontánea de la planta madre y son sembradas en un nuevo sustrato aparte, se puede crear un hábitat perenne tanto para la planta madre como para las plántulas hijas (Behe, 2003).

1.4.1.7. Posibles Polinizadores

Pese a que las especies de *Kalanchoe* tienen la capacidad de autofertilización mecánica al final del período de longevidad floral, se ha observado la presencia de algunas especies de áfidos que visitan la corola de las plantas a distintas horas del día (Grases *et al.*, 1998). Un ejemplo es el caso de *Trigona angustulata* que recolecta el polen de flores de *Kalanchoe pinnata* para que se efectúe el proceso de polinización (Grases *et al.*, 1998). Sin embargo, los resultados efectivos de este fenómeno son casi nulos, por lo que se concluye que las especies de *Kalanchoe* realizan autofertilización que promueve el contacto entre las partes reproductivas de la flor en ausencia de polinizadores (Grases *et al.*, 1998).

1.4.1.8. Plagas y enfermedades

Aunque las hojas de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) poseen compuestos con actividad insecticida y antibacteriana existen, ciertas plagas que

pueden parasitar sus hojas especialmente las zonas cercanas a los ápices (Brown, 2008). Puesto que ellas poseen mayor contenido de azúcares (Golkhandana *et al.*, 2013). Las plagas más comunes en las especies del género *Kalanchoe* son los arácnidos, formícidos y áfidos (Waterworth, 2013). Los áfidos se encuentra en simbiosis con los formícidos para de esta forma parasitar la superficie de las hojas de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) (Brown, 2008). Esta simbiosis se encuentra en asociación con algunas enfermedades bacterianas, virales y especialmente fúngicas que pueden llegar a representar un problema significativo de contaminación luego de su cultivo *in vitro* (Pella, 2011).

El Oidio es la enfermedad más común de las especies de *Kalanchoe* causada por diversos tipos de hongos de la familia de Erysiphaceae (Braun *et al.*, 2003). En el caso de la Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) es causada por *Oidium kalanchoe* U. Braun (Tuttle, 2004). Este hongo se caracteriza por la formación de una masa de aspecto blanco polvoriento que luego adquiere una apariencia de edemas oscuros o manchas amarillentas sobre la superficie de las hojas (Figura 3) (Kubitzki, 2007). Dichas manchas se esparcen a lo largo de toda la superficie foliar y causan necrosis del tejido (Braun *et al.*, 2003). Aunque la plaga del Oidio no llega a causar la muerte de la planta, puede producir la abscisión de sus hojas e incluso inhibir su crecimiento e impedir la floración normal (Waterworth, 2013).



Figura 3. *Oidium kalanchoe* sobre superficie de planta del género *Kalanchoe*
Fuente: (Mederos, 2016)

Pectobacterium carotovorum es una bacteria que causa putrefacción blanda en las hojas de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) (Golkhandana *et al.*, 2013). Esta puede producir la maceración de los tejidos que conduce a la muerte celular en las regiones afectadas de la planta (Aremu *et al.*, 2015). La afección comienza como una lesión húmeda pequeña en la hoja que se expande hasta que el tejido se vuelve blando (Reddy, 2015). Este fenómeno es el resultado de la producción de enzimas tales como proteasas y pectinasas por parte del microorganismo (Golkhandana, *et al.*, 2013). La enfermedad aparece en la parte basal del tallo progresando hacia arriba a todos los demás órganos de la planta, causando así marchitamiento de las hojas, tallo, pedúnculos y flores (Maila, 2013).

1.4.1.9. Composición Química

Investigaciones realizadas en *Kalanchoe pinnata* que es una de las especies más estudiadas de este género, afirman que los mayores constituyentes de sus hojas son los terpenoides (Nayak *et al.*, 2010) (Muzitano *et al.*, 2006). Estos consisten en un enorme grupo de compuestos cuyo esqueleto está constituido por unidades de isopreno (Dasgupta *et al.*, 2013). Los terpenoides son sustancias producidas por distintas plantas y algunos animales como mecanismo de defensa frente a depredadores, compuestos de señalización y reguladores del crecimiento (Breitmaie, 2006).

El estudio preliminar realizado por Pella (2011) con extractos hidroalcohólicos y etanólicos de las hojas de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*), indica la presencia de alcaloides, glicósidos, flavonoides y saponinas. Todos ellos son compuestos bioactivos con considerable actividad antioxidante, que juegan un papel crucial en investigaciones referentes a distintos tipos de cáncer (Saxena *et al.*, 2013). Por otro lado en extractos en éter de petróleo se encontraron aceites fijos y grasas (Pella, 2011). Adicionalmente, el perfil histoquímico de la planta indica la presencia

de esteroides y taninos que también son de gran importancia en la medicina (Dasgupta *et al.*, 2013).

1.4.1.10. Usos

La Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) tiene principalmente usos farmacológicos, y su popularidad ha aumentado debido a que existen estudios que correlacionan sus efectos terapéuticos con la cantidad de metabolitos secundarios que posee (De la Luz *et al.*, 2003) (Dasgupta *et al.*, 2013). Se considera un suplemento natural de compuestos antioxidantes (Breitbach *et al.*, 2013). Es utilizada como potente citotóxico que inhibe el crecimiento de masa tumoral en el cáncer de próstata (Shamaladevi *et al.*, 2016). Por sus propiedades inmunoestimulantes y renovadoras se la considera como potencial cura para el virus Epstein-Barr, reduciendo la carga viral en la sangre (Maisterra, 2016). Además es efectiva en el tratamiento de problemas urogenitales y como método anticonceptivo (Dasgupta *et al.*, 2013).

En la industria cosmética se la utiliza ampliamente dado que actúa como eficaz insecticida, antibacteriano y vasodilatador para la elaboración de cremas, exfoliantes y otros productos de uso tópico (Maila, 2013).

Por otro lado, la demanda de Dulcamara como planta ornamental ha incrementado los últimos años tanto para decoración de espacios exteriores como para interiores muy iluminados, debido a sus bajos requerimientos de riego y a su alta adaptabilidad a diversos climas y ambientes (Wieserma *et al.*, 2016).

1.4.2. Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se fundamenta en el principio de totipotencia celular vegetal (Calva *et al.*, 2005). Este afirma que una planta completa puede ser regenerada de una sola célula debido a que su material genético corresponde al de la planta madre (Pérez *et al.*, 1998). Su desarrollo se basa en la combinación de hormonas que controlan el crecimiento y desarrollo vegetal (Calva *et*

al., 2005). A partir de dicho conocimiento, combinado con técnicas microbiológicas para la producción de cultivos totalmente asépticos, provino la tecnología por la que plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en gran número sobre una receta precisa de nutrientes en un recipiente estéril (Reyes, 2014).

En la actualidad el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una herramienta para cruzamiento y producción en masa de cultivos de cosecha que involucran diversas especies de plantas (Morgan, 2013). Por otro lado, los cultivos de células o tejidos vegetales son una fuente innovadora de metabolitos secundarios importantes (Hussain *et al.*, 2012). Recientemente se han descubierto cultivos de células capaces de producir compuestos medicinales específicos a una tasa similar o superior a la de las plantas *in vivo* (Vijaya *et al.*, 2010). La ventaja frente al cultivo tradicional es que la síntesis de compuestos es independiente de las condiciones ambientales y de las fluctuaciones en la calidad de los mismos (Smetanska, 2008). Adicionalmente, a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se puede desarrollar un sistema de producción de fitoquímicos importantes a gran escala (Vijaya *et al.*, 2010).

1.4.2.1. Componentes del medio de cultivo

El medio de cultivo simula los nutrientes que se encuentran en el ambiente natural de la planta que son necesarios para su crecimiento y desarrollo (Roca *et al.*, 1993). Pueden variar dependiendo de la especie, de las necesidades y la finalidad del cultivo (Roca *et al.*, 1993). El medio de cultivo está compuesto principalmente por agua en un 95%, nutrientes y un agente gelificante que le da la consistencia dura para dar soporte a la planta (Segretín, 2011). En el componente acuoso se disuelven los nutrientes que se transportan mediante el sistema vascular a los diferentes órganos de la planta (Roca *et al.*, 1993). Es vital para el correcto desarrollo de la planta utilizar agua desionizada y destilada (Segretín, 2011).

La fuente de carbono es un componente esencial en el medio de cultivo ya que las células cultivadas *in vitro* generalmente son heterotróficas (Segretín, 2011). Los azúcares utilizados como fuente de carbono para el medio de cultivo son maltosa, sucrosa, lactosa, fructosa y glucosa (Segretín, 2011). Sin embargo la más común es la sacarosa en concentraciones del 2% al 4% (p/v) (Krikorian, 1995). Las sales minerales

son indispensables para el metabolismo de la planta luego de la fuente de carbono (Gamborg *et al.*, 1976). Se encuentran clasificadas en dos grandes grupos: macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Co, Zn, B, Mn, Mo, Cu, I) (Roca *et al.*, 1993). Es importante que la concentración de nitrato y de potasio sea de por lo menos 25 mM de cada uno (Gamborg *et al.*, 1976).

Las Vitaminas se agregan al medio de cultivo como un suplemento para la obtención de nitrógeno y coenzimas para el explante (Roca *et al.*, 1993). Sin embargo, existen algunas plantas que pueden producir sus propias vitaminas en el ambiente *in vitro* (Gamborg *et al.*, 1976). Las más utilizadas son tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (Roca *et al.*, 1993). En menor frecuencia se usan el ácido pantoténico, biotina, riboflavina, colina, cianocobalamina y ácido fólico (Krikorian, 1995).

Los fitoreguladores u hormonas para el crecimiento vegetal son compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores o fabricados artificialmente que modulan el desarrollo de la planta (Pérez, 1998). Tienen efectos fisiológicos que se utilizan en el cultivo *in vitro* para manipular la respuesta del explante en el medio (Fuentes *et al.*, 2005). Las respuestas generadas por los reguladores del crecimiento también dependen de la especie, del órgano del vegetal, estado de desarrollo, concentraciones endógenas y exógenas, interacciones entre reguladores de crecimiento y diversos factores ambientales (Morgan, 2013). Las diferentes fitohormonas se agrupan según su estructura y función en auxinas, citoquininas, giberelinas y brasinolidas (Roca *et al.*, 1993). Todas se pueden utilizar en distintas concentraciones ya sea individualmente o en combinación para inducir la respuesta esperada (Segretín, 2011).

Las auxinas esencialmente promueven la elongación celular y expansión de los tejidos (Davies, 2010). Regulan la diferenciación de raíces, dominancia apical y brotación floral (Krikorian, 1995). También se las utiliza en el cultivo *in vitro* para inducción de callogénesis, embriogénesis e inhibición del desarrollo de yemas axilares (Fuentes *et al.*, 2005). Por otro lado, las citoquininas estimulan la germinación, el desarrollo de yemas axilares (Davies, 2010). Inhiben la dominancia apical y el desarrollo de raíces adventicias, también retardan el envejecimiento (Krikorian, 1995). El Agente gelificante es un polisacárido con un alto peso molecular que es capaz de retener el agua y absorber compuestos (Morgan, 2013). Permite al medio de cultivo tomar una consistencia semisólida que funciona como soporte del explante,

permitiendo su desarrollo (Roca *et al.*, 1993). Existen otros componentes que no necesariamente son esenciales para el medio de cultivo, como el agua de coco y caseína hidrolizada que estimulan la división celular (Zang *et al.*, 2016). El carbón activado, ácido cítrico que actúan como antioxidantes (Morgan, 2013). También el extracto de malta, levadura, entre otras sustancias (Gamborg *et al.*, 1976).

1.4.2.1.1. Medio Murashige y Skoog (1962)

Es un medio basal para el crecimiento vegetal desarrollado por Toshio Murashige & Folke Skoog en 1962 para el crecimiento de tejidos de tabaco (Roca *et al.*, 1993). La características del medio son la combinación de concentraciones fijas de sales minerales macro y micronutrientes esenciales, vitaminas y reguladores del crecimiento para inducir a organogénesis y regeneración de plantas cultivadas *in vitro* (Morgan, 2013). Las células cultivadas en el medio MS generalmente no tienen requerimiento esencial de suplementos orgánicos como aminoácidos, caseína, extracto de levadura o agua de coco (Gamborg *et al.*, 1976). Una característica distintiva del medio MS es el alto contenido de nitrato, potasio y amonio comparado con otros medios nutritivos (Morgan, 2013).

El medio de Murashige y Skoog tiene éxito en el cultivo de callo *in vitro* en medios con agar (Morgan, 2013). También es ampliamente utilizado en la preparación de suspensiones celulares en medios líquidos (Gamborg *et al.*, 1976). Sin embargo, el uso más amplio de este medio es para la regeneración de órganos completos de plantas en la organogénesis *in vitro* (Calva *et al.*, 2005). Además, la mayor parte de medios nutritivos usados para el cultivo de tejidos vegetales son modificaciones en la concentración de suplementos orgánicos del medio original desarrollado por Murashige y Skoog en 1962 (Gamborg *et al.*, 1976).

1.4.2.2. Etapas del cultivo *in vitro*

1.4.2.2.1. Establecimiento

Consiste en la desinfección de los explantes, generalmente realizada con agentes como el hipoclorito de sodio, y su posterior adaptación al medio artificial de modo que se logre inducir la formación del órgano o tejido que se desee (Segretín, 2012). La fase de desinfección es muy importante en la etapa de establecimiento del cultivo de tejidos vegetales, es decir que estos sean liberados de cualquier tipo de agentes patógenos que afecten su crecimiento y desarrollo *in vitro* (Borges *et al.*, 2009). La contaminación es uno de los principales problemas que se han visto en el ambiente *in vitro* (Leifert *et al.*, 1994). Existen dos fuentes de las que se puede originar la contaminación: exógena, que se encuentra en la superficie o endógena, que se encuentra en el interior de los tejidos (Valentin, 2005).

Después de la desinfección y en condiciones de total asepsia se cultiva el tejido en el medio escogido dentro de la cámara de flujo laminar (Leifert *et al.*, 1994). El tamaño del explante es importante, puesto que se pueden reducir las probabilidades de contaminación e incrementar las de propagación de los tejidos (Pérez, 1998). El objetivo primordial en esta etapa es establecer el explante en el medio de cultivo e inducir al desarrollo de brotes múltiples para su posterior multiplicación (Borges *et al.*, 2009). Esto podría involucrar: estimulación en la formación de brotes axilares, iniciación de brotes adventicios (hojas, brotes, escamas de bulbos o material similar) y la formación de callo (Pérez, 1998).

1.4.2.2.2. Organogénesis

La organogénesis es el proceso de regeneración que ocurre mediante la formación de órganos de novo, como vástagos, raíces, flores, hojas, tallos, embriones, etc. (Hernández *et al.*, 2009). La organogénesis *in vitro* consiste en la percepción de

fitohormonas, la desdiferenciación de las células para adquirir la competencia organogénica, la reactivación y entrada de células quiescentes en el ciclo celular, y la organización de la división celular para formar los primordios y meristemas de órganos específicos (Munetaka, 1999). Puede ser directa si la regeneración de los nuevos órganos se produce directamente a partir de los tejidos de partida (Hernández *et al.*, 2009). Mientras que en la organogénesis indirecta se produce tras una desdiferenciación de los tejidos en un proceso llamado calogénesis (Figura 4) (Gupta, 2016).

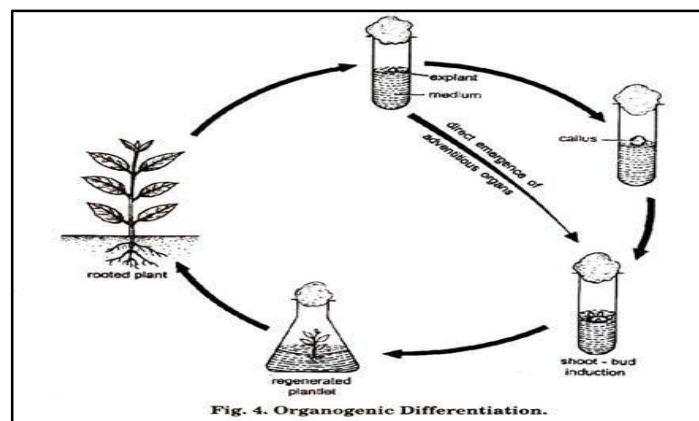


Figura 4. Organogénesis directa e indirecta *in vitro*
Fuente: (Gupta, 2016).

1.4.2.2.3. Multiplicación

La etapa de micropropagación o multiplicación consiste en generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias a partir de explantes ya desinfectados en el nuevo medio de cultivo (Figura 5) (Segretín, 2012). Uno de los requisitos para la conservación *ex situ*, el establecimiento de plantaciones y el mejoramiento genético es la producción de un gran número de plantas de germoplasma superior seleccionado (Khalafalla *et al.*, 2011). Adicionalmente, la micropropagación junto a la ingeniería genética es actualmente la técnica de biotecnología vegetal comercialmente más práctica y eficiente para la generación de grandes lotes de plantas clonales libres de agentes patógenos (Bopana *et al.*, 2009).

También representa la conexión entre la generación de plantas transgénicas y plantas somáticas (Loberant *et al.*, 2010).

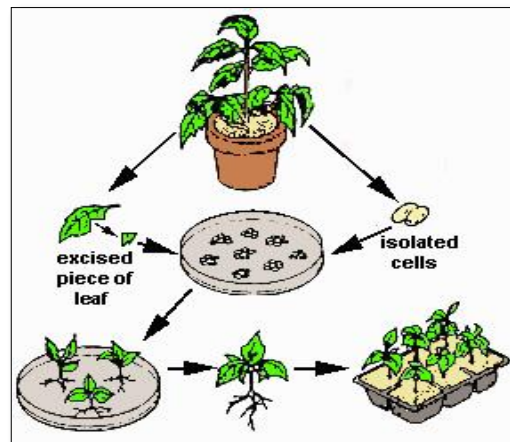


Figura 5. Multiplicación *in vitro*
Fuente:(Baghban, 2005).

1.4.2.2.4. Callogénesis

La callogénesis es una técnica que consiste en la inducción a la formación de tejido calloso mediante la combinación de fitoreguladores que controlan la dediferenciación de las células de dichos tejidos (Bhojwani *et al.*, 1996). El callo es una masa amorfa de tejido no organizado y poco diferenciado formado por células en proliferación que se producen tanto *in vivo* como *in vitro* (Espinosa *et al.*, 2012). Este tejido es obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados que posteriormente son llevados a una dediferenciación celular, presentando una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido (Figura 6) (Perez *et al.*, 2000).

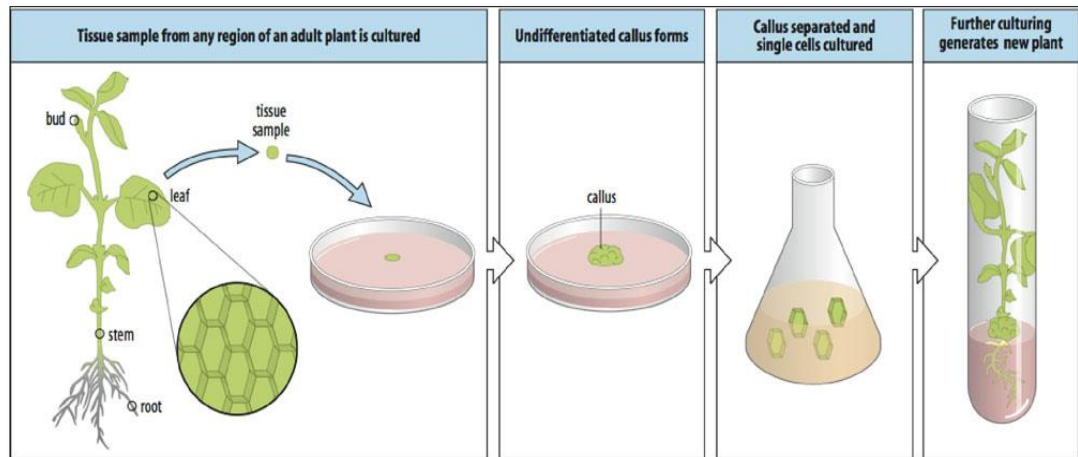


Figura 6. Esquema de la organogénesis indirecta a partir de un explante de hoja de una planta adulta

Fuente: (Bhojwani *et al.*, 1996).

La masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos que varían según la apariencia externa, textura y composición celular, pero por lo general son heterogéneos (Segretín, 2011). La coloración de este tejido también varía, aun derivando de la misma especie (Montoro *et al.*, 1993). Se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo (Montoro *et al.*, 1993). El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos o antocianinas (Perez *et al.*, 2000).

La callogénesis usualmente es inducida para un posterior proceso de organogénesis indirecta de plántulas que a menudo poseen variación somaclonal (Álvarez *et al.*, 2011). Adicionalmente, permite exponer características diferentes que no están expresadas normalmente en la naturaleza o bien eliminar alguna indeseable (Rodríguez *et al.*, 2014). Por otra parte, el cultivo de células a partir de callos podría ser utilizada para la producción de metabolitos secundarios de plantas a las que se atribuyen numerosas características medicinales, como efectos analgésicos, anti-inflamatorios, astringentes, actividad antimicrobiana y antioxidante de sus hojas (Delporte *et al.*, 2007). Así mismo, los callos son utilizados para realizar suspensiones celulares en la producción de embriones somáticos, lo que requiere una elevada concentración de auxinas en la etapa de inducción (Trabelsi *et al.*, 2010).

