



Inducción a células madre en *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers., a partir de hojas

Masabanda Hidrovo, Kevin Andrés

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en
Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, PhD.

08 de marzo de 2023

Resultado de Análisis de Google Assignments

22/2/23, 12:25

Proyecto de Titulación

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Proyecto de Titulación SII OCT 22 - MAR 23

NOMBRE DEL ALUMNO

KEVIN ANDRES MASABANDA HIDROVO

NOMBRE DEL ARCHIVO

KEVIN ANDRES MASABANDA HIDROVO - Tesis

SE HA CREADO EL INFORME

22 feb 2023

Resumen

| | | |
|--------------------------------------|---|-----|
| Fragmentos marcados | 0 | 0 % |
| Fragmentos citados o entrecomillados | 0 | 0 % |



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “**Inducción a células madre en *Kalanchoe pinnate* (Lam) Pers., a partir de hojas**” fue realizado por el señor **Masabanda Hidrovo Kevin Andrés**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de febrero de 2023

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph. D.

C. I.: 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Masabanda Hidrovo, Kevin Andrés**, con cédula de ciudadanía n° 0502889280, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Inducción a células madre en *Kalanchoe pinnate* (Lam) Pers., a partir de hojas** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de febrero de 2023

.....
Masabanda Hidrovo, Kevin Andrés

C.C.: 0502889280



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Masabanda Hidrovo, Kevin Andrés**, con cédula de ciudadanía n° 0502889280, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Inducción a células madre en *Kalanchoe pinnate* (Lam) Pers., a partir de hojas** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 27 de febrero de 2023

.....
Masabanda Hidrovo, Kevin Andrés

C.C.: 0502889280

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación está dedicado especialmente:

En memoria de mi abuelita, Blanche quien fue y será un pilar fundamental durante toda mi vida.

En memoria de mi mascota, Fiona quien con sus ocurrencias me brindo momentos de felicidad y alegría.

A mi familia, mis padres Tatiana y Klever, mi hermano Klever, mis tíos, tías, primos por motivarme y brindarme apoyo incondicional.

A mis amigos que me brindaron su compañía durante este proceso.

A mis mascotas Lía, Karoline y Titan por ser mi motivación.

Kevin Andrés Masabanda Hidrovo.

Agradecimientos

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y todos aquellos que la conforman, docentes, técnicos y personal, por su colaboración y ayuda durante este proceso.

A Mónica Jadán, Ph. D. directora del proyecto, por brindarme su tiempo, apoyo, conocimientos y enseñanzas durante este proceso.

A la Mgtr. Andrea Ortega por su amistad, tiempo y ayuda dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros y compañeras de tesis y a Alexis.

A mis amigos por los bellos momentos a su lado y a mi mochila, sin ti no sería posible.

A mis mascotas, quienes fueron parte de mi vida por muchos años.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermano, gracias por siempre estar ahí.

Kevin Andrés Masabanda Hidrovo

Índice

| | |
|--|----|
| Resultado de Análisis de Google Assignments | 2 |
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de Autoría | 4 |
| Autorización de Publicación | 5 |
| Dedicatoria | 6 |
| Agradecimientos | 7 |
| Resumen | 12 |
| Abstract | 13 |
| Capítulo I: Introducción | 14 |
| Formulación del problema | 14 |
| Justificación | 14 |
| Objetivos..... | 15 |
| Objetivo General..... | 15 |
| Objetivos específicos..... | 15 |
| Hipótesis..... | 15 |
| Capítulo II: Marco Teórico | 16 |
| Hoja de aire (<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.) | 16 |
| Origen y distribución..... | 16 |
| Clasificación taxonómica..... | 16 |
| Características Morfológicas | 16 |
| Ecología..... | 17 |
| Plagas y enfermedades..... | 18 |
| Aplicaciones..... | 18 |
| Cultivo <i>in vitro</i> | 19 |
| Medios de cultivo..... | 20 |
| Comparación entre el medio de cultivo Murashige y Skoog y Woody Plant..... | 20 |
| Fotoperiodo | 21 |
| Prueba de Chi cuadrado | 22 |
| Capítulo III: Materiales Y Métodos | 23 |
| Localización del ensayo | 23 |
| Obtención de plantas | 23 |
| Fase de Laboratorio | 23 |
| Selección del material vegetal | 23 |
| Desinfección | 23 |

| | |
|--|----|
| Optimización del medio de cultivo..... | 24 |
| Inducción a callo..... | 24 |
| Capítulo IV: Resultados | 26 |
| Optimización de los medios de cultivo..... | 26 |
| Análisis Exploratorio..... | 26 |
| Análisis inferencial..... | 28 |
| Inducción a células madre..... | 31 |
| Análisis Exploratorio..... | 32 |
| Análisis inferencial..... | 34 |
| Capítulo V: Discusión | 38 |
| Optimización de los medios de cultivo..... | 38 |
| Inducción a células madre..... | 39 |
| Capítulo VI: Conclusiones | 42 |
| Conclusiones..... | 42 |
| Capítulo VII: Recomendaciones | 43 |
| Recomendaciones..... | 43 |
| Bibliografía | 44 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. <i>Comparación de los componentes de las sales minerales MS y WP.....</i> | 21 |
| Tabla 2. <i>Definición de tratamientos con su respectivo medio de cultivo y concentración de 2,4-D.....</i> | 25 |
| Tabla 3. <i>Porcentajes de explantes viables en diferentes concentraciones de medios de cultivo y sacarosa comercial a las tres semanas de cultivo</i> | 26 |
| Tabla 4. <i>Prueba de X² que determina la relación entre la variable viabilidad de explantes con la variable concentración de medio de cultivo MS con sacarosa comercial</i> | 30 |
| Tabla 5. <i>Prueba de X² que determina la relación entre la variable viabilidad de explantes con la variable concentración de medio de cultivo WPM con sacarosa comercial.....</i> | 31 |
| Tabla 6. <i>Porcentajes de explantes inducidos a células madre de cada tratamiento a los 21 días de cultivo</i> | 33 |
| Tabla 7. <i>Prueba de X² que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en fotoperiodo con la variable medio de cultivo.....</i> | 36 |
| Tabla 8. <i>Prueba de X² que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en oscuridad con la variable medio de cultivo</i> | 36 |
| Tabla 9. <i>Prueba de X² que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en fotoperiodo con la variable tratamiento y medio de cultivo.....</i> | 37 |
| Tabla 10. <i>Prueba de X² que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en oscuridad con la variable tratamiento y medio de cultivo.....</i> | 37 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. <i>Kalanchoe pinnata</i> L..... | 17 |
| Figura 2. <i>Representación porcentual de los explantes viables en diferentes concentraciones de medio de cultivo y sacarosa comercial</i> | 27 |
| Figura 3. <i>Histograma del porcentaje de explantes viables en diferentes concentraciones de medios de cultivo y sacarosa comercial</i> | 28 |
| Figura 4. <i>Gráfico de dispersión de explantes viables cultivados en diferentes concentraciones de medio de cultivo MS y WPM y, sacarosa comercial</i> | 29 |
| Figura 5. <i>Explantes de Kalanchoe pinnata L inducidos en medio de cultivo MS y WPM después de tres semanas</i> | 30 |
| Figura 6. <i>Explantes de Kalanchoe pinnata L inducidos en medio de cultivo MS y WPM en fotoperiodo después de cinco semanas</i> | 31 |
| Figura 7. <i>Explantes de Kalanchoe pinnata L inducidos en medio de cultivo MS y WPM en oscuridad después de cinco semanas</i> | 32 |
| Figura 8. <i>Representación porcentual de los explantes inducidos a células madre de cada tratamiento</i> | 34 |
| Figura 9. <i>Histograma del porcentaje de explantes inducidos a células madre en cada tratamiento</i> | 34 |
| Figura 10. <i>Gráfico de dispersión del porcentaje de explantes inducidos a células madre en cada tratamiento</i> | 35 |