El callo vegetal puede ser clasificado en diferentes subgrupos basados en sus características macroscópicas (Ikeuchi *et al.*, 2013). Esta clasificación depende de diferentes factores, entre los que se encuentran las características genéticas de la planta madre, el tipo de explante utilizado y parámetros de cultivo como la concentración de auxinas y citoquininas (Montoro *et al.*, 1993). El callo sin regeneración de órganos aparente puede ser de tipo friable, cuando tiene apariencia suave y es fácilmente desintegrable; o compacto, cuando tiene apariencia dura y sus células se encuentran totalmente compactadas entre sí (Ikeuchi *et al.*, 2013). Cuando el callo tiene cierto grado de formación de órganos es llamado, callo rizogénico o embriogénico dependiendo de la estructura vegetal a la que da origen (Figura 7) (Ikeuchi *et al.*, 2013).

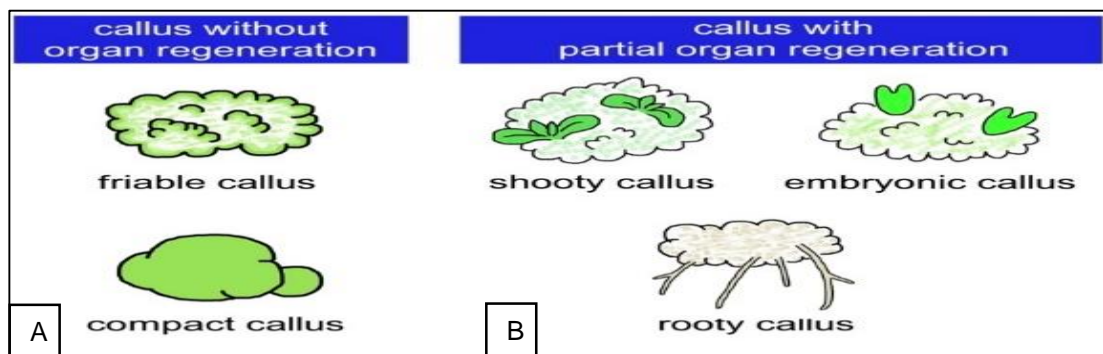


Figura 7. Tipos de callos. A. Tipos de callos sin aparente regeneración de órganos.
B. Tipos de callos con aparente regeneración de órganos

Fuente: (Ikeuchi *et al.*, 2013).

1.4.2.2.4.1. Fitoreguladores para callogénesis

1.4.2.2.4.1.1. 6-Benzil Aminopurina (BAP)

La 6-Benzil Aminopurina es una citoquinina sintética que estimula el crecimiento y germinación de las plantas mediante la división celular (Álvarez *et al.*, 2011). También induce el rompimiento del estado de dormancia en las semillas, inhibe el envejecimiento de los tejidos foliares, fija las flores y estimula la riqueza de los frutos (González *et al.*, 2009). En el proceso de callogénesis de plantas superiores y algas se ha evidenciado que altas concentraciones de 6-Benzil Aminopurina en combinación con auxinas incrementa la síntesis de proteínas y la actividad metabólica en los tejidos (Beraud *et al.*, 2014). Al aumentar la división celular se afectan los procesos de diferenciación, lo que estimula el crecimiento del tejido calloso (Villanueva *et al.*, 2013).

1.4.2.2.4.1.2. Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D)

El Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida sistémico hormonal auxínico muy común (Sanz, 2012). Es usado en el control de malezas de hoja ancha, puesto que selectivamente mata dichas malezas sin afectar los cultivos de interés (Loomis, 2015).

Su selectividad consiste en la aceleración de los procesos reguladores del crecimiento de las dicotiledóneas de hoja ancha, mientras que es inocuo para las gramíneas (Sanz, 2012).

Su mecanismo de acción imita el efecto de una auxina natural, lo que resulta en crecimiento del tejido sin control y eventualmente la muerte en algunas especies susceptibles (Dibbisa *et al.*, 2016).

Estudios realizados a nivel *in vitro* en varias especies vegetales con 2,4-D han evidenciado un gran aumento del tejido calloso en medios que contenían mayores concentraciones de la auxina sintética en comparación con aquellos que contenían menor o nula concentración de la misma, lo cual se debe a la inducción a un crecimiento desordenado de tejido desdiferenciado de las células de los explantes (Espinosa *et al.*, 2012).

1.4.3. Metabolitos Secundarios

Las plantas a diferencia de otros organismos destinan una cantidad significativa de carbono, nitrógeno y energía asimilados del suelo para la síntesis de una gran variedad de moléculas orgánicas (Gershenzon *et al.*, 2007). Algunas de estas moléculas no tienen participación directa en la fotosíntesis, respiración, en la asimilación de nutrientes o en el transporte de solutos (Ávalos *et al.*, 2009). Los metabolitos secundarios son moléculas que tienen más bien funciones de defensa en el organismo (Agostini-Costa *et al.*, 2012). A diferencia de los metabolitos primarios, la ausencia de los secundarios no afecta a la supervivencia de la planta, aunque muchas veces su crecimiento se puede ver afectado (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Los metabolitos secundarios se clasifican de acuerdo a su origen biosintético en Terpenos, Compuestos fenólicos, Glicósidos y Alcaloides, siendo sus precursores acetil-Coenzima A, ácido shikímico, ácido mevalónico y el 1-deoxylulosa 5-fosfato (Kibera *et al.*, 2014).

1.4.3.1. Clasificación de Metabolitos Secundarios

1.4.3.1.1. Terpenos

Los terpenos son un grupo de derivados poliméricos del isopreno, sintetizados a partir del acetato a través de la vía del ácido mevalónico (Ávalos *et al.*, 2009).

Durante su formación unidades de isopreno son ligadas en una distribución cabeza-cola para formar moléculas de distinto tamaño y forma (Figura 8) (Kabera, *et al.*, 2014). Estudios previos demuestran que una gran variedad de terpenos poseen propiedades antivirales y antimicrobianas (Breitmaie, 2006). De esta forma, su uso ha sido extendido no solo en el ámbito farmacológico para el tratamiento de enfermedades en seres humanos y animales; sino que también se los utiliza en la industria cosmética, de fragancias, saborizantes y especies (Gershenzon *et al.*, 2007).

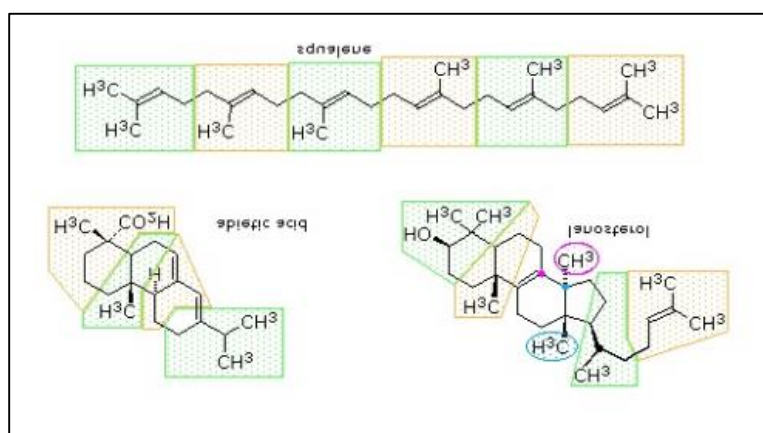


Figura 8. Estructura de Terpenos
Fuente: (Reusch, 2016).

1.4.3.1.2. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Su estructura se caracteriza por contener uno o varios anillos aromáticos con hidroxilos (Figura 9), y cuando estos se encuentran libres le confieren al compuesto la capacidad antioxidante, antiinflamatoria, bactericida, antiséptica y sobretodo anticancerígena (Park *et al.*, 2001). Muchos compuestos fenólicos se encuentran en diversas frutas y vegetales como ésteres o ácidos fenólicos (DiMeo *et al.*, 2013). Otros se encuentran conjugados con compuestos naturales o polimerizados en estructuras más grandes como taninos condensados y ligninas (Dai *et al.*, 2010).

La clasificación de los compuestos fenólicos se basa en el número de grupos hidroxílicos, sustitutos en el esqueleto de carbono y átomos de carbono en la cadena lateral (Dai *et al.*, 2010). Los prefijos utilizados para denominar a los compuestos fenólicos son mono, di, oligo y poli (Park *et al.*, 2001). Los flavonoides son el grupo más representativo de polifenoles pues cumplen muchas funciones de pigmentación en las flores y los frutos (Galeotti *et al.*, 2008). Poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante; debido a la reactividad del grupo fenol actúan como captadores de radicales libres neutralizando iones metálicos quelantes y peligrosas especies reactivas de oxígeno (Palomino *et al.*, 2009).

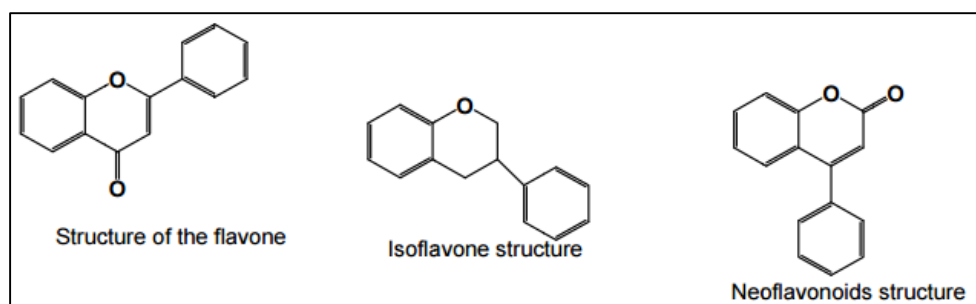


Figura 9. Esqueletos de diferentes tipos de Flavonoides

Fuente: (Kabera *et al.*, 2014).

1.4.3.1.3. Glicósidos

Los glicósidos se encuentran compuestos por grupos fenoles, alcoholes o sulfuros unidos por ligandos especiales a una o más porciones de azúcares que son activados por hidrólisis enzimática (Polt, 1995). Algunas plantas guardan ciertos químicos en forma de glicósidos inactivados, por esta razón son clasificados como precursores de drogas (Ávalos *et al.*, 2009). Permanecen inactivos hasta que son hidrolizados para la liberación de agliconas activas (Agostini-Costa *et al.*, 2012). En cuanto a la acción terapéutica de los glicósidos, diversos estudios han demostrado que poseen propiedades anticancerígenas, expectorantes, sedativas y digestivas (Dimitrios, 2006). Dichas propiedades dependen de la naturaleza de la aglicona, puesto que los enlaces glicosídicos unen una gran cantidad de grupos funcionales, así como monosacáridos para formar oligo y polisacáridos (Newman *et al.*, 2008).

1.4.3.1.4. Alcaloides

Los alcaloides son un grupo de metabolitos secundarios biosintetizados a partir de aminoácidos como la tirosina, que poseen bases nitrogenadas en su estructura (Nicolaou *et al.*, 2011). En este grupo se incluyen aquellos compuestos que contienen propiedades neutrales o de ácidos débiles (Agostini-Costa *et al.*, 2012). Su principal característica es que producen efectos alucinógenos (Kabera *et al.*, 2014). Los alcaloides son producidos por una gran variedad de organismos incluidos plantas, bacterias, hongos y generalmente son tóxicos para otros organismos (Nicolaou *et al.*, 2011). Sin embargo, tienen diversos efectos farmacológicos, por lo que han sido ampliamente utilizados en medicina (Kabera *et al.*, 2014).

1.4.3.2. Actividad Antioxidante

La eficacia de los agentes antioxidantes fenólicos es generalmente proporcional al número de grupos hidroxilo (OH) presentes en sus anillos aromáticos (Dimitrios, 2006). De acuerdo a esto, los compuestos naturales pueden tener una mejor actividad antioxidante que los compuestos sintéticos utilizados actualmente (White *et al.*, 2014). De esta forma, se han convertido en un ingrediente particularmente atractivo para los alimentos comerciales (White *et al.*, 2014). Los derivados de flavonoides son una extensa subclase de polifenoles con una capacidad poderosa de captura o de barrido de radicales libres mediante la transferencia del átomo de hidrógeno presente en el grupo hidroxilo hacia el radical libre (Figura 10) (Di Meo *et al.*, 2013).

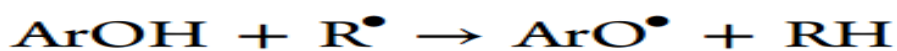


Figura 10. Transferencia de átomo de hidrogeno desde un flavonoide hacia un radical libre

Fuente: (DiMeo *et al.*, 2013).

1.4.3.3. Reactivo de Folin-Ciocalteu

El Reactivo de Folin Ciocalteu es un complejo de fosfotungsteno-fosfomolibdeno usado para medir la concentración total de grupos fenólicos en un extracto vegetal (Ainsworth *et al.*, 2007). Al entrar en contacto con una solución alcalina (bicarbonato de sodio), se produce una oxidación de los polifenoles y se libera un cromóforo azul que es medible por espectrofotometría a una longitud de onda entre 660 y 750 nm (Ciccoa *et al.*, 2008). La máxima absorción de cromóforos depende de la solución alcalina y de la composición cuantitativa y cualitativa de compuestos fenólicos (Blainski *et al.*, 2013). Adicionalmente, el compuesto incluye sales de litio para contrarrestar la turbidez de la muestra producida por precipitación del exceso de reactivo (Blainski *et al.*, 2013).

1.4.3.4. 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH)

El reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) es utilizado para la cuantificación de la capacidad de barrido de radicales libres de compuestos puros o de extractos de plantas (Scherer *et al.*, 2008). La reacción se basa en la degradación del color que ocurre cuando el electrón impar del átomo de nitrógeno de la molécula de DPPH es reducida al recibir un átomo de hidrógeno de los compuestos antioxidantes (Sharma *et al.*, 2009). El DPPH es conocido como un radical libre estable, sin embargo es sensible a la luz, al oxígeno, al pH y al tipo de disolvente usado, debido a su electrón desapareado en el puente de nitrógeno (Sharma *et al.*, 2009).

1.5. Hipótesis

Con un protocolo de desinfección y un balance de auxina-citoquinina adecuados se proporciona las condiciones necesarias para la inducción a la formación de callo no embriogénico friable para la obtención de compuestos fenólicos y antioxidantes de explantes de hoja *in vitro* de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*).

2. CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del ensayo

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, localizada en Sangolquí, Av. El Progreso, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; a una altitud de 2516 msnm.

2.1. Fase de Campo

2.1.1. Obtención de plantas

Para la ejecución de este proyecto de investigación se recolectaron plantas de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) de la Reserva Biológica Jatun Sacha, ubicada en la ciudad de Tena en la provincia de Napo, Ecuador, a una altitud de 510 msnm las mismas que fueron trasladadas al invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE para su tratamiento fitosanitario. Las plantas recolectadas tenían un año de edad debido a que la mayor producción de metabolitos secundarios ocurre cuando el explante proviene de plantas adultas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri* (Ibrahim *et al.*, 2006). Una vez trasladadas al invernadero se las transplantó en fundas y macetas de plástico que contenían 2 partes de tierra y una de abono orgánico (Figura 11).



Figura 11. Plantas de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* en el invernadero del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

El riego de las plantas previo a la introducción se lo realizó una vez cada 10 días, y en temporada lluviosa una vez cada 15 días puesto que las plantas no resisten condiciones de alta humedad, tendiendo a la putrefacción de sus hojas (Lucas, 2002).

2.1.2. Tratamiento Fitosanitario

Previo a la introducción *in vitro* de explantes de hoja de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* se realizó el tratamiento fitosanitario que consiste en la aplicación de una mezcla de fungicida sistémico (BENOMIL) 1% (P/V) y un fungicida de contacto (CAPTAN) una concentración del 1% (P/V), con la ayuda de un aspersor, una vez por semana durante un mes previo a la introducción de los explantes *in vitro*.

Luego de un mes de transportadas las plantas al invernadero de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, sus hojas fueron parasitadas por áfidos, por lo que se preparó una solución de detergente al 1% (P/V), y con esta se lavaron todas las hojas de la planta, fregándolas con una esponja de lavar platos para que todos los insectos que se encontraban adheridos a la superficie de las hojas se separen totalmente.

2.2. Fase de Laboratorio

La fase de laboratorio se llevó a cabo en los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí.

2.2.1. Desinfección e Introducción de explantes

Una vez que las plantas madre han finalizado el tratamiento fitosanitario, se seleccionaron las hojas más jóvenes para iniciar la etapa de desinfección de explantes e introducción, puesto que ellas son las que tienen mayor probabilidad de producir metabolitos secundarios *in vitro* (Wiggins *et al.*, 2016). Para la ejecución del protocolo de desinfección de explantes de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) se eligió un agente desinfectante que ha sido utilizado en estudios previos de desinfección en explantes de hoja del género *Kalanchoe* como el hipoclorito de sodio (NaClO) (Naz *et al.*, 2008). Se probó 3 tiempos para la inmersión de los explantes en 3 concentraciones distintas de hipoclorito de sodio, dando como resultado dicha combinación en 9 tratamientos con 20 repeticiones por cada uno. Las combinaciones de niveles de tiempo de inmersión y concentración de hipoclorito de sodio de cada tratamiento de desinfección se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.
Tratamientos formados por la combinación de niveles de concentración de NaClO y tiempo de inmersión.

| Tratamiento | Concentración hipoclorito de sodio (% V/V) | Tiempo inmersión (min) |
|-------------|--|------------------------|
| T1 | 1,5 | 15 |
| T2 | 2 | 15 |
| T3 | 2,5 | 15 |
| T4 | 1,5 | 20 |
| T5 | 2 | 20 |
| T6 | 2,5 | 20 |
| T7 | 1,5 | 25 |
| T8 | 2 | 25 |
| T9 | 2,5 | 25 |

Previo al tratamiento de los explantes de *Kalanchoe gastonis bonnieri* con hipoclorito de sodio (NaClO), se los dejó remojar en agua corriente durante 60 minutos, antes de sumergirlos en una solución de detergente al 1% (P/V) durante 30 minutos, luego de realizar 3 lavados con agua destilada estéril, se sumergieron los explantes en una solución de CAPTAN (Fungicida de contacto) y BENOMIL (Fungicida sistémico) los dos a una concentración de 1% (P/V) lo que espera solucionar el problema de contaminación por el hongo *Oidium kalanchoe* muy común en el cultivo *in vitro* de la presente especie vegetal (Braun *et al.*, 2003), posterior a esto se realizaron 3 lavados de los explantes con ADE, para finalmente proceder a la inmersión de los mismos en las distintas concentraciones de hipoclorito de sodio (NaClO) (Tabla 1). A cada una de las 9 soluciones de hipoclorito de sodio (NaClO) se adicionaron 10 gotas por litro de Tween 20, agente tensioactivo que disminuye la tensión superficial (Ruiz, 2009).

Para proceder a la siembra de los explantes, dentro de cámara se realizaron 3 lavados con ADE y luego se retiró la parte necrosada por el tratamiento con hipoclorito de sodio (NaClO) que a tiempos prolongados es muy abrasivo para los explantes, para luego sembrar la parte verde en forma de cuadros pequeños (Malajovich, 2008). El proceso de desinfección, incluidos los tratamientos con hipoclorito de sodio (NaClO) se describen en la Figura 12.

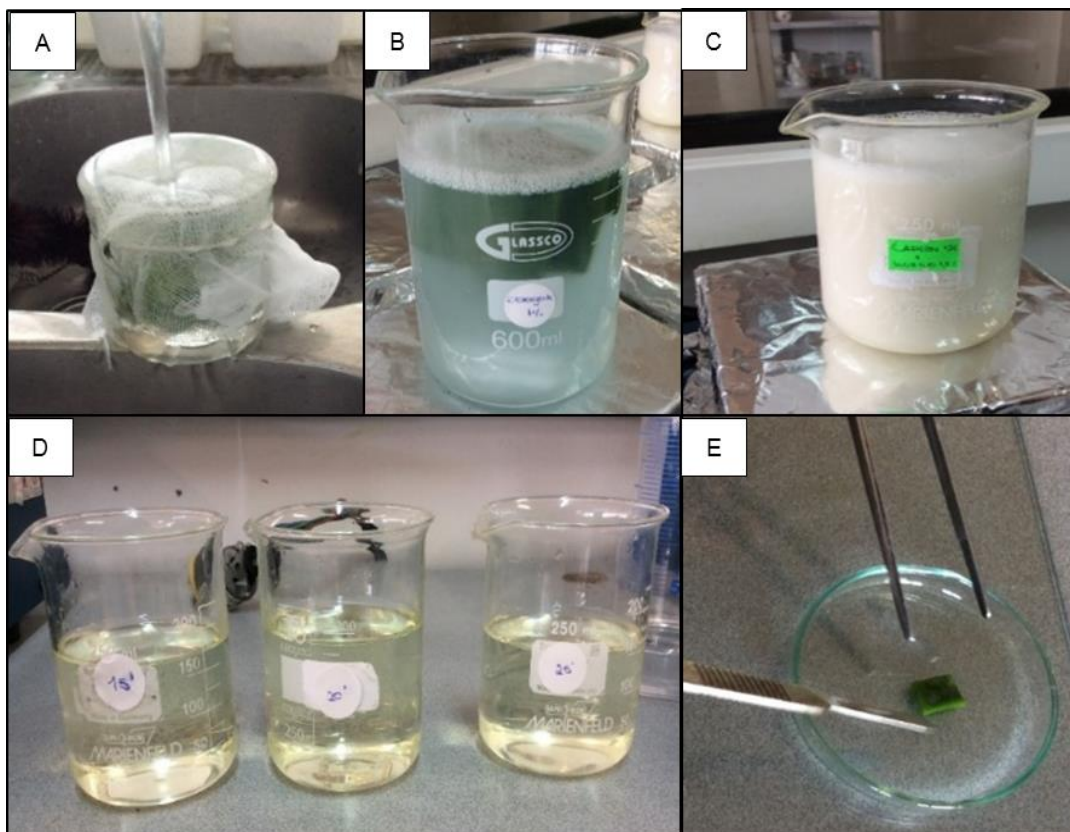


Figura 12. Protocolo de desinfección. A. Explantes en agua corriente. B. Detergente al 1%. C. Captan+Benomil 1.5%. E. Tratamientos con tres concentraciones de hipoclorito de sodio. F. Cortes de explantes en cámara de siembra.

El medio utilizado en la siembra de los explantes fue Murashige y Skoog (1962) suplementado con vitaminas ajustado a un pH de 5.8 con 7.5 g L^{-1} de bactoagar, puesto que Khan *et al.* (2006) sugiere que existe un insignificante rol de hormonas de crecimiento en la multiplicación y organogénesis de plantas del género *Kalanchoe*.

Adicionalmente este medio basal se encuentra suplementado con una concentración de sacarosa de 50 g L^{-1} , puesto que las especies del género *Kalanchoe* presentan un desarrollo más favorable en medios con alto contenido de azúcares (Tejakhod *et al.*, 2009). Se dispensaron 30 mL de medio en frascos de vidrio que fueron esterilizados a 121°C por 25 minutos. Luego de esto se incubaron a 20°C y la evaluación de la contaminación se realizó a los 7 y 21 días después de la siembra. Durante esta etapa se realizaron 20 repeticiones de cada tratamiento, incluyendo al tratamiento control, considerando cada explante como unidad experimental, es decir que se tienen 10 frascos y 20 explantes en cada uno para la etapa de desinfección.

En el establecimiento de un protocolo de desinfección adecuado para la introducción de explantes *in vitro*, se aceptó como válido solamente aquel que dé como resultado una viabilidad del explante superior al 80%, es decir que máximo puede poseer una contaminación y oxidación de hasta el 20% de los explantes totales (Malajovich, 2008). Las variables de respuesta para la presente etapa fueron contaminación por hongo o bacteria y oxidación del explante, lo que dio como resultado una variable total llamada viabilidad del explante. Dichas variables fueron analizadas a los 7 y 21 días después de la siembra.

Contaminación. Para la variable contaminación se evaluó cada uno de los frascos mediante observación y se asignó el valor de “1” a cada explante contaminado, sea por hongo o bacteria y a los explantes no contaminados se les asignó el valor de “0”.

Oxidación. Esta variable fue medida mediante observación y a los explantes que presentaron oxidación se le asignó el valor de “1”, caso contrario se le asignó el valor de “0”.

Viabilidad Total. Esta variable es el compendio de las dos variables evaluadas anteriormente a los 21 días de la siembra. Los explantes que presentaron el valor de “0” en las dos variables expuestas anteriormente se les asignó el valor de “1” en la variable viabilidad total, caso contrario se les asignó el valor de “0”.

Los tratamientos utilizados en esta fase fueron evaluados mediante un análisis inferencial en el software estadístico *SPSS* que consistió en la aplicación de un test de independencia χ^2 (x^2) para determinar si las variables empleadas con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$) se correlacionan entre sí. La hipótesis nula afirma que existe independencia entre las distintas variables.

Los explantes viables de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*), que presentaron desarrollo de pequeños brotes alrededor del mismo, se consideraron listos para ser multiplicados en un nuevo medio de cultivo que indujere a la regeneración total de una nueva plántula.

2.2.2. Multiplicación

En esta etapa el objetivo fue obtener la mayor cantidad de plántulas nuevas a partir de cada explante de hoja previamente desinfectado e introducido en la etapa anterior. Cada una de las estructuras se dividió y se transplantó en un nuevo medio de cultivo (Baghban, 2005).

Para la multiplicación de las plántulas de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) se utilizó el mismo medio de cultivo empleado en la introducción, es decir un medio basal Murashige y Skoog (1962) suplementado con 50 gL⁻¹ de azúcar, puesto que este tiene el potencial para inducir el desarrollo de pequeños brotes que dan origen a una nueva planta completa, esto se debe a que el género *Kalanchoe* posee la capacidad de regeneración de una nueva planta por embriogénesis somática (Tejakhod *et al.*, 2009). Los explantes elegidos para la multiplicación fueron hojas *in vitro* puesto que éstas poseen la capacidad de regenerar una planta nueva a partir de los hijuelos que crecen en los ápices de las hojas (Tejakhod & Chu, 2009).

2.2.3. Inducción de callo

Una vez obtenidas nuevas plántulas completas, luego del proceso de multiplicación, se seleccionó aquellas que tenían aproximadamente un mes desde la aparición del primer brote. Adicionalmente se escogieron explantes de hoja *in vitro* adecuados para la formación de callo, es decir aquellos que presentaron una longitud y tiempo de desarrollo intermedio. Dentro de la cámara de flujo laminar y en condiciones totalmente asépticas, se cortó los explantes de hoja *in vitro* para colocarlos en los medios pertenecientes a los tratamientos de inducción a callogénesis “M1”, “M2”, “M3” y en el medio control “MC” (Tabla 6), que consistieron en un medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 50 gL⁻¹ de sacarosa, puesto que esta favorece la inducción a la formación de callo (Zhao *et al.*, 1998), con un pH se ajustado a 5.8 y 7.5 g L⁻¹ de bactoagar (Roca *et al.*, 1993).

Para la inducción a callo en esta etapa se escogieron como fitoreguladores al ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), que es una auxina sintética ampliamente utilizada para la inducción a la desdiferenciación de las células y a la benziladenina (BAP) que es un citoquinina que promueve la formación de brotes (Rivero *et al.*, 2008). El tratamiento control y las diferentes combinaciones de fitoreguladores escogidas para el desarrollo del callo a partir de explantes de hoja *in vitro* de Dulcamara se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.
Tratamientos para la etapa de inducción a callogénesis de explantes de hoja *in vitro* de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*).

| Tratamiento | Tipo de Explante | Medio | Concentración de BAP | Concentración de 2,4-D |
|-------------|------------------|-------|----------------------|------------------------|
| TC | Hoja | MC | 0 | 0 |
| T1 | Hoja | M1 | 0.5 | 0.25 |
| T2 | Hoja | M2 | 1 | 0.5 |
| T3 | Hoja | M3 | 1 | 1 |

Treinta mL de medio de cultivo fueron dispensados en frascos de vidrio, y luego de la siembra se incubaron a 20 °C en oscuridad y humedad relativa del 50%. Durante esta etapa se realizaron 20 repeticiones por cada tratamiento incluyendo el tratamiento control “TC”, para lo que se sembraron dos explantes en cada frasco y se tomó como unidad experimental cada explante sembrado. Se consideró como variables de respuesta la presencia o ausencia de callo evaluada a los 30 y 60 días después de la siembra y la oxidación del explante igualmente evaluada a los 30 y 60 días de la siembra.

Presencia de Callo. La formación de tejido calloso se evaluó por medio de observación del explante a los 30 y 60 días después de la siembra. La respuesta positiva obtuvo la calificación de “1”, mientras que si no existió presencia de tejido calloso en el explante, se le asignó el valor de “0”.

Oxidación del Callo. Se evaluó por observación la oxidación del explante a los 30 y 60 días después de la siembra, la respuesta positiva obtuvo el valor de “1”, mientras que la respuesta negativa obtuvo el valor de “0” como calificación.

Los tratamientos utilizados en esta fase fueron evaluados mediante un análisis inferencial en el software estadístico *SPSS* que consistió en la aplicación de un test de independencia χ^2 (x^2) para determinar si las variables empleadas con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$) son dependientes entre sí. La hipótesis nula afirma que existe independencia entre las distintas variables.

2.2.4. Análisis Químico

El Análisis Químico se realizó con hoja *in vivo* e *in vitro* y callo no organogénico friable de hoja *in vitro* de dos etapas diferentes (60 días y 270 días). Las hojas *in vivo* e *in vitro* fueron secadas en una estufa a 30°C hasta que perdieron toda su humedad, luego se las pulverizó con un mortero y se guardó el polvo fino obtenido en un tubo Falcon hasta su análisis. Los callos seleccionados para el ensayo fueron almacenados en oscuridad hasta el momento de su análisis (Ainsworth *et al.*, 2007). La preparación de los extractos de hoja *in vivo* e *in vitro* consistió en agregar 0,1069 g de polvo fino a 10 mL de una solución de metanol: solución HCl (1N) en proporción (1:3), mientras que para el extracto de callo se tomó 1,5 g de cada callo y se agregó 3 mL de solución de metanol: solución HCl (1N) en proporción (1:3). Todos los extractos fueron mantenidos en maceración a temperatura ambiente y en oscuridad durante 48 horas, para mejorar la extracción de los principios activos de la planta (Ainsworth *et al.*, 2007). Una vez cumplido el tiempo de maceración, se centrifugó cada extracto y se obtuvo el sobrenadante con una micropipeta (Ainsworth *et al.*, 2007).

2.2.4.1. Determinación de contenido de fenoles

El contenido de fenoles se determinó utilizando la técnica de óxido-reducción de Folin-Ciocalteu (Ciccoa *et al.*, 2008), que se basa en una reacción colorimétrica medida por espectrofotometría. Para la preparación de la curva de calibración, se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0,5%) y a partir de esta se preparó varias soluciones tomando 0, 1, 2, 3, 5, 10 mL en 100 mL de agua destilada (Ainsworth *et al.*, 2007). La determinación de los fenoles se basó en preparar un blanco agregando

0.1 mL de metanol:HCl (1N) (1:3) con 1.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (10%), luego se agitó y colocó 1.4 mL de Bicarbonato de Sodio (7.5%) (Ainsworth *et al.*, 2007).

Para el análisis de las muestras se colocó 0.1 mL del extracto con 1.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (10%) y se agitó en vórtex a una velocidad de 500 rps. Se adicionó 1.4 mL de bicarbonato de sodio (7.5%). y se dejó reposar durante 30 minutos en Baño María y bajo sombra. Inmediatamente se colocó 1 mL de la muestra en la celda del espectrofotómetro para medir la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm, la que fue interpolada en la curva de calibración realizada con la solución de ácido gálico (0,5%) (Ainsworth *et al.*, 2007).

El ensayo se realizó por triplicado para cada solución estándar y muestra. La variable de respuesta es la concentración de fenoles en la muestra en mg de ácido gálico/g de muestra seca, calculada a partir de la absorbancia a 765 nm.

Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramos de muestra seca. Esta medida se calcula a partir de la concentración en mgL^{-1} obtenida de las lecturas realizadas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm, dicho valor es multiplicado por el volumen total del extracto utilizado y dividido para el peso de la muestra, como se muestra en la ecuación 1.

$$\frac{\text{Mg equivalentes de ácido gálico}}{\text{gramos de muestra seca}} = \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \times \frac{\text{volumen total del extracto utilizado}}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

Ecuación 1. Miligramos equivalentes de ácido gálico por gramos de muestra seca.

El procesamiento de los datos se realizó con un análisis de medias y una desviación estándar para detectar la muestra con el mayor contenido de fenoles en mg de ácido gálico/g de muestra seca.

2.2.4.2.Determinación de Capacidad Antioxidante

El ensayo de determinación de la capacidad o carácter antioxidante de los extractos de hoja *in vivo* e *in vitro* y de callo de 60 y 270 días, se realizó utilizando la técnica de captación de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), que consiste en un compuesto cristalino radicalario estable (Milardovic *et al.*, 2006). A través de este ensayo se determinó la concentración de compuestos antioxidantes capaces de captar o eliminar los radicales libres del reactivo DPPH (Milardovic *et al.*, 2006).

En la preparación de la curva de calibración, se partió de una solución estándar del reactivo DPPH a una concentración de 0,05 mM y se preparó varias soluciones tomando 0, 1, 2, 3, 5, 10 mL en 100 mL de agua destilada. El ensayo se basó en un blanco y un control, preparados de la siguiente manera:

Blanco: 3.3 mL de Metanol:HCl (1N) (1:3)

0.5 mL de extracto

Control: 3.5 mL de Metanol:HCl (1N) (1:3)

0.3 mL de DPPH (0.5mM).

El ensayo consistió en agregar 0.5 mL de muestra, 3 mL de Metanol:HCl (1N) (1:3) y 0.3 mL de solución de DPPH (0.5 mM), y se incubó durante 30 minutos oscuridad. Después de este tiempo, se colocó 1 mL de cada muestra en una celda del espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 517 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada solución estándar y muestra. La variable de respuesta para esta etapa es el porcentaje de radicales libres de DPPH eliminados.

Porcentaje de radicales libres de DPPH eliminados. Esta variable se calculó a partir de la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. Para este cálculo, investigadores han propuesto 3 ecuaciones.

$$\%DPPH = \frac{|Absorbancia\ del\ control - Absorbancia\ de\ la\ muestra|}{|Absorbancia\ del\ control|} \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de radicales libres de DPPH eliminados

Fuente: (Alam *et al.*, 2013).

Sin embargo, Milardovic y colaboradores (2006) recomiendan que para tener datos más exactos se utilice la concentración en mgL^{-1} del control, obtenida con la curva de calibración en lugar de utilizar su absorbancia medida a 517 nm, como muestra la Ecuación 2.

$$\%DPPH = \frac{|[Control\ (\frac{mg}{L})] - [muestra\ (\frac{mg}{L})]|}{[Control\ (\frac{mg}{L})]} \times 100$$

Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de radicales libres de DPPH eliminados

Fuente: (Milardovic *et al.*, 2006).

También, Zhu (2006), propuso la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de actividad antioxidante:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left(1 - \frac{Abs\ muestra}{Abs\ control}\right) \times 100$$

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = 100 - \left[\left(\frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control}\right) \times 100\right]$$

Ecuación 4. Cálculo del porcentaje de radicales libres de DPPH eliminados

Fuente: (Zhu, 2006).

En el ensayo se determinó el porcentaje de actividad antioxidante mediante la fórmula propuesta por Milardovic y colaboradores (2006), el procesamiento de los datos se realizó mediante un análisis de medias y de desviación estándar para determinar las muestras que provocan el mayor porcentaje de eliminación de radicales libres de DPPH.

Puesto que los resultados en la presente etapa tienen una distribución normal, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de los datos recopilados para cada muestra, el nivel de confianza establecido es del 95%. Adicionalmente, se realizó un test de comparación de Tukey para determinar los grupos de tratamientos con medias que no son significativamente diferentes entre sí. Las pruebas anteriormente mencionadas se ejecutaron en el software estadístico *Infostat*.

3. CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Desinfección e Introducción de explantes

Una vez que las plantas madre finalizaron el tratamiento fitosanitario, se realizó la selección y desinfección de explantes en condiciones totalmente asépticas. Las variables de respuesta para este ensayo fueron: contaminación del explante por hongo o bacteria, oxidación del explante y una variable resumen llamada viabilidad total del explante, los resultados de la presente etapa se registraron en el Anexo 1. Las Figuras 13, 14 y 15 muestran los resultados de contaminación de explantes por hongo y bacteria.

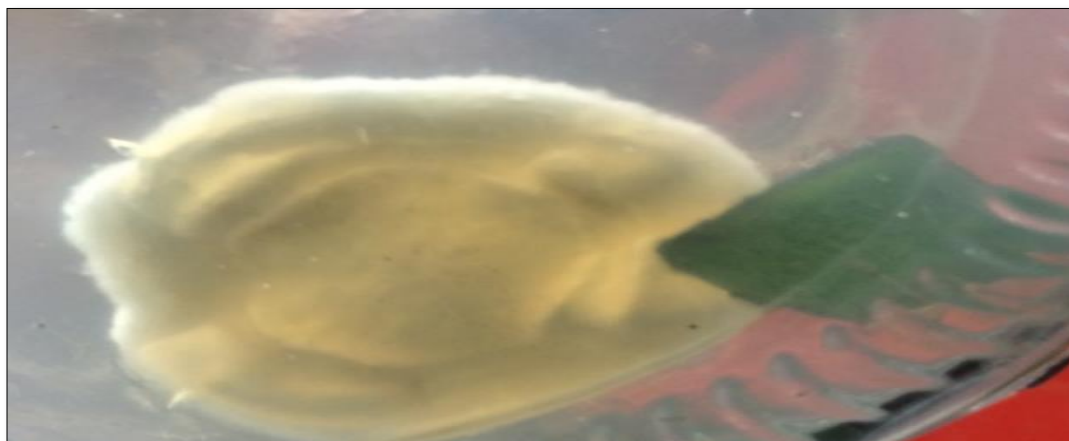


Figura 13. Explante de *Dulcamara Kalanchoe gastonis bonnieri* contaminado con hongo en el tratamiento de desinfección “T4” a los 21 días de la siembra.



Figura 14. Explante de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* contaminado con bacteria en el tratamiento de desinfección “T5” a los 21 días de la siembra.

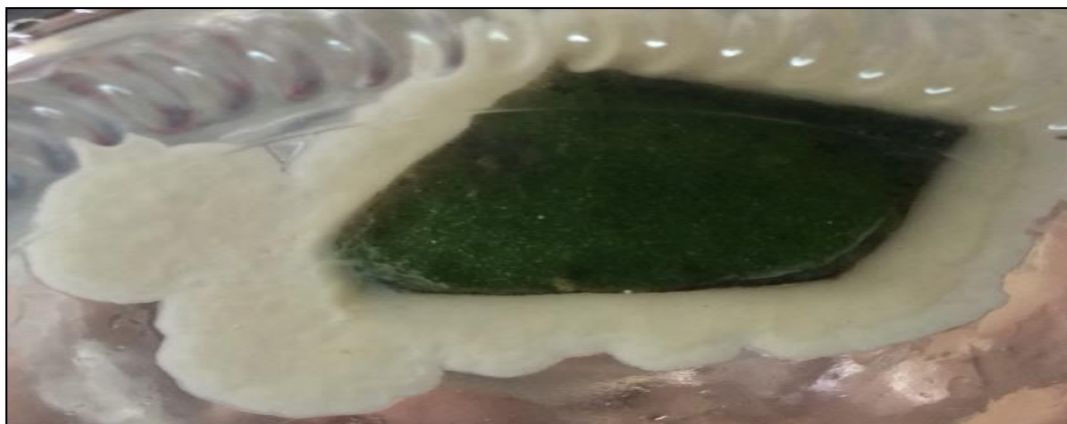


Figura 15. Explante de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* contaminado con bacteria endógena en el tratamiento de desinfección “T2” a los 21 días de la siembra.

3.1.1. Contaminación del explante

3.1.1.1. Análisis exploratorio de datos

Para la evaluación de la variable contaminación del explante de los 9 tratamientos de desinfección de explantes de hoja de Dulcamara *Kalanchoe gastonis-bonnieri* (Tabla 1), se realizó la toma de datos a los 7 y 21 días registrados en el Anexo 1. En la tabla de contingencia (Tabla 3) se expone el número de explantes contaminados y no contaminados a los 7 días de siembra. Por otro lado la figura 16, muestra que los tratamientos con mayor número de explantes contaminados fueron “T1”, “T4” y “T7” con 10%, mientras que “T3”, “T5”, “T6”, “T8” y “T9”, tuvieron un 0% de contaminación. El tratamiento “T2” tiene una contaminación del 5%. Adicionalmente se pueden observar los porcentajes de explantes contaminados con hongo y aquellos contaminados con bacteria a los 7 días de siembra. Se observa que el tratamiento “T7” presentó contaminación por bacteria, los tratamientos “T1” y “T4” presentaron contaminación por hongo, mientras que el tratamiento “T2” presentó contaminación por hongo y bacteria simultáneamente.

Tabla 3.

Tabla de contingencia de la variable contaminación del explante de *Kalanchoe gastonis bonnieri* a los 7 días de la siembra.

| Tratamiento | Número de explantes contaminados | Número de explantes no contaminados |
|-------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| T1 | 2 | 18 |
| T2 | 2 | 18 |
| T3 | 0 | 20 |
| T4 | 4 | 16 |
| T5 | 0 | 20 |
| T6 | 0 | 20 |
| T7 | 2 | 18 |
| T8 | 0 | 20 |
| T9 | 0 | 20 |

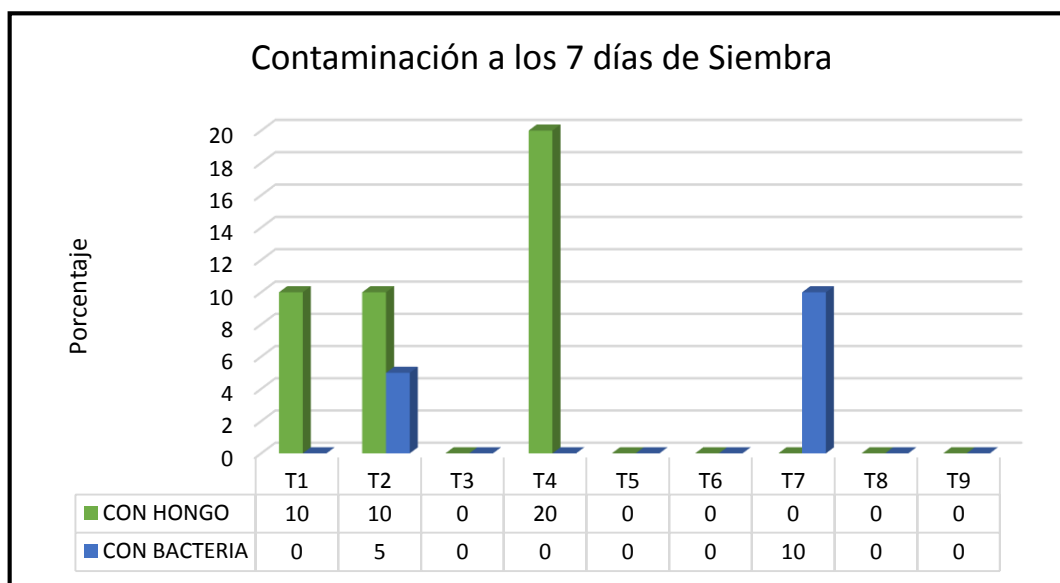


Figura 16. Gráfica de porcentajes de contaminación de los explantes de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* a los 7 días de la siembra. Color verde=contaminación por hongo. Color azul=contaminación por bacteria.