Resumen

La hoja de aire o penicilina (*Kalanchoe pinnata* L.) es una planta de la familia Crassulaceae de importancia farmacológica debido a sus metabolitos secundarios que es capaz de sintetizar frente a estímulos bióticos y abióticos. Sin embargo, su cultivo está limitado por los costos asociados con su producción a gran escala y por las implicaciones ecológicas subyacentes de introducir una planta foránea para el cultivo a gran escala. Los objetivos de esta investigación fueron optimizar un medio de cultivo para la inducción de células madre de *Kalanchoe pinnata* L., inducir la formación de células madre en *Kalanchoe pinnata* L. y exponer cultivos de células madre de *Kalanchoe pinnata* L. a diferentes fotoperiodos. Se demostró que el medio de cultivo con plena concentración de sales minerales Murashige y Skoog (MS) y Woody Plant (WPM), en ambos casos suplementado con 30g/L de sacarosa, permitió obtener una viabilidad del 87% y 88%, respectivamente. De igual forma, la concentración de 1,5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) tuvo una tasa de formación de células madre del 23% y 28% en fotoperíodo y oscuridad, respectivamente. Finalmente, se observó que los callos formados en fotoperíodo tenían una morfología friable con coloración verdosa, en comparación con los mantenidos en la oscuridad con morfología friable y coloración blanca.

Palabras clave: *Kalanchoe pinnata* L., Murashige y Skoog (MS), Woody Plant (WPM), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), fotoperíodo.

Abstract

The air leaf or penicillin (*Kalanchoe pinnata* L.) is a plant of the Crassulaceae family of pharmacological importance due to its secondary metabolites that it is capable of synthesizing against biotic and abiotic stimuli. However, its cultivation is limited by the costs associated with its large scale production and by the underlying ecological implications of introducing a foreign plant for large scale cultivation. The objectives of this research were to optimize a culture medium for the induction of *Kalanchoe pinnata* L. stem cells from explants, to induce stem cell formation in *Kalanchoe pinnata* L., and to expose cultures of *Kalanchoe pinnata* L. stem cells to different photoperiods. It was shown that the culture medium with full concentration of Murashige and Skoog (MS) and Woody Plant (WPM) mineral salts, in both cases supplemented with 30 g/L of sucrose, allowed obtaining a viability of 87% and 88%, respectively. Similarly, the 1.5 mg/L concentration of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) had a stem cell formation rate of 23% and 28% in photoperiod and darkness, respectively. Finally, it was observed that the calli formed in photoperiod had a friable morphology with greenish coloration, compared to those maintained in the dark with friable morphology and white coloration.

Keywords: *Kalanchoe pinnata* L., Murashige y Skoog (MS), Woody Plant (WPM), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), photoperiod.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La planta *Kalanchoe pinnata* L. debido a sus efectos farmacológicos resulta de gran interés para la industria (Rajsekhar *et al.*, 2016). Sin embargo, el cultivo de esta planta es limitado debido al coste de producción y las condiciones climáticas necesarias para su desarrollo. Adicionalmente, existen implicaciones ecológicas subyacentes de introducir una especie foránea asociadas al cultivo en gran escala (Gutiérrez *et al.*, 2019).

La especie *Kalanchoe pinnata* L. posee metabolitos secundarios los cuales, son compuestos químicos que son sintetizados como un mecanismo de defensa ante condiciones adversas ya sean bióticas o abióticas (Ducoing *et al.*, 2003). Por otro lado, a pesar de existir el estímulo necesario para la producción de metabolitos secundarios, la concentración de los mismos en la planta es variable, volviendo el proceso de obtención ineficiente al considerar que serán necesarios diferentes protocolos de extracción y purificación del compuesto de interés según los explantes utilizados (D. E. García, 2004).

Justificación

Las plantas son organismos que durante toda su vida se mantienen en desarrollo y crecimiento debido a la totipotencia y pluripotencia de sus células (Stahl & Simon, 2004). Ivanov (2003) menciona que, las células de la planta pueden transformarse en células madre y su regulación es mediada principalmente por la interacción entre células madre y células en división activa. Sin embargo, existen fitorreguladores como las auxinas y citoquininas que son necesarias para inducir y mantener las células madre (Pierre *et al.*, 2018).

En *Kalanchoe pinnata* L, los compuestos de interés son únicamente sus metabolitos secundarios y la forma de obtener el mayor rendimiento sin necesidad de cultivar la planta,

es su producción a través de células madre (Torres, 2017). Sin embargo, es necesario la optimización de un medio de cultivo específico, las condiciones de luminiscencia e identificar la fitohormona y concentración adecuada para la inducción de células madre.

Objetivos

Objetivo General

- Inducir a células madre en *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers, a partir de hojas.

Objetivos específicos

- Optimizar un medio de cultivo adecuado para la inducción a células madre de *Kalanchoe pinnata* L. y su conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, utilizando cultivo *in vitro*, en la provincia de Pichincha.
- Inducir a la formación de células madre de *Kalanchoe pinnata* L., utilizando tres concentraciones de 2,4-D para su conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, utilizando cultivo *in vitro*, en la provincia de Pichincha.
- Exponer los cultivos de células madre de *Kalanchoe pinnata* L., a diferentes fotoperiodos para observar el mejor desarrollo y su posterior conservación en el banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, utilizando cultivo *in vitro*, en la provincia de Pichincha.

Hipótesis

- La fitohormona 2,4-D induce la obtención de células madre de *Kalanchoe pinnata* L., a partir de hojas.

Capítulo II: Marco Teórico

Hoja de aire (*Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.)

Origen y distribución

Kalanchoe pinnata L., es conocida comúnmente como hoja de aire u hoja fresca, es una planta originaria de Madagascar y Sudáfrica (Lebigre, 1998). Sin embargo, se encuentra distribuida en gran parte de las regiones tropicales y subtropicales; siendo considerada una especie invasiva en varios países (Smith & Crouch, 2021).

Clasificación taxonómica

La planta *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. según (Ortiz *et al.*, 2009), su clasificación taxonómica es:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Saxifragales

Familia: Crassulaceae

Subfamilia: Kalanchoideae

Género: *Kalanchoe*

Especie: *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

Características Morfológicas

La especie *Kalanchoe pinnata* L. es un arbusto perenne con una altura promedio de 1,5 m; los tallos son huecos con una coloración marrón, erectos y

cilíndricos; sus hojas son de color verde y su borde es festoneado de color rojo oscuro; sus flores son rojas en forma de campana (Bhatti *et al.*, 2012)

Figura 1

Kalanchoe pinnata L.



Nota. Tomado de Gutiérrez *et al.* (2019).

Ecología

Kalanchoe pinnata L. es una hierba perenne, suculenta y hermafrodita que habita frecuentemente en climas cálidos, semicálidos y templados con hasta 2600 metros sobre el nivel del mar. La madurez sexual la alcanza aproximadamente en dos años, siendo los meses de noviembre a marzo donde regularmente florece; *Kalanchoe pinnata* L. presenta regeneración clonal a partir de raíces y hojas, además sus semillas al ser de un diámetro inferior a 1 milímetro de diámetro pueden esparcirse en con el viento y por medio de animales (Rehman *et al.*, 2019). Sin embargo, según González de León *et al.* (2016), la reproducción alogámica es la predominante en esta planta.

La especie resulta ser resistente y adaptable a diferentes ambientes bióticos, por lo cual puede llegar a convertirse en una plaga e invadir el hábitat de otras especies vegetales.