La tabla de contingencia (Tabla 4) muestra los resultados de contaminación de los explantes a los 21 días de la siembra. Se puede observar que el tratamiento “T4” obtuvo el mayor porcentaje de explantes contaminados con el 35%, mientras que los

tratamientos con menor porcentaje de contaminación de explantes fueron los tratamientos “T3”, “T6”, “T8” y “T9” con 0% de contaminación.

Tabla 4.

Tabla de contingencia para los resultados obtenidos para la variable contaminación del explante a los 21 días de la siembra

| Tratamiento | Número de explantes contaminados | Número de explantes no contaminados |
|--------------------|---|--|
| T1 | 2 | 18 |
| T2 | 2 | 18 |
| T3 | 0 | 20 |
| T4 | 7 | 13 |
| T5 | 2 | 18 |
| T6 | 0 | 20 |
| T7 | 2 | 18 |
| T8 | 0 | 20 |
| T9 | 0 | 20 |

La figura 17 muestra la gráfica de porcentajes de contaminación de explantes de Dulcamara (*Kalanchoe gastonis bonnieri*) a los 21 días de realizada la siembra (Anexo 1), donde se pueden observar que los tratamientos “T4” y “T5” presentaron contaminación por bacteria alrededor del explante luego de la primera toma de datos a los 7 días de la siembra, mientras que ningún tratamiento presentó contaminación por hongo en los 7 días posteriores a la primera toma de datos.

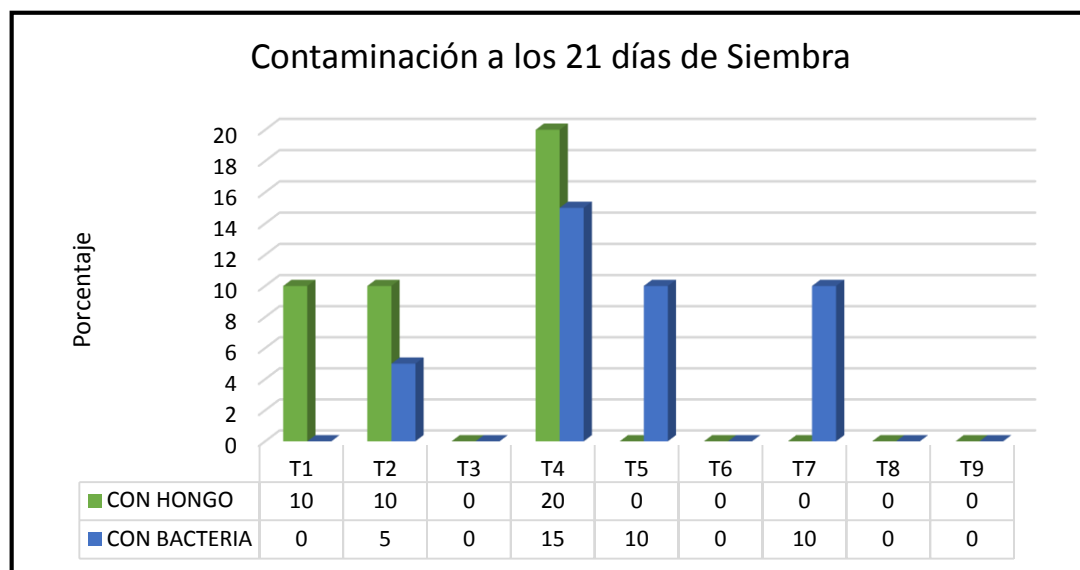


Figura 17. Gráfica de porcentajes de contaminación para los explantes de Dulcamara *Kalanchoe gastonis bonnieri* a los 21 días de la siembra. Color verde=contaminación por hongo. Color azul=contaminación por bacteria.

3.1.1.2. Análisis Inferencial

Los resultados de contaminación total con hongo o bacteria obtenidos a los 21 días de la siembra fueron dicotómicos, es decir que no tuvieron una distribución normal. Para su procesamiento se realizó la prueba no paramétrica de independencia χ^2 (x^2) que correlaciona las variables dependientes con las independientes. La hipótesis nula afirma que la variable de respuesta es independiente de las diferentes variables de tratamiento, el nivel de confianza nominal establecido es del 95% ($\alpha=0,05$). La relación entre la variable dependiente contaminación total y la variable independiente tratamiento se muestra en el Cuadro 1.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|----------------------------|---------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 26,182 ^a | 8 | 0,001 |
| Razón de verosimilitudes | 25,350 | 8 | 0,001 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 1,67.

Cuadro 1. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada con el software *SPSS* para determinar correlación entre la variable contaminación total y la variable tratamiento de desinfección.

En el Cuadro 1 se observa que $p=0,001$, es decir es menor al nivel de confianza establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia, y se puede afirmar que la variable contaminación total a los 21 días de siembra es dependiente de los tratamientos de desinfección aplicados. El Cuadro 2 presenta la prueba de Independencia χ^2 (x^2) para determinar la correlación entre la variable dependiente contaminación total y la variable independiente concentración de hipoclorito de sodio, ejecutada en el software *SPSS*.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-----------------------------|--------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 5,673 ^a | 2 | ,059 |
| Razón de verosimilitudes | 5,607 | 2 | ,061 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 5,00.

Cuadro 2. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada con el software *SPSS* para determinar correlación entre la variable contaminación total y la variable concentración de hipoclorito de sodio.

Se observa en el Cuadro 2 el valor de $p=0,059$, es decir que es mayor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que no se puede rechazar la hipótesis nula y se puede afirmar que la contaminación total a los 21 días de siembra no tiene dependencia de la concentración de hipoclorito de sodio empleada. El Cuadro 3 presenta la prueba de Independencia χ^2 (x^2) para determinar la correlación entre la variable dependiente contaminación total y la variable independiente tiempo de inmersión de hipoclorito de sodio, ejecutada en el software *SPSS*.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 13,527 ^a | 2 | ,001 |
| Razón de verosimilitudes | 16,700 | 2 | ,000 |
| Asociación lineal por lineal | 13,127 | 1 | ,000 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 5,00.

Cuadro 3. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada con el software *SPSS* para determinar correlación entre la variable contaminación total y la variable concentración de hipoclorito de sodio.

Se observa en el Cuadro 3 que $p=0,001$, es decir que es menor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se afirma que la contaminación total a los 21 días de la siembra es dependiente del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio.

Para poder analizar la influencia de los tratamientos de desinfección empleados en la contaminación por hongo y por bacteria, se realizó una prueba de independencia $\chi^2 (x^2)$ con cada una de las variables. El Cuadro 4 muestra los resultados para la correlación entre la variable dependiente contaminación por hongo y la variable dependiente tratamiento de desinfección ejecutada en el software *SPSS*.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|--------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 19,884 ^a | 8 | ,011 |
| Razón de verosimilitudes | 19,433 | 8 | ,013 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es ,89.

Cuadro 4. Prueba de Independencia $\chi^2 (x^2)$ ejecutada con el software *SPSS* para determinar correlación entre la variable contaminación por hongo y la variable tratamiento de desinfección.

En el Cuadro 4 se observa que $p=0,011$, es decir que es menor al nivel de confianza nominal ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula que afirma

independencia entre las variables, por lo que se puede decir que la contaminación por hongo a los 21 días de la siembra es dependiente del tratamiento de desinfección aplicado. El Cuadro 5 muestra los resultados de la correlación entre la variable dependiente contaminación por hongo y la variable independiente concentración de hipoclorito de sodio.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-----------------------------|--------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 4,186 ^a | 2 | ,123 |
| Razón de verosimilitudes | 6,672 | 2 | ,036 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 2,67.

Cuadro 5. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada con el software *SPSS* para determinar correlación entre la variable contaminación por hongo y la variable concentración de hipoclorito de sodio.

El Cuadro 5 nos muestra que $p=0,123$, que es mayor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se acepta la hipótesis nula de independencia de las variables, y se afirma que la contaminación por hongo a los 21 días de la siembra es independiente de la concentración de hipoclorito de sodio. El Cuadro 6 nos muestra los resultados de la prueba de Independencia para las variables contaminación por hongo y tiempo de inmersión ejecutada en el software *SPSS*.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|--------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 7,326 ^a | 2 | ,026 |
| Razón de verosimilitudes | 8,908 | 2 | ,012 |
| Asociación lineal por lineal | 7,025 | 1 | ,008 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 2,67.

Cuadro 6. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada con el software *SPSS* para determinar correlación entre la variable contaminación por hongo y la variable tiempo de inmersión.

El Cuadro 6 muestra que $p=0,026$, que es menor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), lo que indica que se rechaza la hipótesis nula y se afirma que la contaminación por hongo a los 21 días de la siembra es dependiente del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio empleado. Por otro lado, el Cuadro 8 nos muestra los resultados de la prueba de Independencia entre la variable contaminación por bacteria y la variable tratamiento de desinfección ejecutada en el software *SPSS*.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-----------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 12,632 ^a | 8 | ,125 |
| Razón de verosimilitudes | 15,547 | 8 | ,049 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 1,00.

Cuadro 7. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada con el software *SPSS* para determinar correlación entre la variable contaminación por bacteria y la variable tratamiento de desinfección.

Se observa en el Cuadro 7 el valor de p ($p=0,125$) que es mayor al nivel de significancia nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se acepta la hipótesis nula de independencia, y se puede afirmar que la contaminación por bacteria a los 21 días de la siembra es independiente del tratamiento de desinfección empleado. El Cuadro 8 presenta los resultados de la prueba de Independencia de las variables contaminación por bacteria y concentración de hipoclorito de sodio ejecutada en el software estadístico *SPSS*.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-----------------------------|--------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 2,105 ^a | 2 | ,349 |
| Razón de verosimilitudes | 1,970 | 2 | ,373 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 3,00.

Cuadro 8. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable contaminación por bacteria y la variable concentración de hipoclorito de sodio.

Se observa en el Cuadro 8 que $p=0,349$, lo que quiere decir que es superior al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se acepta la hipótesis nula de independencia de variables, y se puede afirmar que la contaminación por bacteria a los 21 días de la siembra es independiente de la concentración de hipoclorito de sodio. El Cuadro 9 presenta los resultados para la prueba de Independencia entre la variable contaminación por bacteria y la variable tiempo de inmersión.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|--------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 4,912 ^a | 2 | ,086 |
| Razón de verosimilitudes | 7,654 | 2 | ,022 |
| Asociación lineal por lineal | 4,362 | 1 | ,037 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 3,00.

Cuadro 9. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en SPSS que determina la correlación entre la variable contaminación por bacteria y la variable tiempo de inmersión.

Se observa en el Cuadro 9 que $p=0,086$, es decir que es mayor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se acepta la hipótesis nula de independencia de variables, y se afirma que la contaminación con bacteria a los 21 días es independiente del tiempo de inmersión empleado.

Una vez realizado el análisis exploratorio de los datos obtenidos a los 21 días de la siembra para la variable contaminación se puede concluir que los tratamientos “T3”, “T6”, “T8” y “T9” obtuvieron menor porcentaje de contaminación de explantes (0%), como lo expresa la Figura 17. Sin embargo, el tratamiento “T3” es el que emplea la menor concentración de hipoclorito de sodio, por lo que se podría considerar como el tratamiento más eficiente en la desinfección de explantes de *Kalanchoe gastonis bonnieri*.

El análisis inferencial de los datos obtenidos a los 21 días de la siembra nos indican que la contaminación total a los 21 días de la siembra es dependiente del tratamiento de desinfección utilizado, y del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, mas no de la concentración de hipoclorito de sodio con un nivel de confianza

del 95%. Así mismo, la contaminación por hongo a los 21 días de la siembra es dependiente del tratamiento de desinfección y del tiempo de inmersión, mientras que es independiente de la concentración de hipoclorito de sodio. Por otro lado, la contaminación por bacteria es independiente de los tres parámetros evaluados, es decir que el diseño experimental empleado no influye en la contaminación por bacteria.

3.1.2. Oxidación del explante

3.1.2.1. Análisis exploratorio de datos

Para la evaluación de la oxidación del explante de hoja de *Dulcamara Kalanchoe gastonis-bonnierei* en los 9 tratamientos de desinfección (Tabla 1), se ensayó a los 7 y 21 días (Anexo 1), se usó el mismo procedimiento que para la evaluación de la variable contaminación del explante. Los resultados de oxidación del explante a los 7 días de siembra se resumen en la tabla de contingencia (Tabla 5) donde se muestra el número de explantes oxidados y no oxidados.

Tabla 5.
Resultados obtenidos para la variable oxidación del explante a los 7 días de siembra.

| Tratamiento | Número de explantes oxidados | Número de explantes no oxidados |
|-------------|------------------------------|---------------------------------|
| T1 | 0 | 20 |
| T2 | 1 | 19 |
| T3 | 0 | 20 |
| T4 | 4 | 16 |
| T5 | 0 | 20 |
| T6 | 0 | 20 |
| T7 | 11 | 9 |
| T8 | 10 | 10 |
| T9 | 11 | 9 |

Para analizar la diferencia entre los resultados obtenidos de los 9 tratamientos de desinfección para la variable oxidación del explante tomados a los 7 días de la

siembra, se realizó una gráfica de porcentajes (Figura 18), donde se observa que los tratamientos con mayor porcentaje de explantes oxidados fueron “T7”, “T8” y “T9” con el 55%, 50% y 55% respectivamente. Por otro lado, “T2”, “T3”, “T5” y “T6”, tuvieron 0% de oxidación, es decir que hubo un aumento de los porcentajes de oxidación de los explantes en los últimos 3 tratamientos de desinfección que son los que emplearon mayor concentración del agente desinfectante.



Figura 18. Gráfica de porcentajes de oxidación de explantes en los 9 tratamientos de desinfección a los 7 días de siembra.

La tabla de contingencia (Tabla 6) muestra los resultados de oxidación de los explantes a los 21 días de siembra. En esta se puede observar el número de explantes oxidados y no oxidados que resultaron de la aplicación de los 9 tratamientos de desinfección.

Tabla 6.

Tabla de contingencia para los resultados de la variable oxidación del explante a los 21 días de siembra.

| Tratamiento | Número de explantes oxidados | Número de explantes no oxidados |
|-------------|------------------------------|---------------------------------|
| T1 | 0 | 20 |
| T2 | 2 | 18 |
| T3 | 0 | 20 |
| T4 | 4 | 16 |
| T5 | 0 | 20 |
| T6 | 0 | 20 |
| T7 | 11 | 9 |

| | | |
|----|----|----|
| T8 | 10 | 10 |
| T9 | 11 | 9 |

La figura 19, muestra la gráfica de porcentajes de los resultados de los 9 tratamientos de desinfección para la variable oxidación del explante tomados a los 21 días de siembra. Se observa que el tratamiento “T7” presenta el mayor porcentaje de explantes oxidados con el 65%, mientras que los tratamientos con menor porcentaje de oxidación son los tratamientos “T1”, “T3”, “T5” y “T6” con 0%. Además, solo un explante perteneciente al tratamiento “T2” se oxidó luego de la primera toma de datos a los 7 días, es decir que se mantuvo la frecuencia de mayor porcentaje de oxidación de los explantes hacia los últimos tratamientos de desinfección “T7”, “T8” y “T9”.



Figura 19. Gráfica de porcentajes de los resultados de oxidación de los explantes en los 9 tratamientos de desinfección a los 21 días de siembra.

3.1.2.2. Análisis Inferencial

Los resultados de oxidación de explantes obtenidos a los 21 días de la siembra fueron dicotómicos o binomiales, es decir que no tuvieron una distribución normal. Para su procesamiento se realizó la prueba no paramétrica de independencia Chi² (χ^2) que correlaciona las variables dependientes con las independientes. La hipótesis nula afirma que la variable de respuesta es independiente de las diferentes variables de tratamiento, el nivel de confianza nominal establecido es ($\alpha=0,05$). La relación entre

la variable dependiente oxidación y la variable independiente tratamiento se muestra en el Cuadro 10.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|----------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 64,875 ^a | 8 | ,000 |
| Razón de verosimilitudes | 75,094 | 8 | ,000 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 4,56.

Cuadro 10. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable tratamiento de desinfección.

Se observa en el Cuadro 10 que $p=0$, que es inferior al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se afirma que la oxidación de explantes a los 21 días de la siembra es dependiente de los tratamientos de desinfección utilizados. El Cuadro 11 presenta los resultados para la prueba de Independencia entre las variables oxidación y concentración de hipoclorito de sodio ejecutada en el software estadístico *SPSS*

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-----------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 58,810 ^a | 2 | ,000 |
| Razón de verosimilitudes | 57,847 | 2 | ,000 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 13,67.

Cuadro 11. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable concentración de hipoclorito de sodio.

Se observa en el Cuadro 11 que $p=0$, que es inferior al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se afirma que la oxidación del explante a los 21 días de la siembra es dependiente de la concentración de hipoclorito de sodio. El Cuadro 13 presenta los resultados de la prueba de

Independencia entre las variables oxidación y tiempo de inmersión ejecutada en el software estadístico *SPSS*.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|--------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 1,769 ^a | 2 | ,413 |
| Razón de verosimilitudes | 1,751 | 2 | ,417 |
| Asociación lineal por lineal | 1,696 | 1 | ,193 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 13,67.

Cuadro 12. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable tiempo de inmersión.

Una vez realizado el análisis exploratorio de los datos obtenidos a los 21 días de la siembra para la variable oxidación se puede concluir que los tratamientos “T1”, “T3”, “T5” y “T6” obtuvieron menor porcentaje de contaminación de explantes (0%), como se expresa en la Figura 19. De estos tratamientos “T1” y “T3” son los que emplean la menor concentración de hipoclorito de sodio, por lo que se podría considerar como los tratamientos más eficientes en la desinfección de explantes de *Kalanchoe gastonis bonnieri*.

El análisis inferencial de los datos obtenidos a los 21 días de la siembra nos indican que la oxidación a los 21 días de la siembra es dependiente del tratamiento de desinfección utilizado, del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio y de la concentración de hipoclorito de sodio con un nivel de confianza del 95%.

3.1.3. Viabilidad Total de explantes

3.1.3.1. Análisis exploratorio de datos

Para determinar la Viabilidad Total de explantes de *Dulcamara (Kalanchoe gastonis bonnieri)*, se combinaron los resultados de las dos variables evaluadas

anteriormente a los 21 días de siembra, es decir que se consideraron como explantes viables solamente aquellos que se encuentren libres de contaminación y de oxidación total a los 21 días de siembra.

El resumen de los datos de viabilidad total del explante a los 21 días de siembra recopilados en el Anexo 1 se pueden observar en la tabla de contingencia (Tabla 7), donde se presenta el número de explantes viables y no viables en cada tratamiento de desinfección. La Figura 20 muestra la gráfica de porcentajes donde se observa que los tratamientos con mayor porcentaje de viabilidad fueron los tratamientos “T3” y “T6” con el 100%, mientras que los tratamientos con menor porcentaje fueron “T7” con el 35% y “T9” con el 45% de explantes viables.

Tabla 7.
Resultados de Viabilidad Total de explantes a los 21 días de siembra

| Tratamiento | Número de explantes viables | Número de explantes no viables |
|--------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| T1 | 18 | 2 |
| T2 | 18 | 2 |
| T3 | 20 | 0 |
| T4 | 13 | 7 |
| T5 | 18 | 2 |
| T6 | 20 | 0 |
| T7 | 7 | 13 |
| T8 | 10 | 10 |
| T9 | 9 | 11 |



Figura 20. Gráfica de porcentajes de los 9 tratamientos de desinfección para la variable Viabilidad Total de explantes a los 21 días de siembra.

3.1.3.2. Análisis Inferencial

Los resultados de Viabilidad total obtenidos a los 21 días de la siembra fueron dicotómicos, es decir que no tuvieron una distribución normal. Para su procesamiento se realizó la prueba no paramétrica de independencia χ^2 (x^2) que correlaciona las variables dependientes con las independientes. La hipótesis nula afirma que la variable de respuesta es independiente de las diferentes variables de tratamiento, el nivel de confianza nominal establecido es ($\alpha=0,05$). La relación entre la variable dependiente viabilidad total y la variable independiente tratamiento se muestra en el Cuadro 13.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|--------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 51,136 ^a | 8 | ,001 |
| Razón de verosimilitudes | 58,807 | 8 | ,000 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 5,33.

Cuadro 13. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en SPSS que determina la correlación entre la viabilidad total y la variable tratamiento de desinfección.