Por consiguiente, es recomendable mantenerlas en macetas para así evitar que se convierta en una especie invasiva (Paniagua *et al.*, 2020).

Plagas y enfermedades

La especie *Kalanchoe pinnata* L. posee metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, esteroides, saponinas, cetonas, taninos, aminoácidos, aldehídos y aminas que la vuelven resistente a contraer enfermedades y plagas. Sin embargo, la plaga que se logra encontrar de manera más frecuente son pulgones y hongos que, principalmente, producen caídas de hojas (Cardozo & Gómez, 2019).

Los pulgones pueden provocar daño de dos diferentes maneras: en primera instancia absorben el floema de la planta y se alimentan de los nutrientes, provocando un desbalance en el crecimiento hormonal que puede provocar la senescencia de las hojas; por otro lado, al alimentarse de la planta, los pulgones excretan melaza que favorece el desarrollo de hongos (Kun, 2019).

Aplicaciones

Kalanchoe pinnata L. es una especie que presenta propiedades antihelmínticas en sus raíces, las que pueden ser utilizadas para preparar extractos vegetales que pueden producir parálisis e incluso muerte de gusanos (Ferreira *et al.*, 2014). El extracto de hojas de *Kalanchoe pinnata* L. debido a los glucósidos, esteroides y flavonoides presentes, posee actividad de cicatrización (Silva *et al.*, 2022). Un extracto acuoso de hojas presenta actividad nefroprotectora y antioxidante debido que para Muñoz Martínez *et al.* (2020), protege los riñones de los efectos adversos relacionados a la gentamicina. Debido a la presencia de quercetina, isoramnetina y kaempferol, las raíces tratadas con éter, cloroformo, metanol y agua presentan actividad antimicrobiana (Lima, 2022).

Por otro lado, existen extractos de *Kalanchoe pinnata* L. que se comercializan libremente, como es el caso de Europa en donde la venta de extracto está autorizada como ingrediente no perfumante de cosméticos (Silva *et al.*, 2022).

Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* consiste en la aplicación de múltiples técnicas que tienen como objetivo el cultivar un explante que puede ser una célula, tejido u órgano en un recipiente con un ambiente controlado; teniendo como característica principal la asepsia y el control de factores implicados en el crecimiento y desarrollo de la planta (Castillo, 2017). El explante seleccionado para el cultivo *in vitro* debe ser de una planta de interés y su crecimiento o desarrollo se fundamenta en la capacidad de totipotencia de las plantas.

Las aplicaciones del cultivo *in vitro* son la propagación clonal, obtención de metabolitos secundarios, conservación de bancos de germoplasma, investigación, entre otros; por lo tanto, la aplicación justificará el medio de cultivo donde se cultiva el explante puede variar en cuanto al contenido nutricional, concentración de reguladores de crecimiento, exposición a la luz, calor y humedad (Cañal *et al.*, 2001).

El cultivo *in vitro* consta de principalmente cuatro etapas, sin embargo, en dependencia del objetivo o aplicación se realizan etapas adicionales como el caso de la callogénesis para la obtención de metabolitos secundarios (Levitus *et al.*, 2010). Las fases del cultivo *in vitro* son la fase de preparación, fase de desinfección, fase de establecimiento y fase de multiplicación (Suárez, 2020).

La callogénesis es una etapa del proceso de organogénesis indirecta, la misma que se realiza para obtener variación somaclonal al permitir expresar o eliminar características que no se encuentran de manera regular (Rodríguez *et al.*, 2014). Generalmente, la inducción a callo es realizada para la producción de metabolitos secundarios, considerando que de esta manera no es necesario el mantenimiento de toda la planta. Para realizar callogénesis de un explante, los medios de cultivo se suplementan con reguladores de crecimiento ya sean auxinas o citoquininas que favorecen la dediferenciación del explante (Santos *et al.*, 2014).

Los reguladores de crecimiento o fitorreguladores son compuestos que regulan el crecimiento y desarrollo morfológico en plantas ya sea inhibiendo o estimulando la aparición

de distintos estadios (Bottini, 2019). Las fitohormonas pueden ser de origen natural o sintético y; entre los principales grupos se encuentran las auxinas, citoquininas, ácido abscísico, giberelinas y etileno (Reinoso, 2003). La elección del tipo de regulador de crecimiento dependerá del objetivo que se persiga; en el caso de la inducción a callo, se utiliza principalmente auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Borjas *et al.*, 2020).

El 2,4-D es el primer herbicida sintético hormonal auxínico comercializado utilizado para hojas. Sin embargo, actualmente es utilizado también como un regulador de crecimiento que favorece la formación de callos e inducción de embriones somáticos, presenta sinergismo con el glifosato pero antagonismo con otros reactivos de alta reacción alcalina (Peterson *et al.*, 2016).

Medios de cultivo

Comparación entre el medio de cultivo Murashige y Skoog y Woody Plant

El medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) fue desarrollado en 1962 por Toshio Murashige y Folke Skoog; es considerado el medio de cultivo estándar para el crecimiento y desarrollo de explantes vegetales con excepción de aquellos intolerantes a la salinidad (Witte *et al.*, 2002). Por otro lado; el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) a diferencia del medio de cultivo MS posee una menor concentración de sales inorgánicas siendo apropiado para el cultivo de plantas leñosas (McCown & Sellmer, 1987). Un investigación realizada por Avilés *et al.* (2010) donde utilizaron medios de cultivo MS y WPM en *Juglans regia* L, se obtuvo como resultados que existe diferencia significativa. Igualmente Torres (2017), presentó resultados positivos en la obtención de callos en *Kalanchoe pinnata* L. utilizando medio de cultivo MS. Sin embargo, aún no existen estudios donde se utilice WPM en *Kalanchoe pinnata* L.

Tabla 1

Comparación de los componentes de las sales minerales MS y WP.

| Murashige y Skoog | | Woody Plant | |
|---|-------------|---|-------------|
| Componentes | mg/l | Componentes | mg/l |
| Macro sales | | | |
| KNO ₃ | 1900 | NH ₄ NO ₃ | 400 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1800.54 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 72.5 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 440 | Ca(NO ₃) ₂ | 386.8 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 370 | KH ₂ PO ₄ | 1700 |
| | | K ₂ SO ₄ | 990 |
| Micro sales | | | |
| H ₃ BO ₃ | 6.2 | H ₃ BO ₃ | 6.25 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.025 | MnSO ₄ | 22.3 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 22.3 | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.6 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 8.6 | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.25 |
| Na ₂ MnO ₄ ·2H ₂ O | 0.25 | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0,25 |
| KI | 0.83 | | |
| CaCl ₂ ·6H ₂ O | 0.025 | | |
| Vitaminas | | | |
| Ácido nicótico | 0.5 | Ácido nicótico | 0.5 |
| Peróxido HCL | 0.5 | Peróxido HCL | 0.5 |
| Tiamina HCL | 0.1 | Tiamina HCL | 1 |
| Inositol | 100 | Inositol | 100 |
| Glicina | 2 | Glicina | 2 |
| EDTA | | | |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | FeNaEDTA | 36.7 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | | |
| Sucrosa | 30 g | Sucrosa | 30 g |
| Agar - agar | 8 g | Agar - agar | 8 g |

Nota. Recuperado de Kolavi (2014).

Fotoperiodo

El fotoperiodo es definido como la cantidad de luz y oscuridad proporcionada durante un periodo de 24 horas y para especies vegetales es un indicador estacional; considerando que las especies vegetales se desarrollan en estaciones específicas debido a las condiciones ambientales de cada una, el fotoperiodo se encuentra involucrado en la

regulación de la floración, tuberización y formación de yemas (Jackson, 2009). La respuesta al fotoperiodo depende del reloj circadiano que es regulado por la duración de la exposición a la luz y según Biorad, (2021), en una especie vegetal la exposición a la luz durante una fase de desarrollo, podría activar, inhibir o desencadenar un nuevo estado de desarrollo.

Prueba de Chi cuadrado

La prueba de Chi cuadrado (X^2) permite identificar las relaciones de independencia o dependencia de las variables independientes con la dependiente (Gómez, 2008). Si los valores de p obtenidos son mayores al establecido se acepta la hipótesis nula (H_0) que plantea la independencia de la variable independiente con la dependiente y, si los valores de p son menores al establecido se rechaza la H_0 y se acepta la hipótesis alternativa (H_1) demostrando la dependencia de la variable dependiente con la independiente (Sánchez, 2020).

Capítulo III: Materiales Y Métodos

Localización del ensayo

El trabajo de integración curricular fue realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicada en la Av. General Rumiñahui de la ciudad de Sangolquí, del cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha 0° 18,81 S; 78° 26,64 O.

Obtención de plantas

Las plantas *Kalanchoe pinnata* L. necesarias para el trabajo de integración curricular fueron adquiridas en la ciudad del Puyo S1°29'1.28" O78°0'9.25" y, posteriormente, aclimatizadas durante tres meses en la ciudad de Sangolquí 0° 18,81 S; 78° 26,64 O.

Fase de Laboratorio

La fase experimental del proyecto fue desarrollada en los laboratorios de Cultivo de Tejidos de la Carrera de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Selección del material vegetal

El material vegetal utilizado para la inducción a células madre de *Kalanchoe pinnata* L., fueron hojas de aproximadamente dos semanas, de un tamaño de 8 a 12 centímetros.

Desinfección

El protocolo utilizado para la desinfección de las hojas de *Kalanchoe pinnata* L. fue el descrito por Torres (2017), consistiendo, inicialmente, en un lavado con agua corriente para retirar impurezas de gran tamaño. A continuación, las hojas fueron sumergidas en una solución de detergente al 1%, a los 10 minutos se realizaron tres lavados con agua corriente. Posteriormente, las hojas se sumergieron en una solución de pesticida "Naturam" distribuido por INTEROC S.A. (Fungicida de contacto) al 1% durante 10 minutos, de manera

inmediata culminado el tiempo, se retiró la solución de pesticida y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos. Finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril dentro de una cámara de flujo laminar marca ESCO SHC-4A2

Optimización del medio de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron MS y WPM. Para la elección de la concentración de los medios de cultivo óptima se varió la concentración de medio de cultivo y la cantidad de sacarosa comercial. De tal manera que, se utilizó para el medio de cultivo MS, la concentración completa de sales minerales MS con 30 g/L de sacarosa comercial y, $\frac{1}{2}$ de sales minerales MS con 15 g/L de sacarosa comercial y; para el medio de cultivo WPM, la concentración completa de sales minerales WPM con 30 g/L de sacarosa comercial y, $\frac{1}{2}$ de sales minerales WPM con 15 g/L de sacarosa comercial. El medio de cultivo tuvo como agente gelificante, en todos los casos, 2,1 g/L de Pythagel y un pH ajustado entre 5,7 y 5,8. Posteriormente, fueron autoclavados en la autoclave Tuttnauer 3870EA a 121°C por 30 minutos.

Inducción a callo

Las hojas desinfectadas se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se les retiró el borde y se realizaron cortes para formar segmentos de hoja de aproximadamente 2,5 centímetros. Se sembró cuatro segmentos de hoja por cada frasco conteniendo 30 ml de medio de cultivo suplementado con 3 diferentes concentraciones del fitorregulador 2,4-D por cada tratamiento descrito en la Tabla 2. Para cada tratamiento se utilizaron 10 frascos incubados en la sala de incubación con una temperatura $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, de los cuales 5 se incubaron en oscuridad y 5 en un fotoperiodo de 12; en tres repeticiones para cada tratamiento.

Tabla 2

Definición de tratamientos con su respectivo medio de cultivo y concentración de 2,4-D.

| Tratamiento | Medio de cultivo | 2,4-D (mg/l) |
|--------------------|-------------------------|---------------------|
| T0 (control) | | 0 |
| T1 | | 0.5 |
| T2 | MS | 1 |
| T3 | | 1.5 |
| T0 (control) | | 0 |
| T1 | | 0.5 |
| T2 | WPM | 1 |
| T3 | | 1.5 |

Capítulo IV: Resultados

Optimización de los medios de cultivo

Para la optimización de los medios de cultivo se evaluó la viabilidad de los explantes, en donde se varió la concentración de los medios de cultivo con sales minerales de MS y WPM, en conjunto con la concentración de sacarosa comercial.

Análisis Exploratorio

Los porcentajes de viabilidad de los explantes en diferentes concentraciones de medio de cultivo y sacarosa comercial se observa en la Tabla 3. En un medio de cultivo con concentración de 4,43 g/L de sales minerales MS y 30 g/L de sacarosa comercial se obtuvo la mayor viabilidad correspondiente a 87%. Por otro lado, para el medio de cultivo WPM, la concentración de 2,41 g/L de medio de cultivo con 30 g/L de sacarosa comercial presentaron el porcentaje de viabilidad de 88%.