Se observa en el Cuadro 14 el valor $p=0,001$ lo que quiere decir que está por debajo del nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables, y se afirma que la variable viabilidad total es dependiente de la variable tratamiento de desinfección. En el Cuadro 14 se presentan los resultados para la prueba de Independencia entre las variables viabilidad total y concentración de hipoclorito de sodio.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|----------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 42,102 ^a | 2 | ,001 |
| Razón de verosimilitudes | 41,516 | 2 | ,000 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 16,00.

Cuadro 14 . Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la viabilidad total y la variable concentración de hipoclorito de sodio.

Se observa en el Cuadro 14 que $p=0,001$ que es menor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables, y se afirma que la viabilidad total del explante a los 21 días de la siembra depende de la concentración de hipoclorito de sodio empleado en el ensayo. El Cuadro 16 presenta los resultados de la prueba de independencia entre las variables viabilidad total del explante y tiempo de inmersión ejecutada en el software estadístico *SPSS*.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|--------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 5,284 ^a | 2 | ,071 |
| Razón de verosimilitudes | 5,261 | 2 | ,072 |
| Asociación lineal por lineal | 5,128 | 1 | ,024 |
| N de casos válidos | 180 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 16,00.

Cuadro 15 . Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la viabilidad total y la variable tiempo de inmersión.

Una vez realizado el análisis exploratorio de los datos obtenidos a los 21 días de la siembra para la variable viabilidad se puede concluir que los tratamientos “T3” y “T6” obtuvieron el mayor porcentaje de viabilidad de explantes (100%) como se observa en la Figura 20. De estos tratamientos “T3” es el que emplea la menor concentración de hipoclorito de sodio, por lo que se podría considerar como el tratamiento más eficiente en la desinfección de explantes de *Kalanchoe gastonis bonnieri*.

El análisis inferencial de los datos obtenidos a los 21 días de la siembra nos indican que la viabilidad del explante a los 21 días de la siembra es dependiente del tratamiento de desinfección utilizado, del tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio y de la concentración de hipoclorito de sodio con un nivel de confianza del 95%.

3.2. Inducción a callo

Una vez que los explantes superaron la etapa de desinfección e introducción y no presentaron contaminación por hongo o bacteria fueron multiplicados a través de sus hojas *in vitro*, para que por medio de embriogénesis somática crezcan nuevas plántulas completas, luego de ello se colocaron nuevamente explantes de hoja *in vitro* en 3 diferentes medios de tratamiento para inducción a callo, se realizaron 20 repeticiones para cada tratamiento que se evaluaron a los 30 y 60 días. En esta etapa se evaluaron las variables presencia de callo y oxidación del explante, descritas ampliamente a continuación.

3.2.1. Presencia de callo

3.2.1.1. Análisis exploratorio de datos

Para la evaluación de la variable presencia de callo se realizó una observación simple de los explantes a los 30 y 60 días después de realizada la siembra. Los datos obtenidos se muestran en el Anexo 2. La tabla de contingencia (Tabla 8) muestra el resumen del número de explantes que presentaron desdiferenciación de sus tejidos y formación de callo, así como los que no la presentaron.

Tabla 8.
Resultados de la variable Presencia de Callo a los 30 días de siembra

| Tratamiento | Número de explantes con presencia de callo | Número de explantes sin presencia de callo |
|-------------|--|--|
| TC | 0 | 20 |
| T1 | 4 | 16 |
| T2 | 9 | 11 |
| T3 | 6 | 14 |

La Figura 21 muestra los porcentajes en cada tratamiento de inducción a callogénesis a los 30 días de siembra y del tratamiento control “TC”. Se observa que el tratamiento “T2” es el que posee el mayor porcentaje de explantes con presencia de callo con el 45%, mientras que “T3” presentó el 30% y “T1” el 20% de explantes con presencia de callo. Por otro lado, “TC” presentó el menor porcentaje con el 0%.

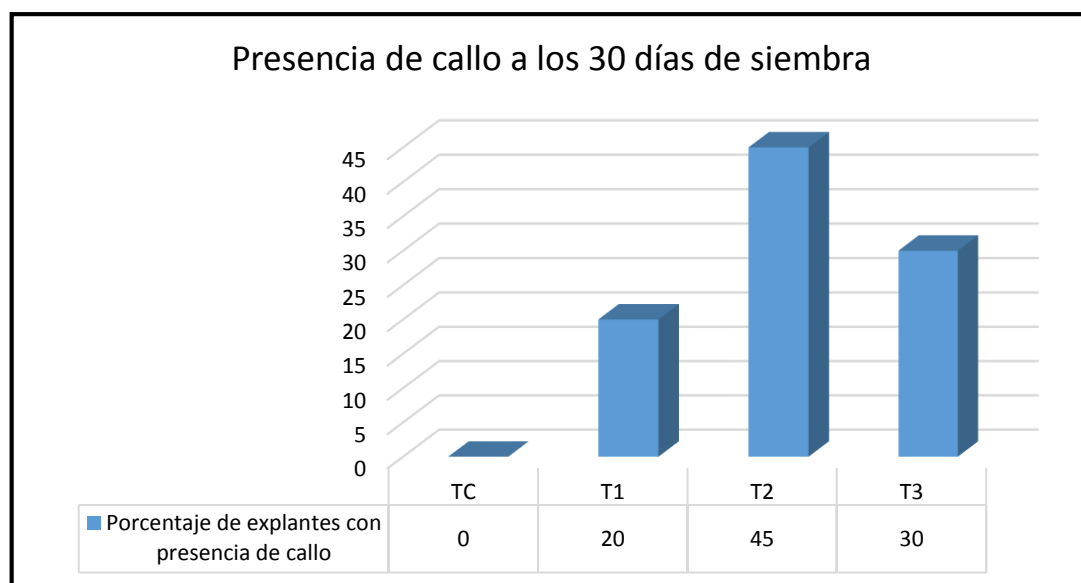


Figura 21. Gráfica de porcentajes para la variable Presencia de Callo tomado a los 30 días de siembra.

Además, se evaluó la variable a los 60 días de siembra (Anexo 2). En la tabla de contingencia (Tabla 9) se observa el número de explantes con presencia de callo en cada tratamiento y aquellos que no sufrieron desdiferenciación, incluido el control “TC”. En la figura 22 se observa que el tratamiento “T2” es el que posee el mayor

porcentaje de explantes con presencia de callo, “T3” le sigue en el segundo lugar con el 50%, “T1” con el 35%, mientras que el control “TC” es el que tuvo el menor porcentaje de explantes con presencia de callo con el 0%. También, se observa que el tratamiento “T2” sigue manteniendo el mayor porcentaje de explantes con presencia de callo comparando estos datos con los obtenidos a los 30 días de la siembra. El control “TC” mantiene el 0% de explantes con presencia de callo.

Tabla 9.

Tabla de contingencia de la variable Presencia de Callo a los 60 días de siembra.

| Tratamiento | Número de explantes con presencia de callo | Número de explantes sin presencia de callo |
|-------------|--|--|
| TC | 0 | 0 |
| T1 | 7 | 35 |
| T2 | 13 | 65 |
| T3 | 10 | 50 |

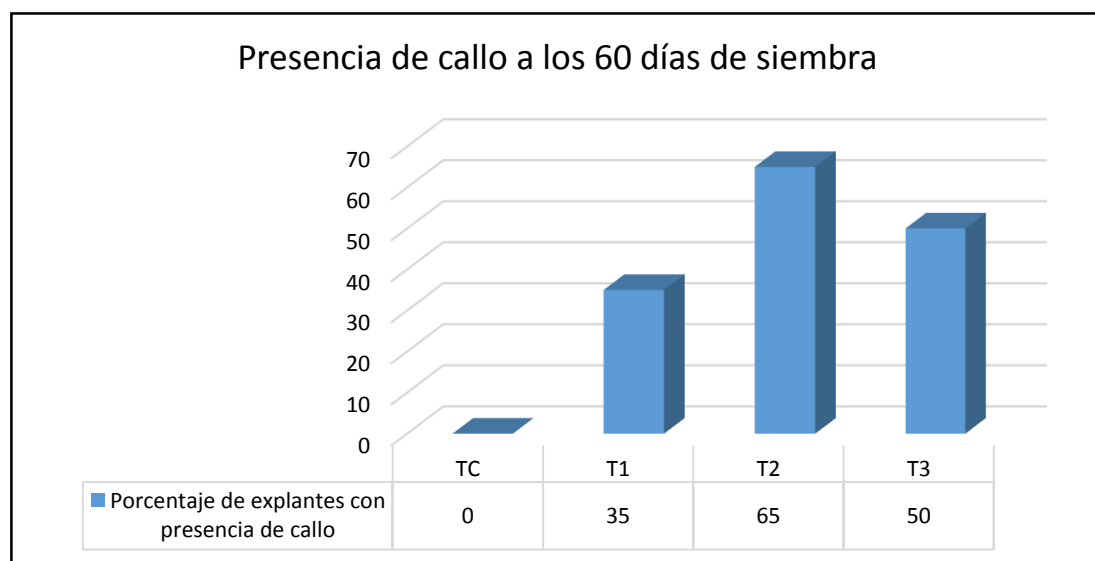


Figura 22. Gráfica de porcentajes para la variable Presencia de Callo tomado a los 60 días de la siembra.

3.2.1.2. Análisis Inferencial

Los resultados de presencia de callo obtenidos a los 60 días de la siembra fueron dicotómicos, es decir que no tuvieron una distribución normal. Para su

procesamiento se realizó la prueba no paramétrica de independencia χ^2 (x^2) que correlaciona las variables dependientes con las independientes. La hipótesis nula afirma que la variable de respuesta es independiente de las diferentes variables de tratamiento, el nivel de confianza nominal establecido es ($\alpha=0,05$). La relación entre la variable dependiente presencia de callo y la variable independiente tratamiento se muestra en el Cuadro 16.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|-----------------------------|---------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 19,840 ^a | 3 | ,001 |
| Razón de verosimilitudes | 26,328 | 3 | ,000 |
| N de casos válidos | 80 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 7,50.

Cuadro 16. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable presencia de callo y la variable tratamiento.

Se observa en el Cuadro 16 el valor de p ($p=0,001$), que es menor al nivel de significancia nominal establecido, por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables y se puede afirmar que la presencia de callo en los explantes a los 60 días de la siembra es dependiente del tratamiento utilizado. El Cuadro 17 presenta los resultados de la prueba de Independencia entre las variables presencia de callo y concentración de BAP ejecutada en el software estadístico *SPSS*.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|---------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 18,880 ^a | 2 | ,001 |
| Razón de verosimilitudes | 25,404 | 2 | ,000 |
| Asociación lineal por lineal | 18,405 | 1 | ,000 |
| N de casos válidos | 80 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 7,50.

Cuadro 17. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable presencia de callo y la variable concentración de BAP.

Se observa en el Cuadro 17 que $p=0,001$ que es menor al nivel de significancia nominal establecido, por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia de las variables y se puede afirmar que la variable presencia de callo es dependiente de la variable concentración de BAP con un nivel de confianza del 95%. El Cuadro 18 presenta los resultados de la prueba de Independencia entre la variable presencia de callo y la variable concentración de 2,4-D ejecutada en el software estadístico *SPSS*.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|---------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 19,840 ^a | 3 | ,001 |
| Razón de verosimilitudes | 26,328 | 3 | ,000 |
| Asociación lineal por lineal | 10,118 | 1 | ,001 |
| N de casos válidos | 80 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 7,50.

Cuadro 18. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable presencia de callo y la variable concentración de 2,4-D.

Se observa en el Cuadro 18 que $p=0,001$ que es inferior al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$) por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables, y se puede afirmar que con un nivel de confianza del 95% la presencia de callo es dependiente de la concentración de 2,4-D.

Una vez realizado el análisis exploratorio de los datos obtenidos a los 60 días de la siembra para la variable presencia de callo se puede concluir que el tratamiento “T2” es el que posee el mayor porcentaje de presencia de callo en sus explantes (100%) como se observa en la Figura 22. Por lo que se podría considerar como el tratamiento más eficiente en la inducción a callogénesis de explantes de hoja de *Kalanchoe gastonis bonnieri*. El análisis inferencial de los datos obtenidos a los 21 días de la siembra nos indican que la presencia de callo en el explante a los 60 días de la siembra es dependiente del tratamiento utilizado, así como de la concentración de BAP y de 2,4-D con un nivel de confianza del 95%.

3.2.2. Oxidación del explante

3.2.2.1. Análisis exploratorio de datos

Para la evaluación de la variable Oxidación del Explante se realizó una observación simple de los callos obtenidos de los 3 tratamientos de inducción a callogénesis a los 30 y 60 días después de siembra. Los resultados se muestran en el Anexo 2. La Tabla de contingencia (Tabla 10) indica el resumen del número de explantes que presentaron oxidación del tejido calloso y aquellos que no presentaron oxidación.

Tabla 10.

Tabla de contingencia de la variable Oxidación del explante a los 30 días de la siembra.

| Tratamiento | Número de explantes oxidados | Número de explantes no oxidados |
|-------------|------------------------------|---------------------------------|
| TC | 0 | 0 |
| T1 | 5 | 25 |
| T2 | 5 | 25 |
| T3 | 9 | 45 |

El porcentaje en cada tratamiento de inducción a callo a los 30 días de siembra se muestra en la Figura 23. Se observa que “T3” posee el mayor porcentaje de explantes oxidados con el 45%, mientras que “T1” y “T2” se encuentran en el segundo lugar con el 25%. El control “TC” presentó el 0%. Además se observa que el tratamiento “T3” tiene el mayor porcentaje de explantes oxidados, mientras que el tratamiento control “TC” tiene porcentaje nulo.

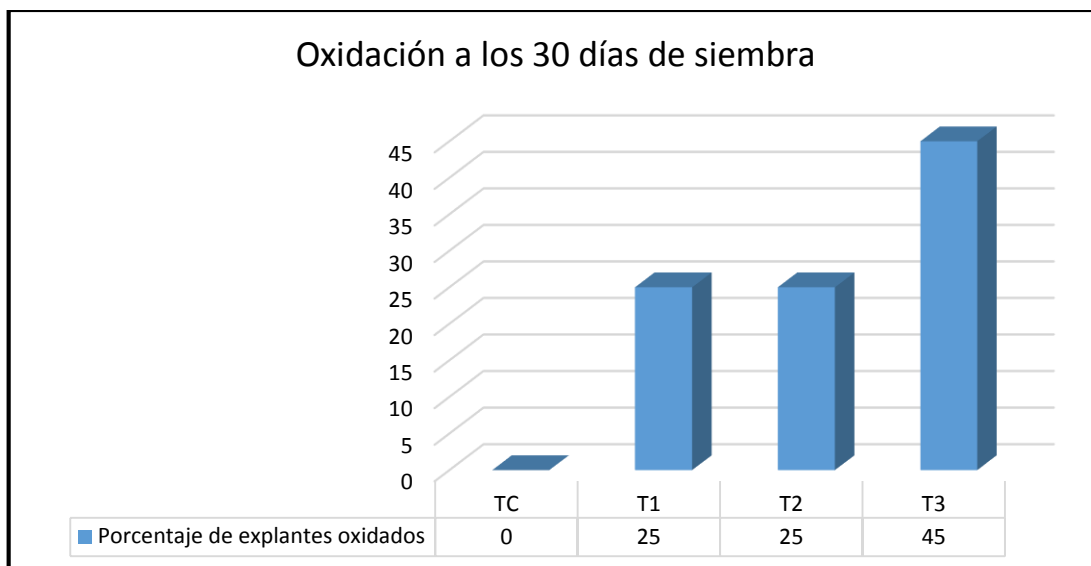


Figura 23. Gráfica de porcentajes para la variable Oxidación del Explante a los 30 días de la siembra.

Los datos tomados a los 60 días de siembra para la variable Oxidación del Explante se resumen en la Tabla de contingencia (Tabla 11). En la Figura 24 se presenta el porcentaje de explantes oxidados a los 60 días de siembra. Se observa que el tratamiento “T3” es el que posee el mayor porcentaje de explantes oxidados (45%), “T2” le sigue en el segundo lugar con el 40%, “T1” obtuvo el 35%, mientras que el control “TC” presentó el menor porcentaje con el 0%.

Tabla 11.

Tabla de contingencia para la variable Oxidación del explante a los 60 días de siembra.

| Tratamiento | Número de explantes oxidados | Número de explantes no oxidados |
|-------------|------------------------------|---------------------------------|
| TC | 0 | 0 |
| T1 | 7 | 35 |
| T2 | 8 | 40 |
| T3 | 9 | 45 |

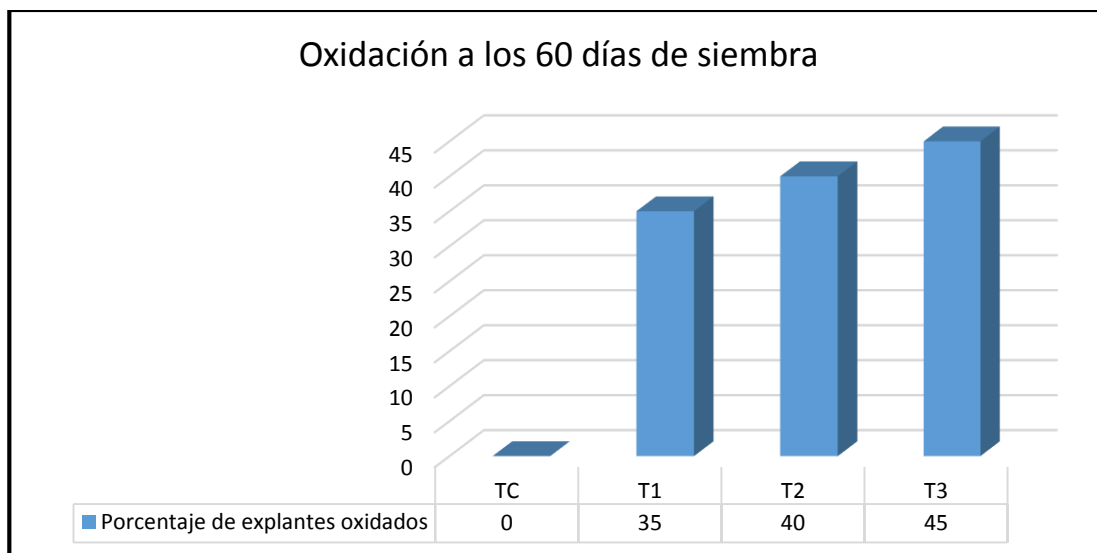


Figura 24. Gráfica de porcentajes de la variable Oxidación del explante a los 60 días de siembra.

3.2.2.2. Análisis Inferencial

Los resultados oxidación del explante obtenidos a los 60 días de la siembra fueron dicotómicos, es decir que no tuvieron una distribución normal. Para su procesamiento se realizó la prueba no paramétrica de independencia χ^2 (x^2) que correlaciona las variables dependientes con las independientes. La hipótesis nula afirma que la variable de respuesta es independiente de las diferentes variables de tratamiento, el nivel de confianza nominal establecido es ($\alpha=0,05$). La relación entre la variable dependiente oxidación y la variable independiente tratamiento se muestra en el Cuadro 19.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|--------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 11,905 ^a | 3 | ,008 |
| Razón de verosimilitudes | 17,394 | 3 | ,001 |
| N de casos válidos | 80 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 6,00.

Cuadro 19. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable tratamiento.

Podemos observar en el Cuadro 19 que $p=0,008$, que es menor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables y se afirma que la variable oxidación del explante a los 60 días de la siembra es dependiente de la variable tratamiento con un nivel de confianza del 95%. El Cuadro 20 presenta los resultados de la prueba de Independencia entre la variable oxidación y la variable concentración de BAP ejecutada en el software estadístico *SPSS*.

| Pruebas Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|---------------------|----|--------------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 11,786 ^a | 2 | ,003 |
| Razón de verosimilitudes | 17,292 | 2 | ,000 |
| Asociación lineal por lineal | 10,345 | 1 | ,001 |
| N de casos válidos | 80 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 6,00.

Cuadro 20. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable concentración de BAP.

Se observa en el Cuadro 20 el valor de p ($p=0,003$), lo que quiere decir que es menor al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de independencia y se afirma que la oxidación del explante a los 60 días de la siembra es dependiente de la concentración de la citoquinina BAP con un nivel de confianza del 95%. El Cuadro 21 presenta los resultados de la prueba de Independencia entre la variable oxidación del explante y la variable concentración de 2,4-D ejecutada en *SPSS*.

| Prueba Chi Cuadrado | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 11,905 ^a | 3 | ,008 |
| Razón de verosimilitudes | 17,394 | 3 | ,001 |
| Asociación lineal por lineal | 7,766 | 1 | ,005 |
| N de casos válidos | 80 | | |

a. La frecuencia mínima esperada es 6,00.

Cuadro 21. Prueba de Independencia χ^2 (x^2) ejecutada en *SPSS* que determina la correlación entre la variable oxidación y la variable concentración de 2,4-D.

Se observa en el Cuadro 21 que $p=0,008$, lo que es menor al nivel de confianza establecido ($\alpha=0,05$), por lo cual se rechaza la hipótesis nula de independencia de variables y se puede afirmar que la oxidación de explantes a los 60 días de la siembra es dependiente de la concentración de 2,4-D con un nivel de confianza del 95%.

Una vez realizado el análisis exploratorio de los datos obtenidos a los 60 días de la siembra para la variable oxidación del explante se puede concluir que el tratamiento “T1” obtuvo el menor porcentaje de explantes oxidados (35%), el segundo lugar lo ocupa el tratamiento “T2” (40%). El análisis inferencial de los datos obtenidos a los 60 días de la siembra nos indican que la oxidación del explante a los 60 días de la siembra es dependiente del tratamiento de inducción a callogénesis utilizado, de la concentración de BAP y de la concentración de 2,4-D con un nivel de confianza del 95%.