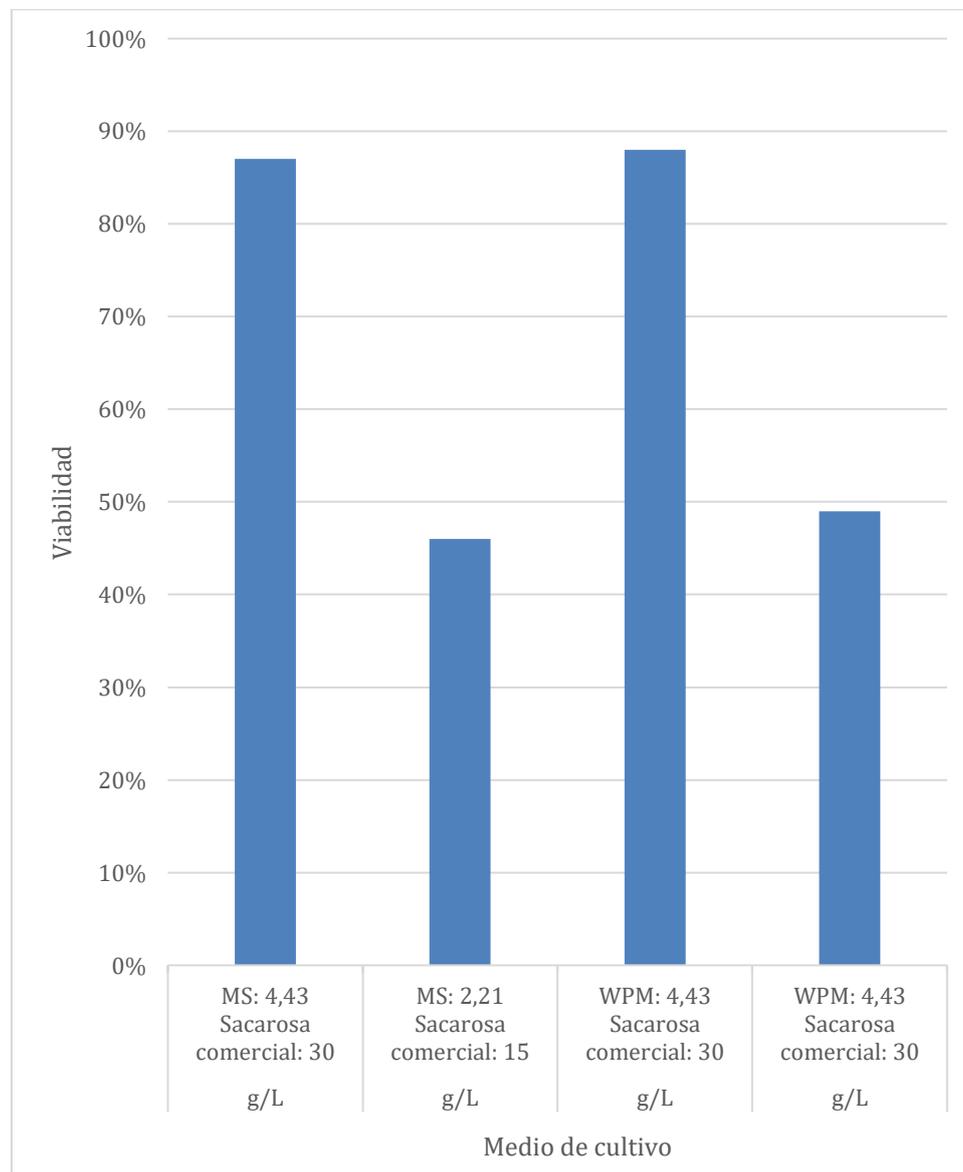
Tabla 3

Porcentajes de explantes viables en diferentes concentraciones de medios de cultivo y sacarosa comercial a las tres semanas de cultivo.

| Medio | Sacarosa comercial g/L | Viabilidad |
|--------------|-----------------------------------|-------------------|
| MS | 30 | 87% |
| ½ MS | 15 | 46% |
| WPM | 30 | 88% |
| ½ WPM | 15 | 49% |

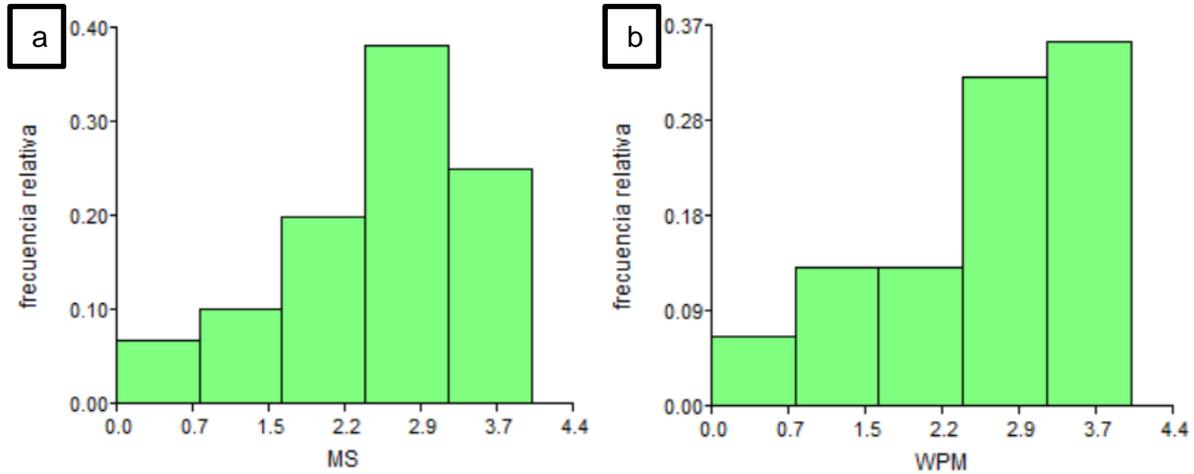
Figura 2

Representación porcentual de los explantes viables en diferentes concentraciones de medio de cultivo y sacarosa comercial.



*Análisis inferencial***Figura 3**

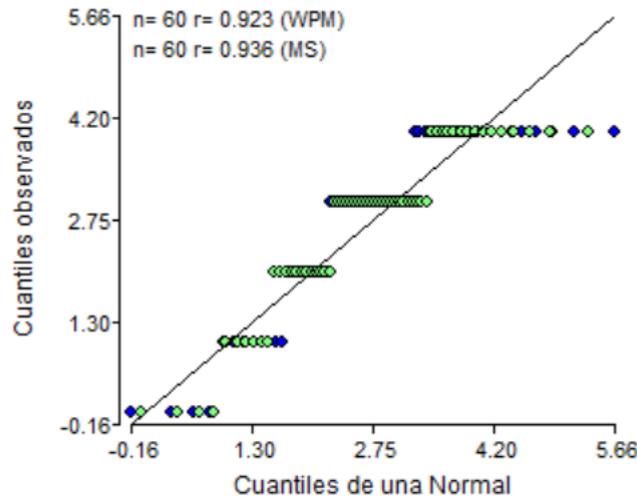
Histograma del porcentaje de explantes viables en diferentes concentraciones de medios de cultivo y sacarosa comercial.



Nota. A) Histograma para explantes viables cultivados en diferente concentración de medio de cultivo MS y sacarosa comercial, B) Histograma para explantes viables cultivados en diferente concentración de medio de cultivo WPM y sacarosa comercial.

Figura 4

Gráfico de dispersión de explantes viables cultivados en diferentes concentraciones de medio de cultivo MS y WPM y, sacarosa comercial.



Nota. Símbolos de color azul correspondientes a los explantes cultivados a diferentes concentraciones de medio de cultivo MS y sacarosa comercial. Símbolos correspondientes a los explantes cultivados a diferentes concentraciones de medio de cultivo WPM y sacarosa comercial.

Los resultados obtenidos de la viabilidad de los explantes tras 14 días de incubación presentaron una distribución no normal (Figura 3 y 4); por lo tanto, para su análisis se aplicó la prueba no paramétrica de independiente X^2 con un valor nominal de significancia (p) de 0,05.

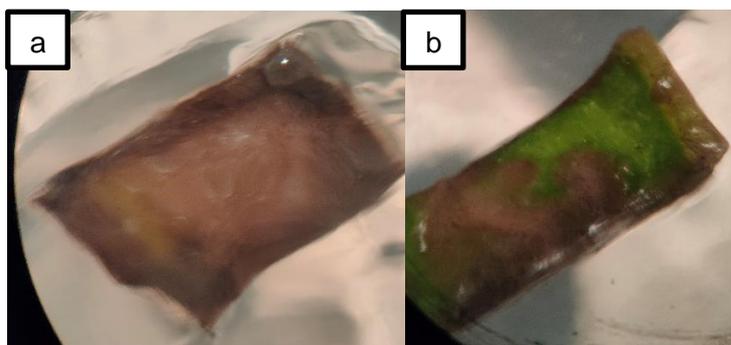
Para identificar la relación de la viabilidad de los explantes con la concentración de medio de cultivo y de sacarosa comercial, se planteó como H_0 que el número de explantes viables son independientes de la concentración de medio de cultivo y de sacarosa comercial y, como H_1 que el número de explantes viables son dependientes de la concentración de medio de cultivo y de sacarosa comercial.

En el caso del medio de cultivo MS se obtuvo un valor de $p = 0,0001$ (Tabla 4), que al ser menor del valor p establecido demuestra que el número de explantes viables son

dependientes de la concentración del medio de cultivo MS y de sacarosa comercial. Por otro lado, con el medio de cultivo WPM se obtuvo un valor de $p = 0,0003$ (Tabla 5); por lo cual, se afirma que, el número de explantes viables son dependientes de la concentración del medio de cultivo WPM y de sacarosa comercial.

Figura 5

Explantes de Kalanchoe pinnata L inducidos en medio de cultivo MS y WPM después de tres semanas.



Nota. a) Explante de hoja de *Kalanchoe pinnata* L. inducido en medio de cultivo con sales minerales de MS, b) Explante de hoja de *Kalanchoe pinnata* L. inducido en medio de cultivo WPM.