3.3. Análisis Químico

El callo de 60 días de edad se presentaba húmedo, con apariencia fresca y color blanquecino, mientras que a los 270 días el callo presentaba oxidación de color oscuro y algunas zonas del tejido se encontraban deshidratadas, adicionalmente el medio estaba fenolizado (Figura 25). Los resultados obtenidos de las muestras de callo *in*

vitro de *Kalanchoe gastonis bonnieri* de diferentes etapas de desarrollo fueron comparados con los resultados de las muestras de hoja *in vivo* e *in vitro*.

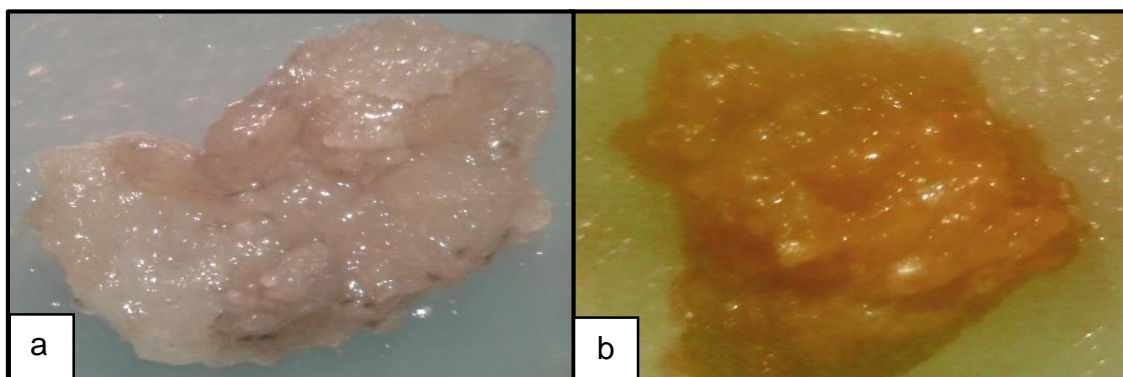


Figura 25. Callo de hoja *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* (0.8X) a) callo de 60 días b) callo de 270 días.

3.3.1. Determinación del Contenido de Fenoles

3.3.1.1. Análisis exploratorio de datos

El ensayo de determinación de concentración de fenoles en mgL^{-1} de ácido gálico se realizó con callo *in vitro* de 60 y 270 días de edad, y hoja *in vivo* e *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri*. Se realizó una curva de calibración con soluciones de ácido gálico como compuesto estándar. La Figura 26 indica la curva resultante, el coeficiente de correlación $R^2=0,9989$ y la ecuación obtenida (Ecuación 4).

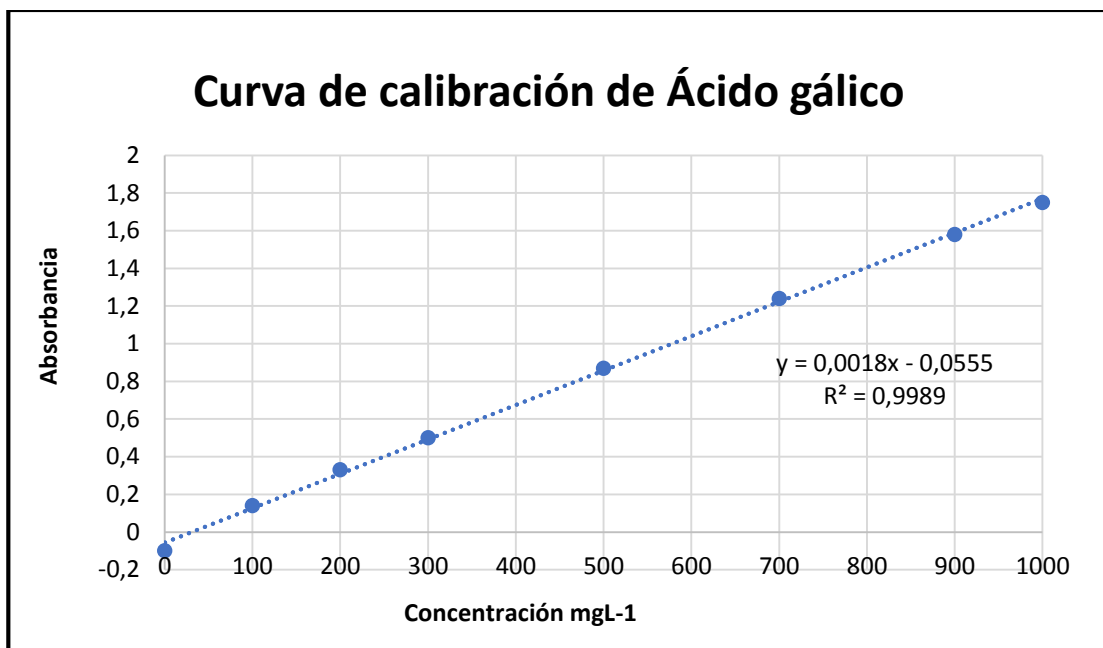


Figura 26. Curva de calibración de Ácido gálico.

$$Y = 0,0018x - 0,0555$$

Ecuación 4. Ecuación de la recta para determinar contenido de fenoles en mgL⁻¹ de ácido gálico.

El ensayo se realizó por triplicado y se obtuvo una media para cada muestra. La concentración mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra seca y la desviación estándar se indica en la Tabla 12. La gráfica de frecuencias compara los resultados obtenidos (Figura 27) y se determina que la mayor concentración de fenoles se encuentra en la muestra de hoja *in vivo* (20,200 mg equivalentes de ácido gálico por g muestra seca), hoja *in vitro* (5,733 mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra seca), callo de 60 días (0,143 mg equivalentes de ácido gálico por g muestra fresca), y callo de 270 días que contiene la menor cantidad de fenoles (0,128 mg equivalentes de ácido gálico por g de muestra fresca).

Tabla 12.
Datos del análisis de la cuantificación de fenoles totales.

| Muestra | Absorbancia (A) | Concentración (mgL ⁻¹) | Promedio concentración (mgL ⁻¹) | Mg equivalentes de ácido gálico g ⁻¹ muestra |
|----------------------|-----------------|------------------------------------|---|---|
| hoja <i>in vivo</i> | 0,189 | 185 | 202,000 | 20,200 |
| | 0,19 | 186 | | |
| | 0,253 | 235 | | |
| hoja <i>in vitro</i> | 0,025 | 59 | 57,333 | 5,733 |
| | 0,024 | 58 | | |
| | 0,02 | 55 | | |
| callo 60 días | 0,072 | 65,82 | 71,463 | 0,143 |
| | 0,08 | 70,73 | | |
| | 0,092 | 77,84 | | |
| callo 270 días | 0,037 | 67 | 64,000 | 0,128 |
| | 0,025 | 58 | | |
| | 0,036 | 67 | | |

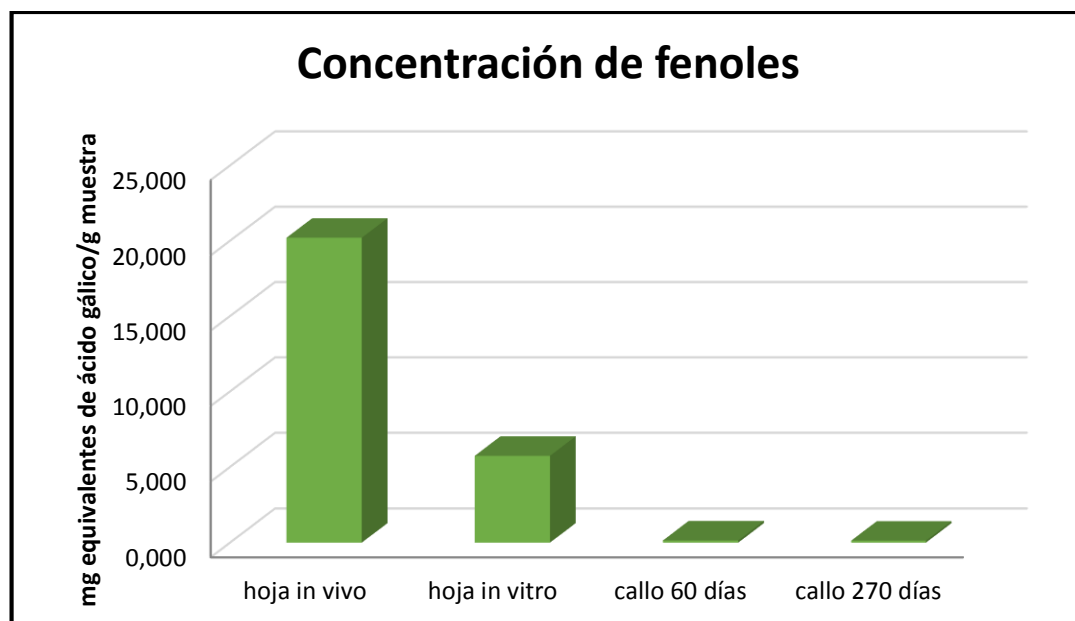


Figura 27. Concentración de fenoles expresados en mg equivalentes de ácido gálico g⁻¹ de muestra seca.

3.3.1.2. Análisis Inferencial

Dado que los resultados del ensayo de determinación del contenido de fenoles tienen una distribución normal, para su procesamiento se realizó el análisis de la

varianza (ANOVA) para determinar si las medias de los datos son significativamente diferentes entre sí con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$). Los resultados del análisis ejecutado en el software estadístico *Infostat* se presentan en el Cuadro 22.

| Análisis de la varianza | | | | |
|-------------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
| fenoles | 12 | 0,96 | 0,95 | 15,07 |

| Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) | | | | | |
|---|----------|----|----------|-------|---------|
| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
| Modelo. | 42984,05 | 3 | 14328,02 | 64,77 | <0,0001 |
| Muestra | 42984,05 | 3 | 14328,02 | 64,77 | <0,0001 |
| Error | 1769,71 | 8 | 221,21 | | |
| Total | 44753,76 | 11 | | | |

Cuadro 22. Análisis de la varianza (ANOVA) ejecutado en *Infostat* para el ensayo de determinación de contenido de fenoles.

Se observa en el Cuadro 22 el valor $p < 0,0001$, que es inferior al nivel de confianza nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se afirma que las medias de los resultados de contenido de fenoles tienen diferencias significativas. Adicionalmente se realizó el Test de Tukey para la comparación entre los resultados de las distintas muestras (Cuadro 23).

| Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=38,88928 | | | | |
|------------------------------------|--------|---|------|---|
| Error: 221,2142 gl: 8 | | | | |
| Muestra | Medias | n | E.E. | |
| HOJA IN VITRO | 57,33 | 3 | 8,59 | A |
| CALLO 270 DÍAS | 64,00 | 3 | 8,59 | A |
| CALLO 60 DÍAS | 71,46 | 3 | 8,59 | A |
| HOJA IN VIVO | 202,00 | 3 | 8,59 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 23. Test de comparación de Tukey para los resultados del ensayo de determinación de contenido de fenoles

En el Cuadro 23 se puede observar que las muestras de hoja *in vivo*, callo de 60 días y callo de 270 días pertenecen al grupo “A”, es decir que sus medias no son significativamente diferentes, mientras que la muestra de hoja *in vivo* pertenece al grupo “B” con la media más alta en comparación con las muestras del grupo “B” (M=202), lo que permite concluir es la que contiene el mayor contenido de fenoles.

3.3.2. Determinación de la Capacidad Antioxidante

3.3.2.1. Análisis exploratorio de datos

El análisis de la capacidad antioxidante se realizó con una curva de calibración con el radical libre DPPH a diferentes concentraciones y se obtuvo una ecuación linealizada con un coeficiente de correlación $R^2=0,9991$ que se observa en la Figura 28. Los parámetros de la recta se muestran en la Ecuación 5.

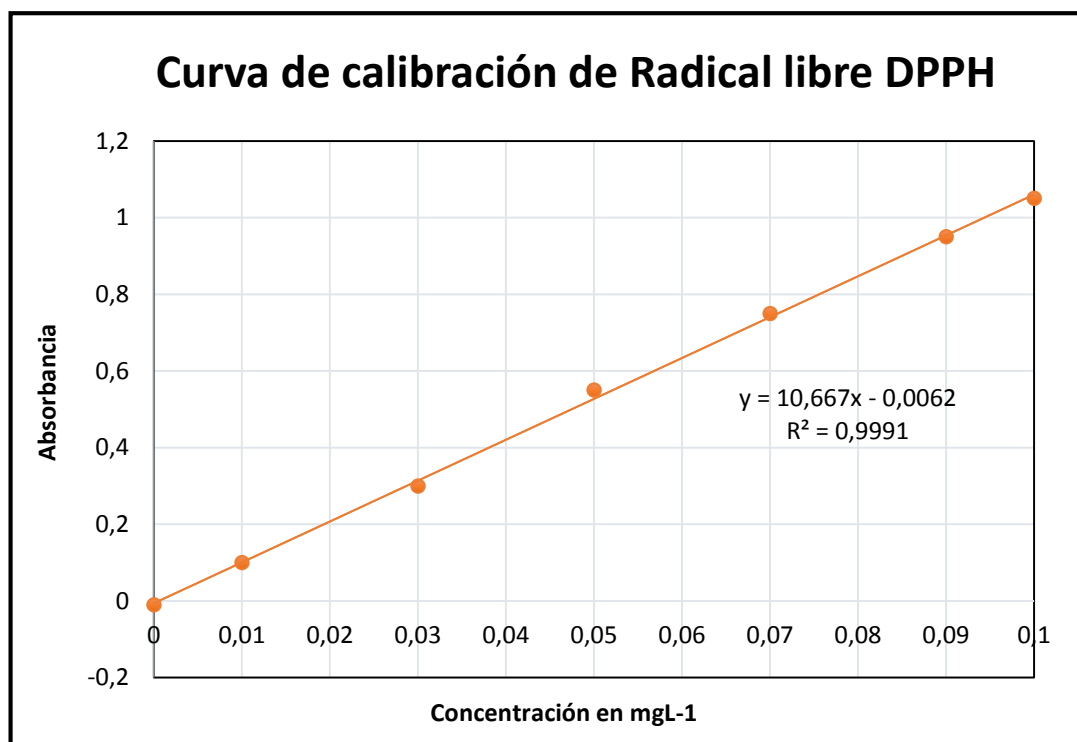


Figura 28. Curva de calibración de Radical libre DPPH en mgL⁻¹.

$$Y = 10,667x - 0,0062$$

Ecuación 5. Ecuación de la Recta del Radical libre DPPH en mgL^{-1} .

Los ensayos realizados por triplicado permitieron calcular el porcentaje de reducción del radical DPPH con los extractos de las muestras analizadas, a partir de la fórmula indicada en la Ecuación 1, también se obtuvo la desviación estándar para las concentraciones en mgL^{-1} de radical libre DPPH, indicando los resultados que se muestran en la Tabla 13 (Anexo 3).

Tabla 13.
Capacidad Antioxidante, se indica el porcentaje de reducción de radical DPPH

| Muestra | Absorbancia (A) | Concentración (mgL^{-1}) | % DPPH | Media %DPPH |
|------------------------------|-----------------|-------------------------------------|--------|-------------|
| blanco hoja <i>in vivo</i> | 0,048 | 0,005 | | |
| control hoja <i>in vivo</i> | 0,429 | 0,041 | | |
| hoja <i>in vivo</i> | 0,116 | 0,011 | 73,17 | 76,42 |
| | 0,094 | 0,009 | 78,05 | |
| | 0,097 | 0,009 | 78,05 | |
| blanco hoja <i>in vitro</i> | 0 | 0 | | |
| control hoja <i>in vitro</i> | 0,421 | 0,041 | | |
| hoja <i>in vitro</i> | 0,249 | 0,025 | 39,02 | 37,40 |
| | 0,251 | 0,025 | 39,02 | |
| | 0,274 | 0,027 | 34,15 | |
| blanco callo 60 días | 0 | 0 | | |
| control callo 60 días | 0,429 | 0,041 | | |
| callo 60 días | 0,324 | 0,031 | 24,39 | 22,76 |
| | 0,309 | 0,029 | 29,27 | |
| | 0,365 | 0,035 | 14,63 | |
| blanco callo 270 días | 0,005 | 0 | | |
| control callo 270 días | 0,429 | 0,041 | | |
| callo 270 días | 0,421 | 0,04 | 2,44 | 8,13 |
| | 0,385 | 0,037 | 9,76 | |
| | 0,376 | 0,036 | 12,20 | |

La Tabla 13, revela el orden porcentual de disminución de radicales libres de la siguiente manera: hoja *in vivo* indicó el mayor porcentaje de reducción de DPPH (76,42%), hoja *in vitro* (37,40%), callo de hoja *in vitro* de 60 días (22,76%), el callo de 270 días presentó el menor porcentaje de reducción de radicales (8,13%). La Figura 29 indica la gráfica de porcentajes para estos resultados.

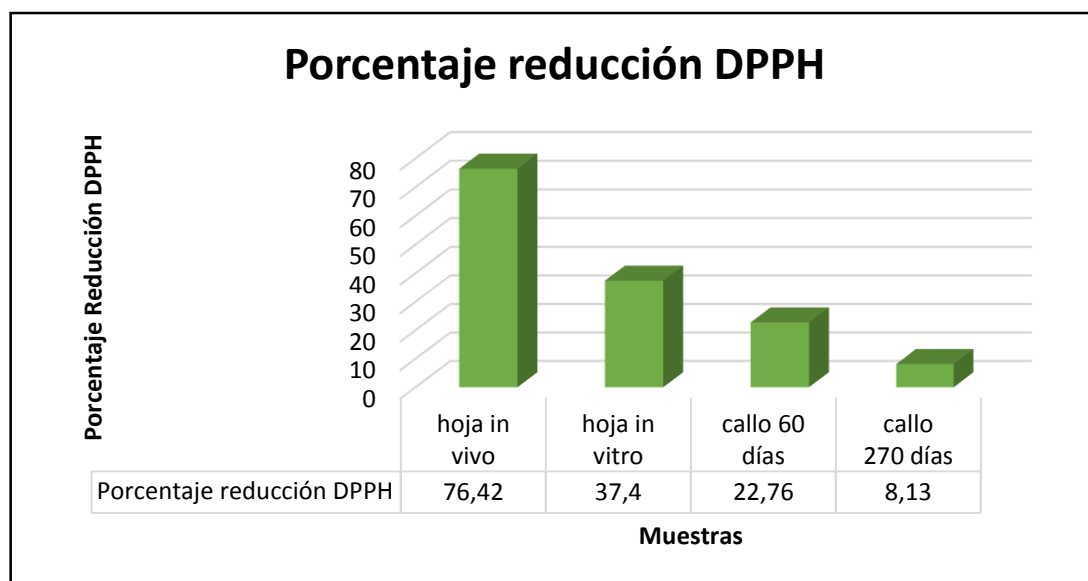


Figura 29. Porcentaje de reducción de la concentración de radical DPPH.

Es importante considerar que las muestras de callo *in vitro* se encontraban húmedas, lo que pudo dar lugar a que los metabolitos secundarios estén diluidos; por otro lado las muestras de hoja *in vivo* e *in vitro* fueron secadas en estufa y perdieron totalmente su contenido de agua. Para obtener una mejor comparación de los valores de capacidad antioxidante de las diferentes muestras evaluadas, se procedió a equiparar los pesos de la muestra seca inicial, tomando como referencia el peso de la hoja *in vivo* e *in vitro* que es el menor. De esta forma se puede obtener un parámetro más real del porcentaje de reducción de radicales DPPH de las muestra de callo de 60 y 270 días. La fórmula utilizada se describe a continuación en la Ecuación 6:

$$\% \text{ DPPH callo real} = g \text{ muestra seca hoja} * \frac{\% \text{ DPPH muestra de callo}}{g \text{ muestra seca de callo}}$$

Ecuación 6. Fórmula para calcular el % DPPH de muestra de callo real.

De la aplicación de la fórmula anterior se obtuvieron los resultados expresados en la Tabla 14, considerados como datos de % de reducción de DPPH idóneos para realizar una comparación más efectiva:

Tabla 14.

Resultados reales de capacidad antioxidante.

| Muestra | g de muestra seca | % DPPH real | Media %DPPH |
|----------------------|-------------------|-------------|-------------|
| hoja <i>in vivo</i> | 0,1069 | 73,17 | 76,42 |
| | 0,1069 | 78,05 | |
| | 0,1069 | 78,05 | |
| hoja <i>in vitro</i> | 0,1069 | 39,02 | 37,40 |
| | 0,1069 | 39,02 | |
| | 0,1069 | 34,15 | |
| callo 60 días | 0,1069 | 1,73 | 1,62 |
| | 0,1069 | 2,08 | |
| | 0,1069 | 1,04 | |
| callo 270 días | 0,1069 | 0,17 | 0,57 |
| | 0,1069 | 0,69 | |
| | 0,1069 | 0,86 | |

Se puede observar en la Tabla 14 que los porcentajes de reducción de radicales DPPH de las muestras de callo de 60 y 270 días disminuyó considerablemente, sin embargo la muestra de callo de 270 días fue la que obtuvo el menor porcentaje de reducción de radicales DPPH.