Tabla 4

Prueba de X² que determina la relación entre la variable viabilidad de explantes con la variable concentración de medio de cultivo con sales minerales de MS con sacarosa comercial.

| Estadístico | Valor | gl | P |
|------------------------|-------|----|--------|
| Chi Cuadrado Pearson | 15,10 | 1 | 0,0001 |
| Chi Cuadrado MV-G2 | 15,35 | 1 | 0,0001 |
| Coef. Conting. Gramer | 0,31 | | |
| Coef. Conting. Pearson | 0,29 | | |

Tabla 5

Prueba de X² que determina la relación entre la variable viabilidad de explantes con la variable concentración de medio de cultivo WPM con sacarosa comercial.

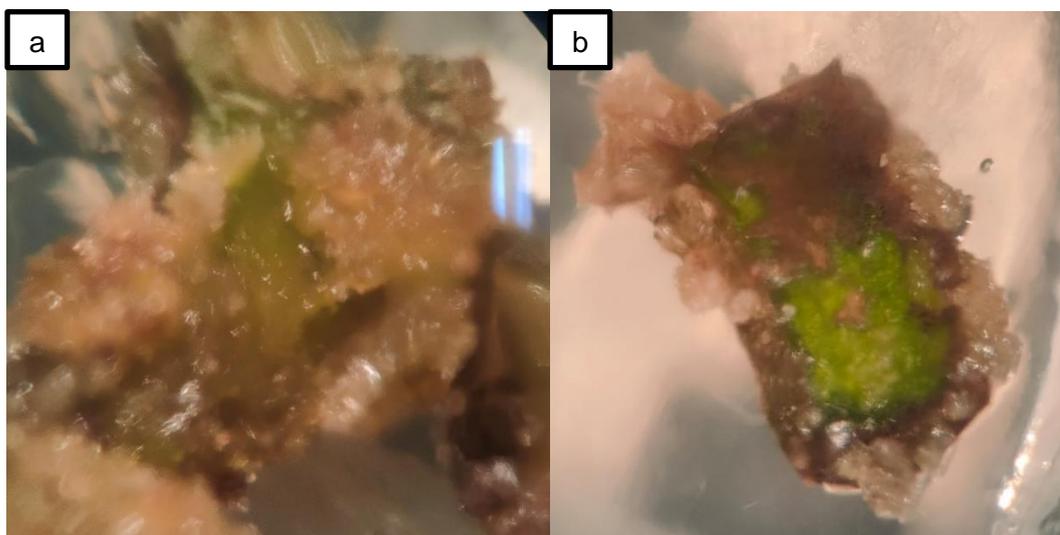
| Estadístico | Valor | gl | P |
|------------------------|--------------|-----------|----------|
| Chi Cuadrado Pearson | 13,39 | 1 | 0,0003 |
| Chi Cuadrado MV-G2 | 13,58 | 1 | 0,0002 |
| Coef. Conting. Gramer | 0,28 | | |
| Coef. Conting. Pearson | 0,27 | | |

Inducción a células madre

En esta etapa se evaluó la presencia o ausencia de células madre en cada explante sembrado tanto en los mejores tratamientos de los medios de cultivo MS como WPM (completos), con los respectivos tratamientos con el fitorregulador 2,4-D (Tabla 2), después de tres semanas de la introducción. Posteriormente, se observaron las diferencias morfológicas de las células madre inducidas en fotoperiodo (Figura 6) y oscuridad Figura (7).

Figura 6

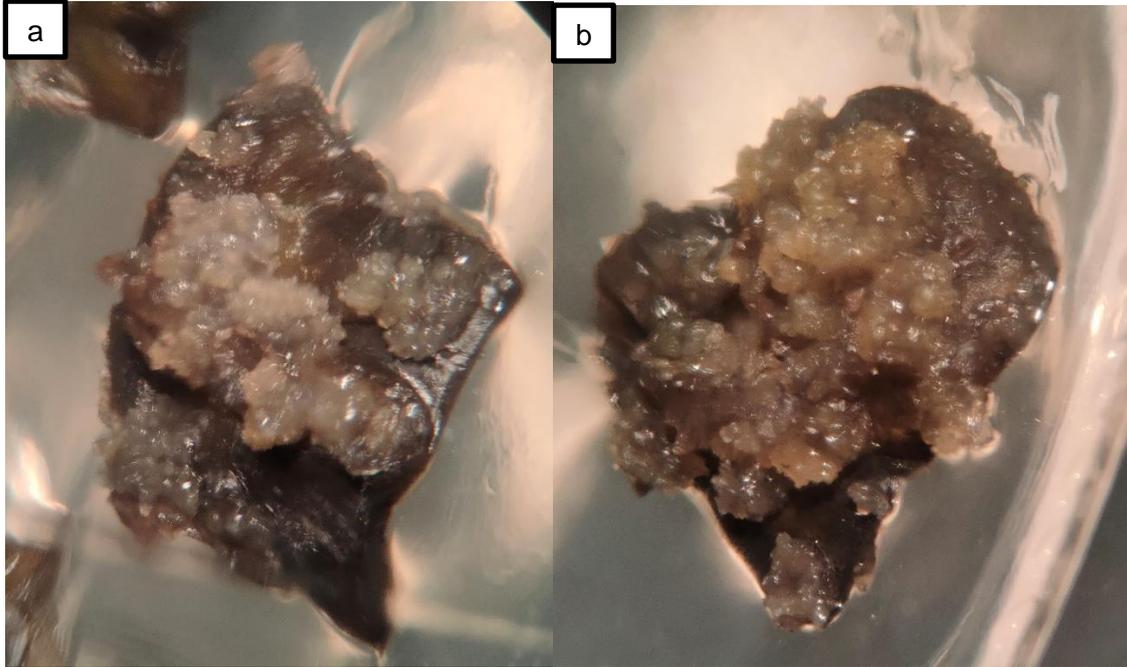
Explantes de Kalanchoe pinnata L inducidos en medio de cultivo MS y WPM en fotoperiodo después de cinco semanas.



Nota. a) Explante de hoja de *Kalanchoe pinnata* L. inducido en medio de cultivo MS, b) Explante de hoja de *Kalanchoe pinnata* L. inducido en medio de cultivo WPM.

Figura 7

Explantes de Kalanchoe pinnata L inducidos en medio de cultivo MS y WPM en oscuridad después de cinco semanas.



Nota. a) Explante de hoja de Kalanchoe pinnata L. inducido en medio de cultivo MS, b) Explante de hoja de Kalanchoe pinnata L. inducido en medio de cultivo WPM.

Análisis Exploratorio

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la inducción a células madre de cada explante; donde se evidencia que la inducción se da en dependencia del tratamiento aplicado. En cada caso, se varía el medio de cultivo, fotoperiodo y concentración del fitorregulador 2,4-D.