3.3.2.2. Análisis Inferencial

Dado que los resultados reales del ensayo de determinación de la capacidad antioxidante tienen una distribución normal, para su procesamiento se

realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si las medias de los datos son significativamente diferentes entre sí con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$). Los resultados del análisis ejecutado en el software estadístico *Infostat* se presentan en el Cuadro 24.

| Análisis de la varianza | | | | |
|-------------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
| %DPPH | 12 | 1,00 | 1,00 | 6,95 |

| Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) | | | | | |
|---|----------|----|---------|--------|---------|
| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
| Modelo. | 11632,20 | 3 | 3877,40 | 954,26 | <0,0001 |
| Muestra | 11632,20 | 3 | 3877,40 | 954,26 | <0,0001 |
| Error | 32,51 | 8 | 4,06 | | |
| Total | 11664,70 | 11 | | | |

Cuadro 24. Análisis de la varianza (ANOVA) ejecutado en *Infostat* para el ensayo de determinación de capacidad antioxidante.

Se observa que $p < 0,0001$, que es menor al nivel de significancia nominal establecido ($\alpha=0,05$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se puede afirmar que las medias de los resultados del ensayo de determinación de capacidad antioxidante son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%. Adicionalmente se realizó un test de comparación de Tukey, para determinar cuál es la muestra que obtuvo una media más alta (Cuadro 25).

| Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=5,27061 | | | | |
|-----------------------------------|--------|---|------|---|
| Error: 4,0633 gl: 8 | | | | |
| Muestra | Medias | n | E.E. | |
| CALLO 270 DÍAS | 0,57 | 3 | 1,16 | A |
| CALLO 60 DÍAS | 1,62 | 3 | 1,16 | A |
| HOJA IN VITRO | 37,40 | 3 | 1,16 | B |
| HOJA IN VIVO | 76,42 | 3 | 1,16 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 25 . Test de comparación de Tukey para los resultados del ensayo de determinación de capacidad antioxidante.

Se observa en el Cuadro 25 que las muestras de callo de 270 días y de callo de 60 días pertenecen al grupo “A”, mientras que la muestra de hoja *in vivo* pertenece al grupo “B” y la hoja *in vitro* pertenece al grupo “C”. Por lo que se puede afirmar que la hoja *in vivo* con una media ($M=76,42$) es la muestra con mayor capacidad antioxidante.

Se determinó la relación entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante a través de una regresión lineal en Excel para obtener el coeficiente de correlación entre las dos variables (Figura 30).

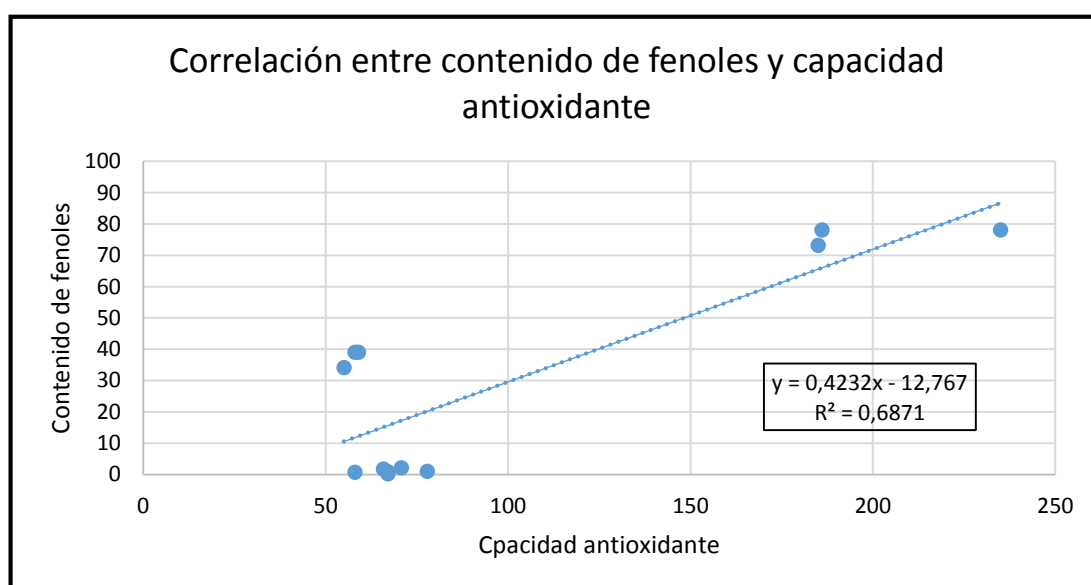


Figura 30. Gráfica de Correlación entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante.

La Figura 30 indica que el coeficiente de correlación para la regresión lineal de los dos parámetros analizados ($R=0,68$), considerado como un valor medio, puesto que es superior a 0,5, pero no se acerca totalmente a 1. Este valor permite afirmar que el contenido de fenoles está medianamente relacionado con la capacidad antioxidante.

4. CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1. *Kalanchoe gastonis bonnieri* como modulador biológico

Según Pérez (2011) el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales a través de diferentes aplicaciones ha permitido la obtención de extractos puros de metabolitos secundarios de plantas importantes para la medicina. Adicionalmente, Trejo & colaboradores (2007) afirmó que la callogénesis es una de las alternativas más utilizadas para impedir la interferencia de patógenos que alteren la pureza de dichos principios, así como la eficiencia de su extracción. Este proyecto de investigación estableció un protocolo de cultivo *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri*, protocolo de inducción a la formación de callogénesis a partir de explantes *in vitro*, así como uno de determinación del contenido de fenoles y carácter antioxidante de callo *in vitro* de la planta, de tal forma que se establezca una base de estudio verificable del que puedan partir investigaciones futuras para el desarrollo de fitofármacos que tengan al extracto hidrosoluble de *Kalanchoe gastonis bonnieri*.

4.2. Desinfección e Introducción de explantes de hoja de Dulcamara

Según Tuttle (2004) los fungicidas protectores juegan un rol importante en el control de plagas causadas por el género *Oidium*, debido a que retardan la resistencia del hongo al mecanismo de acción de los fungicidas sistémicos que son esenciales para proteger la parte inferior de las hojas y evitar su muerte prematura. Van den Berg & colaboradores (2016) e Inglis & colaboradores (1998) recomiendan el uso de una combinación de ambos para obtener una eficiencia máxima en el control de la plaga del oidio causado por el hongo *Oidium kalanchoe*. Basado en estos estudios, para la ejecución del tratamiento fitosanitario, se utilizó una combinación de un fungicida protector y uno sistémico (CAPTAN+BENOMIL) a una concentración de 1% (P/V) de los dos, dando como resultado porcentajes menores o iguales al 20% de

contaminación con hongo en el 100% de los tratamientos utilizados en la etapa desinfección (Figura 17).

Para la etapa de desinfección e introducción de explantes se escogieron hojas de un año de edad de *Kalanchoe gastonis bonnieri*. Wiggins y colaboradores (2016) llevaron a cabo un estudio sobre el género de arbustos tropicales *Inga*, donde se afirma que las hojas jóvenes en una planta adulta poseen mayor cantidad de fenoles totales que las hojas maduras debido a que se encuentran bajo mayor presión selectiva por parte de herbívoros, lo que induce a la producción de metabolitos de defensa como compuestos fenólicos y saponinas. Adicionalmente, Treutter (2010) corrobora esta afirmación en su estudio sobre factores que influyen en la producción de compuestos fenólicos en diferentes especies incluyendo *Kalanchoe blossfeldiana*, obteniendo concentraciones superiores de fenoles totales en hojas de plantas jóvenes que en tejido maduro de las mismas, atribuyendo este fenómeno a la cantidad de carbohidratos disponibles en dicho tejido.

Según Jaramillo (2007), muchas especies del género *Kalanchoe* poseen en sus hojas bufadienolidos que tienen efecto antibacteriano e insecticida, esta afirmación es corroborada con el análisis de la variable contaminación del explante a los 21 días de siembra (Figura 17), puesto que aunque existió predominancia de la contaminación por bacteria en el ensayo, algunos explantes en los tratamientos “T5” y “T7” presentaban crecimiento de colonias bacterianas que no tocaban el explante (Figura 14), además el análisis inferencial nos permite afirmar con un nivel de confianza del 95%, que la contaminación por bacteria es totalmente independiente de los tratamientos utilizados (Cuadro 8), y puede deberse a factores adicionales como la manipulación del operador, deficiencia en el proceso de esterilización del material o del medio de cultivo. Texeira y colaboradores (2015) en su investigación sobre fuentes de contaminación de cultivos *in vitro*, afirma que la manipulación del material vegetal por parte del operador es uno de los factores que con mayor frecuencia causan contaminación del medio de cultivo.

Según Borges & colaboradores (2009) el uso de concentraciones de hipoclorito de sodio superiores al 2% (P/V) en la desinfección de explantes foliares de algunas especies de Crasuláceas producen un efecto fitotóxico sobre el tejido, causando

oxidación, necrosis y en algunos casos la muerte del explante. En la evaluación de la variable oxidación del explante a los 60 días de siembra en la etapa de Desinfección e Introducción (Figura 19) se observó que el tratamientos “T7” presentaron el mayor porcentaje de explantes oxidados (65%), y en segundo lugar el tratamiento “T9” con el (50%). Cabe recalcar que los tres tratamientos tienen una concentración de hipoclorito de sodio de 2.5% (P/V), siendo ésta la más alta del diseño experimental planteado, lo que puede ser la causa principal de una mayor frecuencia de oxidación entre estos tres tratamientos.

4.3. Inducción a callogénesis *in vitro* de explantes de hoja.

En cuanto al explante más adecuado para la inducción a callogénesis y la posterior extracción de metabolitos secundarios se eligió el explante de hoja *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri*, dando como resultado que en el 100% de los explantes en los que existió presencia de callo, este era de tipo friable. Este resultado es corroborado por varias investigaciones previas sobre callogénesis *in vitro* a partir de explantes de hoja de especies de *Kalanchoe* como la realizada por Mizonobe (2001) y Santos *et al.* (2014) en *Kalanchoe pinnata*. Santos & colaboradores (2014), afirmaron que el explante de hoja en específico induce a la formación de callo friable. Mientras que por su lado Mizonobe (2001) concluyó que este tipo de callo es el más adecuado para la producción de metabolitos secundarios *in vitro*.

Según Smetanska (2008) la fuente de carbono es un componente esencial para la inducción a callogénesis *in vitro*. A su vez afirmó que concentraciones entre el 2.5% (P/V) y el 7.5% (P/V) de azúcares en el medio aumentan la producción de metabolitos secundarios como alcaloides, antocianinas y compuestos fenólicos, pues inducen a un estado de estrés osmótico en las células de suspensiones celulares de varias especies. Basado en este estudio los medios para la etapa de inducción a callogénesis “M1”, “M2” y “M3” y “MC” contienen un 5% (P/V) de sacarosa para estimular la producción de metabolitos secundarios *in vitro*.

También Smetanska (2008), afirmó que aunque los niveles de auxina agregados al medio deben ser incrementados para la inducción a callogénesis *in vitro*, al superar la concentración de 1 mgL^{-1} puede llegar a inhibir la producción de metabolitos secundarios. En el caso de la auxina sintética 2,4-D en específico, Wongsen & colaboradores (2015) afirmaron que debe mantenerse en el medio de cultivo a niveles iguales o inferiores a 1 mgL^{-1} , para obtener mejores resultados en la obtención de callo *in vitro* con altas concentraciones de compuestos antioxidantes como flavonoides, ácido ascórbico, antocianinas y fenoles. En este estudio las concentraciones de 2,4-D utilizadas en los tratamientos de inducción a callogénesis se mantuvieron entre 0.5 mgL^{-1} y 1 mgL^{-1} , sin embargo el tratamiento “T2” que fue el que mayor porcentaje de explantes con presencia de callo obtuvo (65%) (Tabla 9), posee una concentración de 2,4-D de 0.5 mgL^{-1} (Tabla 2), considerada como adecuada. Adicionalmente el callo resultante obtuvo porcentajes de actividad antioxidante de hasta el 76,42%.

En la etapa de Inducción a callogénesis el tratamiento “T2” obtuvo el mayor porcentaje de explantes con presencia de callo a los 30 días de siembra con el 45% (Tabla 8) y a los 60 días volvió a obtener el mayor porcentaje con el 65% (Tabla 9), lo que quiere decir que el medio “M2” (1 mgL^{-1} de BAP y 0.5 mgL^{-1} de 2,4-D), fue el más apropiado para la inducción a callogénesis. Este resultado es superior al obtenido por Rodríguez y colaboradores (2014) en *Ugni molinae*, que al combinar 1 mgL^{-1} de BAP con 1 mgL^{-1} de 2,4-D obtuvo el 60% de formación de callo.

El control para esta etapa “TC” consistió en un medio MS (1962) sin fitoreguladores y obtuvo 0% de presencia de callo y 0% de oxidación del tejido calloso. Este resultado concuerda con el obtenido por Santos y colaboradores (2014) en *Kalanchoe pinnata* Lam., que indica que las especies de *Kalanchoe* no tienen tendencia a producir tejido calloso por sí solas, sino que requieren de una combinación de auxinas y citoquininas adecuadas, siendo el BAP y el 2,4-D los más utilizados en concentraciones entre 0.5 y 2 mgL^{-1} .

Sin embargo según Orham (2012), a pesar de que el 2,4-D es la auxina más utilizada en la inducción a callo friable para producción de metabolitos secundarios, también puede ocasionar oxidación indeseable del tejido. Esto se vió corroborado en su investigación en *Castilleja tenuiflora*, donde al combinar la auxina sintética 2,4-D

con citoquinas como BAP o KIN se dió lugar a la oxidación del 70% de los explantes. En este estudio podemos observar que el tratamiento “T3” de inducción a callogénesis, con la mayor concentración de 2,4-D (1 mgL^{-1}), en combinación con la mayor concentración de citoquina (1 mgL^{-1}), presentó el mayor porcentaje de explantes oxidados (45%) (Tabla 11).

4.4. Determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante.

El análisis realizado por Ganju & colaboradores (2016) en hojas de *Kalanchoe pinnata* afirmó que el 75.5% de componentes de las hojas de especies de *Kalanchoe* son solubles en alcoholes, especialmente en metanol, mientras que el 73.3% de componentes son solubles en agua. Esto indica que una solución alcohólica con una reducción en su pH es el mejor solvente para la extracción de fitoconstituyentes. Para la extracción de componentes de las hojas de *Kalanchoe gastonis bonnieri* en la determinación del contenido fenólico y capacidad antioxidante se utilizó una solución de metanol:solución de HCl (1N) (1:3), obteniendo resultados significativos en cuanto a cantidad de compuestos hidrosolubles fenólicos y otros componentes antioxidantes.

Adicionalmente, el análisis realizado por Arash & colaboradores (2016), sobre extracción de compuestos antioxidantes en *Trifolium pratense L.* para determinar fenoles totales y actividad antioxidante, ubica al metanol como el solvente con el máximo rendimiento de extracción de compuestos antioxidantes (13.89%), frente a otros solventes como el cloroformo (12.23%), hexano (10.79%), y etil acetato (6.39%). Fuentes & colaboradores (2017), atribuyen este fenómeno a la alta polaridad del metanol, en el que pueden solubilizarse la mayor parte de compuestos antioxidantes presentes en los tejidos vegetales como ácidos fenólicos, flavonoides y glucósidos de antocianinas. Para el análisis se utilizó metanol:solución de HCl (1N) (1:3), obteniendo porcentajes de capacidad antioxidante de hasta el 76,42% en el caso de la hoja *in vivo* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* (Tabla 13).

Al comparar los resultados de los ensayos de contenido de fenoles y capacidad antioxidante, se observa una correlación significativa entre los dos valores (Tabla 12 y Tabla 13). Las muestras de hoja *in vivo*, presentan el mayor contenido de fenoles (20

mg equivalentes de ácido gálico por g^{-1} muestra seca) y el mayor porcentaje de reducción de radicales DPPH (76,42%). Así mismo, las muestras de callo *in vitro* de 270 días poseen el menor contenido de fenoles (0,128 mg equivalentes de ácido gálico/g muestra seca) y el menor porcentaje de reducción de radicales DPPH (0,57%). Erkan & colaboradores (2008) explica esta correlación afirmando que los fenoles son importantes constituyentes de plantas por su función como secuestradores de radicales alcoxilos y peróxidos, así como agentes quelantes de iones metálicos, que los convierte en los principales compuestos que determinan la capacidad antioxidante de un extracto vegetal.

La Tabla 13, indica el resultado del ensayo de la determinación de la capacidad antioxidante de hoja *in vivo* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* con el método de reducción de radicales DPPH (76,42%). Este es comparable con los resultados de hoja de *Kalanchoe pinnata Lam.* (79%) y de *Kalanchoe daigremontiana* (56%) expuestos por Bogucha & colaboradores (2016) obtenidos con el mismo método y concentración del extracto (0.01 g mL^{-1}), permitiendo afirmar que *Kalanchoe gastonis bonnieri* y *Kalanchoe pinnata Lam.* tienen potenciales antioxidantes a nivel de laboratorio considerables y similares entre sí.

La Figura 25 indica que, el callo *in vitro* de 60 días presenta una coloración clara y casi totalmente transparente, mientras que el mismo tejido calloso a los 270 días en la mayor parte del tejido es de color marrón. De la misma forma, la cantidad de fenoles por gramo de muestra se ve reducida conforme transcurre el tiempo (0,143 mg de ácido gálico/g de muestra seca a los 60 días a 0,128 mg de ácido gálico por gramo de muestra seca a los 270 días) (Figura 27). La diferencia de valores puede estar afectada por el pardeamiento enzimático evidente en el tejido calloso de mayor tiempo de conservación, causando oscurecimiento del tejido y consumo de compuestos fenólicos (Arash *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos para el ensayo de contenido de fenoles que se muestran en la Figura 27, indican que la hoja *in vivo* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* tiene un contenido de fenoles cuatro veces mayor al de la hoja *in vitro* (20 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca frente a 5,7 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca). Este resultado no se desvía del expuesto por Parsaeimehr *et al.* (2010) que al comparar la cantidad de compuestos fenólicos

obtenidos de cultivo *in vitro* e *in vivo* de tres especies del género *Ephedra*, determinó que la planta *in vivo* requiere mayor producción de compuestos químicos de defensa ante agentes microbianos, depredadores y ambientales, como compuestos fenólicos, que los tejidos *in vitro* que mantienen condiciones ambientales controladas y de asepsia total.

Además, la Figura 29 indica que la capacidad antioxidante de las hojas tanto *in vivo* como *in vitro* es significativamente superior a la de las muestras de callo de 60 y 270 días. Lugato y colaboradores (2014) en su análisis de capacidad antioxidante en *Passiflora alata Curtis*, observó una reducción similar de dicho potencial en los tejidos de callo, y atribuye este fenómeno a que la desdiferenciación celular que ocurre en el proceso de callogénesis puede resultar en la pérdida de la capacidad de producción de compuestos antioxidantes. Además, George (2008) afirma que algunas sustancias solo son producidas por plantas completas y no por partes aisladas debido al desacoplamiento de la maquinaria enzimática.

La Figura 30 muestra la gráfica de correlación entre los resultados de los ensayos de determinación de contenido de fenoles y de capacidad antioxidante, con su respectivo coeficiente ($R^2=0,6871$). Estos resultados indican que existe una correlación media entre los dos. Piluzza & colaboradores (2011) en un estudio realizado en veinte y cuatro especies ethnoveterinarias obtuvo un coeficiente más cercano a la unidad ($R^2=0,9152$), que demuestra que existe una correlación entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante de las muestras.

Esta investigación buscó establecer una base científica comprobable del alto contenido de compuestos fenólicos que posee la planta de *Kalanchoe gastonis bonnieri*. Los resultados muestran que la planta *in vivo* madura presenta cantidades superiores de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante alta, frente a las muestras de cultivo *in vitro*. De tal modo, que futuras pudieran determinar el efecto del extracto de la planta madura *in vivo* en células tumorales cultivadas *in vitro* para de esta forma proponer un nuevo remedio natural que pueda contrarrestar los efectos de las enfermedades degenerativas como es el caso principalmente del cáncer.

5. CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

5.1. El mejor tratamiento para desinfección de explantes de hoja de *Kalanchoe gastonis bonnieri* es el tratamiento “T3” (1.5% V/V y 25 minutos de inmersión), pese a que el análisis exploratorio para la variable Viabilidad Total del explante a los 21 días de la siembra indica que no existe una diferencia entre este y el tratamiento “T6”, se elige como el tratamiento más eficiente por emplear una menor concentración del agente desinfectante.

5.2. El medio óptimo para inducción a callogénesis de explantes de hoja *in vitro* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* es “M2” puesto que tuvo el mayor porcentaje de explantes con presencia de callo (65%) y el segundo menor porcentaje de explantes oxidados (40%).

5.3. El extracto metanólico de hoja *in vivo* de *Kalanchoe gastonis bonnieri* es el que posee la mayor cantidad de compuestos fenólicos con una concentración de 20 mg/g de muestra seca y la mayor capacidad antioxidante con un porcentaje de reducción de radicales DPPH de 76,42%.

5.4. La contaminación por bacteria es independiente de los tratamientos de desinfección empleados, y puede atribuirse a errores en la manipulación del operador o en el proceso de esterilización del medio o de los implementos utilizados con un nivel de confianza del 95%.

5.5. Existe una correlación media ($R^2=0,6871$) entre los resultados de los ensayos de determinación de contenido de fenoles totales y de capacidad antioxidante.

6. CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

6.1. En investigaciones futuras sobre callogénesis *in vitro* de hoja de *Kalanchoe gastonis bonnieri* se recomienda la utilización de concentraciones bajas de 2,4-D, puesto que además de ser un compuesto mutagénico, puede causar inhibición en la producción de metabolitos secundarios, así como oxidación de los tejidos.

6.2. Se recomienda realizar subcultivos de callo *in vitro* de hoja de *Kalanchoe gastonis bonnieri* para evitar la oxidación del tejido y potenciar la producción de metabolitos secundarios.

6.3. Tomando en cuenta que existen una gran cantidad de compuestos antioxidantes que no son hidrosolubles como carotenoides, alcaloides y terpenos, se recomienda el uso de solventes liposolubles aparte del metanol para la extracción de metabolitos secundarios en la etapa de análisis de la capacidad antioxidante.

6.4. Los compuestos elicitors como el ácido jasmónico y el ácido salicílico pueden inducir la producción de metabolitos secundarios en tejidos *in vitro* que presenten una producción muy baja de los mismos, por lo que se recomienda su uso en concentraciones adecuadas.

6.5. Se recomienda la realización de un análisis de regresión logística en futuras investigaciones que contengan diseños experimentales con resultados dicotómicos, para poder tener una aproximación exacta del tratamiento mas eficiente.

7. CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, E., & Gillespie, K. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 875-877.
- Alam, N., Jahan, N., & Rafiquzzaman. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 143-152.
- Alberts, B., Bray, D., & Hopkin, K. (2004). *Essential Cell Biology*. Madrid: Medica Panamericana.
- Álvarez, M., Beltrán, P., & Mesa, L. (2011). Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea roxb*. *Tumbaga*, 107-124.
- Arash, K., Rosna, M., Sadegh, M., & Behrooz, B. (2016). In vitro Regeneration and Comparison of Phenolic Content, Antioxidant and Antityrosinase Activity of in vivo and in vitro Grown *Asparagus officinalis*. *Sains Malaysiana*, 373-381.
- Aremu, B., & Babalola, O. (2015). Classification and Taxonomy of Vegetable Macergens. *Frontiers in Microbiology* 6, 1361-1365.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 119-145.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas De Oxidación Y Oscurecimiento De Explantes Cultivados *In Vitro* . *Agronomía Mesoamericana*, 153-175.
- Baghban. (2005). Micropropagation .
- Baldwin, J. (2015). *Kalanchoe*: The Genus and its Chromosomes. *American Journal of Botany*, 572-579.
- Behe, B., Moore, E., & Cameron, A. (2003). Reposition Selected Herbaceous Perennials as Indoor Flowering Potted Plants Using Perceptual Mapping. *HortScience*, 460-464.

- Beraud, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *BOSQUE*, 111-118.
- Bhojwani, S., & Razdan, M. (1996). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Amsterdam: Elsevier.
- Blainski, A., Lopes, G., & Palazzo, J. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*, 6852-6865.
- Bogucha, A., Zidorn, C., Kasprzycka, M., Szymczak, G., & Szewczyk, K. (2016). Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1-7.
- Bopana, N., & Saxena, S. (2009). In vitro regeneration of clonally uniform plants of *Crataeva magna*: a high value medicinal tree by axillary branching method. *AGRIS*, 34-58.
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (Diciembre de 2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XI(2), 127-135.
- Breitmaie, E. (2006). Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis. En E. Breitmaie, *Terpenes* (págs. 1-9). Tübingen: GmbH & Co.
- Brown, L. (2008). Insects and mites. En L. Brown, *Applied Principles of Horticultural Science* (pág. 277). Oxford: MacMillan.
- Bustani, F. (2015). *Kalanchoe gastonis-bonnierii* (Donkey's Ears).
- Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo De Células Y Tejidos Vegetales: Fuente De Alimentos Para El Futuro. *Revista Digital Universitaria*, 1-16.
- Catucuago, C. (2009). *Propagación por hijuelos de la planta de la vida, Dulcamara (Bryophyllum gastonis bonnierii) utilizando 3 sustratos y evaluación de su efecto fungicida en la roya del fréjol (Uromyces phaseoli)*. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Pedro Moncayo.

- Cevallos, E. (26 de Noviembre de 1997). BIRM y Acupuntura. *INTER PRESS SERVICE*, pág. 4.
- Ciccoa, N., Lanorte, Paraggio, Viggiano, & Lattanzio. (2008). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 107-110.
- Dai, J., & Mumper, J. (2010). Plant Phenolics Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 7313-7352.
- Dasgupta, S., Parmar, A., & Patel, H. (2013). Preliminary Phytochemical Studies Of Kalanchoe Gastonis-Bonnieri. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* , 550-557.
- Davies, P. (2010). *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions*. New York: Cornell University.
- De la Luz Miranda, M. , Guzmán, A., & Huacuja, L. (2003). Male rat infertility induction/spermatozoa and epididymal plasma abnormalities after oral administration of Kalanchoe gastonis bonnierii natural juice. *Phytother Res*, 315-319 .
- Delporte, Backhouse, Inostroza, Aguirre, & Peredo. (2007). Analgesic activity of Ugni molinae (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 162-165.
- Dibbisa, D., Gigu, E., & Muthuswamy, M. (2016). Delaying Postharvest Ripening of Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.) by using 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid. *International Journal of Current Research and Review*, 65-73.
- DiMeo, Lemaur, Cornil, Lazzaroni, & Duroux. (2013). Free Radical Scavenging by Natural Polyphenols: Atom versus. *The Journal of Physical Chemistry*.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 505-512.
- Eliovson, S. (1973). *Wild Flowers of Southern Africa*. Johannesburg: McMillian South Africa Publishers LTD.

- Erkan, N., Ayranci, G., & Ayranci, E. (2008). Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 76-82.
- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Cholo Masapanta, L., & Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L.. . *Pastos y Forrajes*, 407-416.
- Fakruddin, M., Mazumdar, M., Mannan, K., & Chowdhury, A. (2012). Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. *Hindawi*, 8.
- Fertichem. (2010). 6-N-Bencil Aminopurina. *Fertichem*, 1-6.
- Fuentes, I., Vega, A., & Campos, R. (2017). Antioxidant Compound Extraction from Maqui (*Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz) Berries: Optimization by Response Surface Methodology. *Antioxidants (Basel)*, 1-10.
- Fuentes, Mesa, Ruiz, & Pelaez, F. (2005). Estudio histológico en callos de *Stylosanthes guianensis*. *Pastos Y Forrajes*, 198-207.
- Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M., & and Lanzotti, T. (2008). “Flavonoids from Carnation (*Dianthcaryophyllus*) and Their Antifungal Activity. *Phytochemistry Letters*, 44-8.
- Gamborg, Murashige, Thorpe, & Vasil. (1976). Plant Tissue Culture Media. *In Vitro*, 473-478.
- Ganju, K., & Ganju, E. (2016). Phytochemical Analysis Of Methanolic Extract Of Leaves Of *Kalanchoe Pinnata* (Lam.). *European Journal Of Pharmaceutical European Journal Of Pharmaceutical*, 359-361.
- Garcés, H., Champagne, C., Townsley, B., Park, S., Malho, R., Pedroso, M., . . . Sinha, N. (2007). Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *PNAS*, 15578-15583.
- George, E. (2008). Plant tissue culture procedure—Background. *Springer*.

- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). "The Function of Terpene Natural Products in the Natural World." *Nature Chemical Biology*, 408-414.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos Fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, 80-84.
- González, M. (26 de noviembre de 1997). Polémica por una "milagrosa" planta amazónica. *INTER PRESS SERVICE*, Pág. 2.
- González, R., Delgado, A., Zavaleta, M., & Herrera, E. (2009). La citocinina BAP promueve la acumulación de hexosas e incrementa la actividad de fosfoenolpiruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxicinas durante el retraso de la senescencia foliar de trigo. *SCIELO*, 379-391.
- Grases, C., & Ramírez, N. (1998). Biología reproductiva de cinco especies ornitófilas en un fragmento. *Revista De Biología Tropical*.
- Gupta, H. (2016). Essay on Plant Tissue Culture: History, Methods and Application. *Biology Discussion*, 1-5.
- Hernández, M., Sánchez, C., Villanueva, C., Gil, I., Jiménez, M., & Sánchez, I. (2009). Multiplicación In Vitro Vía Organogénesis En Calabaza. *Agronomía Mesoamericana*, 11-22.
- Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 10–20.
- Ibrahim, I. O., Memet, V. K., & Ozgen, E. (2006). Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 3-8.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 3159-3173.
- INEC. (1 de Diciembre de 2009). *Ecuador en Cifras*. Obtenido de Ecuador en Cifras: <http://www.ecuadorencifras.com/sistagroalim/pdf/Banano.pdf>

- Inglis, D., Grundersen, R., R., L., & Powelson, M. (1998). Results of the 1997 North American late blight fungicide trial. *Washington State University-REU*, 97331-2902.
- Jaramillo, A. (2007). *Proyecto para la elaboración de una bebida funcional de manzana enriquecida con Dulcamara*. Quito.
- Kabera, J., Semana, E., Mussa, A., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 377-392.
- Karakas, F., & Turker, A. (2013). An efficient in vitro regeneration system for *Bellis perennis* L. and. *Industrial Crops and Products*, 162-170.
- Khalafalla, M., Daffalla, H., Abdellatef, E., Agabna, E., & El-Shemy, H. (2011). Establishment of an in vitro micropropagation protocol for *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. ex Poir. *Biomed & Biotechnology*, 303-312.
- Khan, S., Naz, K., & S., Z. (2006). Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot tips. *Pakistan Journal of Botany*, 717-722.
- Krikorian, A. (1995). *Hormones in tissue culture and micropropagation*. *Plant Hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*. Netherlands: P. J. Davies.
- Kubitzki, K. (2007). The Families and Genera of Vascular Plants. En K. Kubitzki, *The Families and Genera of Vascular Plants*. Hamburgo: Springer.
- Leifert, C., Norris, C., & Waites, W. (1994). Ecology of Microbial Saprophytes and Pathogens in Tissue Culture and Field-Grown Plants: Reasons for Contamination Problems In Vitro. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 139-183.
- LLIFLE. (2013). *Bryophyllum gastonis bonnierii*. LLIFLE.
- Loberant, B., & Altman, A. (2010). Micropropagation of Plants. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, 1-17.
- Lodish, H., & Berk, A. (2012). DNA cloning with plasmid vectors. En H. Lodish, & A. Berk, *Molecular Cell Biology*. New York: MacMillan.

- Loomis, D. (2015). "Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid". *The Lancet Oncology*, 891-892.
- Lucas, E. (2002). Plant Portraits.451.Bryophyllum gastonis-bonnieri.Crassulaceae. *Curtis's Botanical Magazine*, 19, 227-231.
- Lugato, D., Simao, M., Garcia, R., Mansur, E., & Pacheco, G. (2014). Determination of antioxidant activity and phenolic content of extracts from in vivo plants and in vitro materials of Passiflora alata Curtis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 339–346.
- Maila, L. (2013). *Respuesta del cultivo de Dulcamara (Bryophyllum gastonis bonnierii) a la aplicación edáfica complementaria con tres tipos de Bioestimulantes en Cumbayá-Pichincha*. Universidad Central del Ecuador. Quito: Facultad de Ciencias Agrícolas.
- Maisterra, M. (2016). Hongos y plantas de interés medicinal en la Selva de Irati (Navarra). Ensayos de citotoxicidad del hongo obtenido de la Selva de Irati y comparación con tres plantas comerciales utilizadas en el tratamiento del cáncer. *Instituto Politécnico de Braganza*, 1-93.
- Malajovich, M. (2008). Micropropagación. Desinfección de los explantes. *Bioteología: Enseñanza y Divulgación*, 1-7.
- Mederos, K. (2016). Formación de una plántula del borde de la planta suculenta Oreja de Burro, Kalanchoe gastonis. *Naturaleza Tropical*.
- Milardovic, S., Ivekovic, D., & Bozidar, S. (2006). A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *ELSEVIER*, 175-180.
- Mizonobe, G. (2001). Basic research on tissue culture of Kalanchoe pinnata Pers., 2: Examination of characteristics and cultivation conditions of callus formation from leaves. *The Agriculture, Forestry and Fisheries Research Information Technology Center*, 50-57.

- Montoro, P., Etienne, H., Michaux-Ferrière, N., & Carron, M.-P. (1993). Callus friability and somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 331-338.
- Morgan, W. (2013). *Cultivo de Tejido Vegetal*. International Plant Laboratories, Baltonsborough.
- Munetaka, S. (1999). Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology*, 61-64.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 473-497.
- Muzitano, M., Tinoco, L., Guette, C., Kaiser, B., & Costa, S. (2006). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry* 67, 2071-2077.
- Nayak, S., Marshall, J., & Isitor, G. (2010). Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf—A preliminary study. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 572-576.
- Naz, S., Javad, S., Ilyas, S., & Ali, A. (2008). *An efficient protocol for rapid multiplication Bryophyllum pinnatum and Bryophyllum daigremontiana*. University of Sargodha, Lahore College for Women University, Lahore, Sargodha.
- Newman, R. A., Yang, P., Pawlus, A. D., & Block, K. (2008). Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic. *Molecular Interventions*, 36-49.
- Nicolaou, K. C., Chen, J., & Corey, E. (2011). *Classics in Total Synthesis. Further Targets, Strategies, Methods III III*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Orhan, I. (2012). *Biotechnological Production of Plant Secondary Metabolites*. Ankara: Bentham Science Publishers.
- Palomino, L., García, C., Rojano, B., & Durango, D. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. VITAE*.

- Park, E., Moon, W., Song, M., Kim, M., Chung, K., & Yoon, J. (2001). "Antimicrobial Activity of Phenol and Benzoic Acid Derivatives." . *International biodeterioration and biodegradation*, 209-214.
- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E., & Javidnia, K. (2010). A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activity and Total Content of Phenolic Compounds of Cell Cultures and Wild Plants of Three Endemic Species of Ephedra. *Molecules*, 1668-1678.
- Pella, V. (2011). *Kalanchoe Gastonis-Bonnieri Raym.-Hamet & H. Perrier E Kalanchoe Pinnata Pers. (Crassulaceae)*:. Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho", Araquara.
- Pérez, J. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Volumen 1. 1988*. Obtenido de [http://www.ecured.cu/Organog%C3%A9nesis_\(Biotecnolog%C3%ADa_Vegetal\)#Formaci.C3.B3n_de_yemas_adventicias](http://www.ecured.cu/Organog%C3%A9nesis_(Biotecnolog%C3%ADa_Vegetal)#Formaci.C3.B3n_de_yemas_adventicias).
- Piluzza, G., & Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twenty-four plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *Pharmaceutical Biology*, 240-247.
- Polt, R. (1995). Method for Making Amino Acid Glycosides and Glycopeptides. *Patent and Trademark Office* , 160-186.
- Puma, M. (2010). *Eficiencia del ácido ascórbico, ácido salicílico y extracto de Dulcamara (Bryophyllum gastonis bonnierii) en la prevención de Mildeo Velloso (Peronospora pulverulenta) en Gypsophila (Gypsophila paniculata)*. Universidad Politécnica Salesiana, Cayambe.
- Ramachandra, S., & Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 101-153.
- Reddy, P. (2015). *Plant Protection in Tropical Root and Tuber Crops*. Springer.
- Reusch, W. (11 de Diciembre de 2016). *Chemistry. LKibreTexts*. Obtenido de Terpenes:

https://chem.libretexts.org/Core/Organic_Chemistry/Lipids/Properties_and_Classification_of_Lipids/Terpenes

- Reyes, J. (2014). Cultivo In Vitro De Tejidos Vegetales De Plantas De La Familia. *Universidad ICESI*, 8-12.
- Rivero, N., Agramonte, D., Barbón, R., & Camacho, W. (2008). Embriogénesis somática en *Anthurium andraeanum* Lind. variedad Lambada. . *Ra Ximhai*, 135-149.
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 111-118.
- Rodríguez, M., Latsague, V., Chacón, M., & Astorga, p. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 111-118.
- Ruiz, L. (2009). Actividad Superficial de Mezclas de Soluciones de Surfactantes No-Iónicos Tween 20® y Tween 80® en Interfaz Líquido-Aire . *Facultad Experimental De Ciencias Y Tecnologia Departamento De Química* , 1-15.
- Santos, M., Ferreira, M., Guimaraes, M., Lima, R., & Oliveira, C. (2014). Callogenesis in leaves of *Kalanchoe pinnata* Lam. by 2,4-D and BA action. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 760-764.
- Sanz, A. (2012). *Escuela de Ingenierías Industriales*. Obtenido de Química Orgánica Industrial: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-12.php>
- Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2013). Phytochemistry of Medicinal Plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 168-182.
- Scherer, & Teixeira. (2008). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 654-658.
- Scott, G. (12 de Octubre de 2016). *Ecuador Export Opportunity with Dulcamaras*. Obtenido de Gary A. Scott: <http://www.garyascott.com/2007/02/26/1568.html>

- Segretín, M. (2011). *Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales)* Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA . Obtenido de <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Eug.pdf>
- Segretín, M. E. (2012). Los Cultivos Celulares y sus aplicaciones II. *ArgenBio*, 13-14.
- Shamaladevi, N., Araki, S., & Lyn, D. (2016). The andean anticancer herbal product BIRM causes destabilization of androgen receptor and induces caspase-8 mediated-apoptosis in prostate cancer. . *Oncotarget*, 84201-84213.
- Sharma, & Bha. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 1202-1205.
- SIGMA-ALDRICH. (2015). Folin-Ciocalteu's phenol reagent. *Product Information*, 1-2.
- Silva, C. (2013). *La demanda de Dulcamara en la industria farmacéutica de la ciudad de New York, Estados Unidos, y las estrategias de comercialización desde la Parroquia de Tabacundo, Provincia de Pichincha*. Tabacundo: Universidad Politécnica Estatal del Carchi.
- Smetanska, I. (2008). Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures. *Adv. Biochemical Engineering*, 187-228.
- Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* , 187-228.
- Srivastava, S., & Srivastava, A. (2007). Hairy Root Culture for Mass- Production of High-Value Secondary Metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29-43.
- Steeves, T., & Sussex, I. (2001). Patterns in Plant Development. *Cambridge University Press*.
- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., H., H., Akira, M., H., S., . . . H., O. (2001). Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontianax tubiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 947-949.

- Tejakhod, S., & Chu, C.-Y. (2009). Kalanchoe Regeneration from Flower Buds and Leaves in vitro. *Horticulture NCHU*, 53-62.
- Texeira, J., Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Disinfection procedures for in vitro propagation of Anthurium. *Folia Horticulturae*, 3-14.
- Trabelsi, Naija, Elloumi, Belfeleh, Msellem, & Ghezal. (2010). Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui. *Acta Physiologiae Plantarum*, 319-324.
- Tuttle, M. (2004). Protectant Fungicides for Managing Powdery Mildew in Cucurbits: How Do They Stack Up? *Vegetable MD Online*, 1-3.
- Valentin, J. (2005). *Respuesta de dos genotipos de Aguacate a la micropropagación utilizando diferentes combinaciones de auxinas y citocininas*, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas.
- Valko, M., Leibfritz, D., & Moncol, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiologicla functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39-44.
- Van den Berg, F., Pavely, N., & Van den Bosch, F. (2016). Dose and number of applications that maximize fungicide effective life exemplified by *Zymoseptoria tritici* on wheat – a model analysis. *Plant Pathology*, 1380-1389.
- Vijaya, S., Udayasri, P., Aswani, K., Ravi, B., Phani, K., & Vijay, V. (2010). Advancements in the production of secondary metabolites. *Nat Prod*, 112-123.
- Villanueva, F., Ávila, M., Mansilla, A., Abades, S., & Cáceres, J. (2013). Efecto De Auxinas Y Citoquininas En El Cultivo De Tejido De *Ahnfeltia plicata* (Hudson) Fries, 1836 (Ahnfeltiales, Rhodophyta) De La Región De Magallanes. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 99-111.
- Waterworth, K. (24 de Enero de 2013). *SFGATE*. Obtenido de <http://homeguides.sfgate.com/powdery-mildew-kalanchoe-plants-41457.html>

- White, Oliveira, Oliveira, Serafini, Araújo, Gelain, . . . Santos. (2014). Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review . *Molecules*, 14496-14527.
- Wieserma, J., & León, B. (2016). *World Economic Plants*. Atlanta: CRC Press.
- Wiggins, N., Forrister, D., Endara, M., Coley, P., & Kursar, T. A. (2016). Quantitative and qualitative shifts in defensive metabolites define chemical defense investment during leaf development in *Inga*, a genus of tropical trees. . *Ecology and Evolution*, 478-492.
- Wongsen, W., Bodhipadma, K., Noichinda, S., & Leung, D. (2015). Influence of different 2,4-D concentrations on antioxidant contents and activities in sweet basil leaf-derived callus during proliferation. *International Food Research Journal*, 638-643.
- Zang, Q., Zhou, L., Zhuge, F., Yang, H., Wang, X., & Lin, X. (2016). Zang, Q., Zhou, L., Zhuge, F Callus induction and regeneration via shoot tips of *Dendrocalamus hamiltonii*. *SpringerPlus*, 1799-1806.
- Zhao, D., Wang, Y., & Zhao, J. (1998). Effects of some factors on callus growth and flavonoids formation in callus cultures of *Sassurea medusa*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 141-147.
- Zhong, t., Zhu, C., Zeng, H., & Han, L. (2013). Analysis of gene expression in *Kalanchoe daigremontiana* leaves during plantlet formation under drought stress. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1-4.