Tabla 6

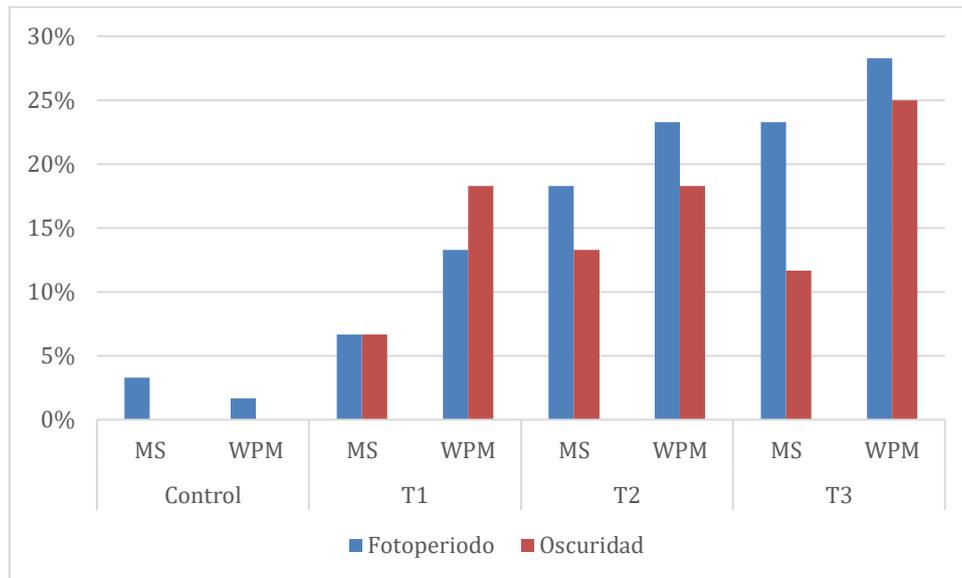
Porcentajes de explantes inducidos a células madre de cada tratamiento a los 21 días de cultivo.

| Tratamiento | Medio de cultivo | Fotoperiodo | Oscuridad |
|--------------------|-------------------------|--------------------|------------------|
| Control | MS | 3% | 0% |
| | WPM | 2% | 0% |
| T1 | MS | 7% | 7% |
| | WPM | 13% | 18% |
| T2 | MS | 18% | 13% |
| | WPM | 23% | 18% |
| T3 | MS | 23% | 12% |
| | WPM | 28% | 25% |

La inducción a células madre para cada tratamiento se observan en la Figura 8. En el tratamiento control, para los medios de cultivo completos de MS y WPM la inducción a células madre se dio, únicamente en fotoperiodo con un 3% y 2%, respectivamente. En el caso de T1 en el medio de cultivo completo de MS se obtuvo un porcentaje de 7% de inducción tanto en fotoperiodo como en oscuridad. Por otro lado, para el medio de cultivo completo de WPM los porcentajes de inducción a células madre en fotoperiodo y oscuridad fueron de 13% y 18%, respectivamente. En T2, en los medios de cultivo completos de MS y WPM, el mayor porcentaje de inducción se dio en fotoperiodo con un 18% y 24%, respectivamente. Finalmente, en T3 los porcentajes en los medios de cultivo completos de MS y WPM fueron de 23% y 28% para fotoperiodo, siendo más altos en comparación aquellos explantes expuestos a oscuridad y con los demás tratamientos.

Figura 8

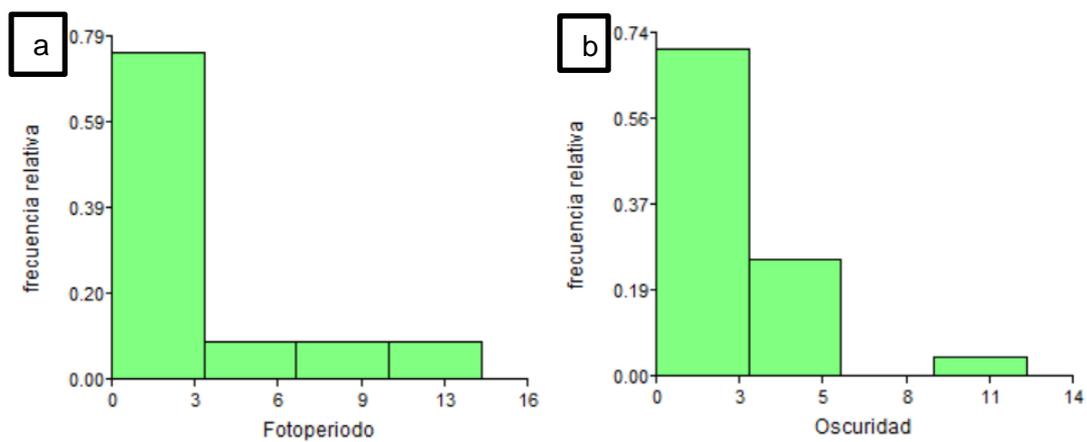
Representación porcentual de los explantes inducidos a células madre de cada tratamiento.



Análisis inferencial

Figura 9

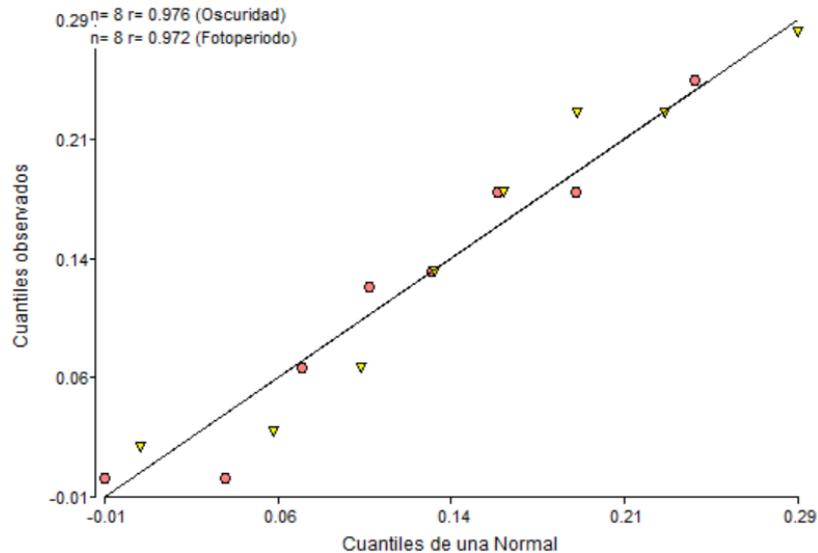
Histograma del porcentaje de explantes inducidos a células madre en cada tratamiento.



Nota. A) Histograma para explantes incubados en fotoperiodo, B) Histograma para explantes incubados en oscuridad.

Figura 10

Gráfico de dispersión del porcentaje de explantes inducidos a células madre en cada tratamiento.



Nota. Símbolos de color rojo correspondientes a oscuridad; símbolos color amarillo correspondientes a fotoperiodo.

Los resultados obtenidos de la inducción a células madre a las tres semanas presentaron una distribución no normal (Figura 9 y 10); por lo tanto, para su análisis se aplicó la prueba no paramétrica de independiente Chi Cuadrado (X^2) con un valor nominal de significancia (p) de 0,05.

Para identificar la relación del medio de cultivo con la inducción a células madre, se planteó como H_0 que el número de explantes con inducción a células madre es independientes del medio de cultivo utilizado y, como H_1 que el número de explantes donde con inducción a células madre es dependiente del medio de cultivo utilizado.

En el caso del fotoperiodo se obtuvo un valor de $p = 0,2855$ (Tabla 7), el cual al ser mayor del valor p establecido demuestra que el número de explantes donde se obtuvo inducción a células madre en fotoperiodo es independiente del medio de cultivo utilizado. Por otro lado, en oscuridad se obtuvo un valor de $p = 0,0161$ (Tabla 8) por lo cual, se afirma que el

número de explantes donde se obtuvo inducción a células madre en oscuridad es dependiente del medio de cultivo utilizado.

En el análisis del tratamiento y medio de cultivo utilizado para la inducción a células madre, se planteó como H_0 que el número de explantes con inducción a células madre es independiente del tratamiento y medio de cultivo utilizado y; como H_1 que el número de explantes con a células madre es dependiente del tratamiento y medio de cultivo utilizado. En el caso del fotoperiodo y oscuridad se obtuvieron valores $p = 0,0001$ (Tabla 9) y $p = 0,0138$ (Tabla 10), respectivamente; por lo tanto, en ambos casos se afirma que el número de explantes donde se obtuvo inducción a células madre es dependiente del tratamiento y medio de cultivo utilizado.

Tabla 7

Prueba de X^2 que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en fotoperiodo con la variable medio de cultivo.

| Estadístico | Valor | gl | P |
|------------------------|-------|----|--------|
| Chi Cuadrado Pearson | 1,14 | 1 | 0,2855 |
| Chi Cuadrado MV-G2 | 1,14 | 1 | 0,2848 |
| Coef. Conting. Gramer | 0,13 | | |
| Coef. Conting. Pearson | 0,13 | | |

Tabla 8

Prueba de X^2 que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en oscuridad con la variable medio de cultivo.

| Estadístico | Valor | gl | P |
|------------------------|-------|----|--------|
| Chi Cuadrado Pearson | 5,70 | 1 | 0,0162 |
| Chi Cuadrado MV-G2 | 5,89 | 1 | 0,0152 |
| Coef. Conting. Gramer | 0,32 | | |
| Coef. Conting. Pearson | 0,31 | | |

Tabla 9

Prueba de X² que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en fotoperiodo con la variable tratamiento y medio de cultivo.

| Estadístico | Valor | gl | P |
|------------------------|--------------|-----------|----------|
| Chi Cuadrado Pearson | 41,99 | 13 | 0,0001 |
| Chi Cuadrado MV-G2 | 37,98 | 13 | 0,0003 |
| Coef. Conting. Gramer | 0,77 | | |
| Coef. Conting. Pearson | 0,61 | | |

Tabla 10

Prueba de X² que determina la relación entre la variable presencia de célula madre en oscuridad con la variable tratamiento y medio de cultivo.

| Estadístico | Valor | gl | P |
|------------------------|--------------|-----------|----------|
| Chi Cuadrado Pearson | 28,11 | 14 | 0,0138 |
| Chi Cuadrado MV-G2 | 23,33 | 14 | 0,550 |
| Coef. Conting. Gramer | 0,71 | | |
| Coef. Conting. Pearson | 0,58 | | |

Capítulo V: Discusión

Optimización de los medios de cultivo

El crecimiento y desarrollo de explantes es influenciado de manera directa por la concentración de nutrientes, micronutrientes, sales, fuente de carbono y oxígeno; fotoperiodo; temperatura, genotipo, etapa de desarrollo y edad de la planta (Monfort *et al.*, 2018). Los resultados para la introducción a células madre a partir de hojas con edad de dos semanas, en diferentes concentraciones de medio de cultivo MS y WPM se describen en la Tabla 3.

La mejor concentración para la inducción a brotes es el tratamiento completo con sales minerales MS y WPM. La investigación realizada por B. García *et al.* (2010) demostró que para la especie *Kalanchoe blossfeldiana* L. El medio de cultivo MS con concentración completa de sales MS con 30 g/L de sacarosa comercial permite una viabilidad del 73,3%; siendo congruentes con la viabilidad del 87% de hojas de *Kalanchoe pinnata* L. obtenida en el presente estudio con una composición similar de medio de cultivo MS. Por otro lado, al no existir información referente a la viabilidad de explantes de hoja de *Kalanchoe pinnata* L, se procedió a comparar los resultados con lo descrito por ZeWei *et al.* (2018) donde se utilizó como especie *Liquidambar styraciflua*, perteneciente al mismo género de *Kalanchoe pinnata* L; en medio de cultivo WPM con concentración completa de sales minerales WPM con 30 g/L de sacarosa comercial. ZeWei *et al.*, (2018) obtuvo una viabilidad del 100%; cercano al 88% de viabilidad obtenido en las mismas condiciones del medio de cultivo WPM, en explantes de hoja de la especie *Kalanchoe pinnata* L.

Sin embargo, la investigación realizada por Doğan (2022), demuestra la eficiencia de utilizar la concentración de $\frac{1}{2}$ de sales minerales MS para la multiplicación de brotes posterior a su inducción. Por otro lado Abdallah & Belal (2012), confirman lo descrito por Doğan y agregan que la concentración de $\frac{1}{2}$ de sales minerales WPM resulta aún más eficaz para la multiplicación de brotes en la especie *Capparis spinosa* L.

La viabilidad de los explantes puede ser definida como la capacidad de totipotencia de sus células, la cual es afectada negativamente si los explantes presentan oxidación u oscurecimiento de sus tejidos que, puede llegar a provocar muerte celular (Azofeifa, 2009). Los explantes expuestos a concentraciones de $\frac{1}{2}$ de sales minerales MS y WPM respectivamente, presentaron oscurecimiento y oxidación (Figura 5). La oxidación de los explantes según Azofeifa (2009), es provocada por compuestos químicos abrasivos utilizados durante el proceso de desinfección, cortes del explante, composición y volumen del medio de cultivo, entre otros. La variable analizada dentro del ensayo fue la concentración del medio de cultivo en la inducción a células madre de los explantes; siendo la posible principal causa de la oxidación en hojas.

La oxidación u oscurecimiento de los explantes según Mengel *et al.* (2001), puede ser provocado por una deficiencia de fósforo, el cual es absorbido por las plantas en forma de fosfatos, ácido bórico y silicatos. En los medios de cultivo MS y WPM el fosfato se encuentra en forma de fosfato monopotásico (KH_2PO_4) con una concentración de 170 y 1700 mg/L, respectivamente. Para el caso del medio de cultivo MS, al reducirse la concentración a la mitad, la disponibilidad de potasio se redujo a 85 mg/L explicando el por qué los explantes se oxidaron u oscurecieron en su totalidad (Figura 5a) a diferencia de aquellos en medio de cultivo WPM con igual reducción de su concentración a la mitad (Figura 5b), pero con una concentración final de potasio de 850 mg/L.

Inducción a células madre

La inducción a células madre se encuentra esta en dependencia de los factores antes descritos para el crecimiento y desarrollo de explantes. Sin embargo, existen factores determinantes para la inducción a células madre como la composición del medio de cultivo y el fitorregulador con el que es suplementado el mismo (Monfort *et al.*, 2018).

Los fitorreguladores como la auxina 2,4-D y la citoquinina 6-Benzil-amino-purina (6-BAP), según un estudio realizado por Torres (2017), mostraron sinergismo para la inducción a células madre de *Kalanchoe pinnata* L. a concentraciones de 0,5 mg/L y 1mg/L

respectivamente, para obtener una inducción del 100% de células madre. Sin embargo, en el presente estudio con 1.5 mg/L se obtuvo únicamente un 28% de inducción a células madre en fotoperiodo.

Monfort *et al.* (2018) y Alcantara *et al.* (2019) explican que, la concentración balanceada de 2,4-D favorece la inducción a células madre al activar la división celular. Sin embargo, un correcto equilibrio entre auxinas y citoquininas garantiza la inducción de células madre; concluyendo que el uso de, únicamente, una axina limita la inducción a células madre por un desbalance hormonal.

Otro factor determinante es el fotoperiodo ya que, en dependencia de la especie vegetal, la incubación en total oscuridad puede resultar beneficiosa para la inducción a células madre al reducir la formación de brotes. Por otro lado, un fotoperiodo similar al que presentan las plantas cultivadas *ex vitro*, con 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz puede ser favorable para un correcto balance hormonal de auxinas y citoquininas, endógenas como exógenas del explante (Kamarul Zaman *et al.*, 2020).

Los resultados en los medios de cultivo MS y WPM suplementados con diferentes concentraciones de 2,4-D e incubados en oscuridad y fotoperiodo se describen en la Tabla 6. La morfología de las células madre expuestas a fotoperiodo posterior a cinco semanas fue de consistencia friable comprobado con lo descrito por Torres (2017). Sin embargo, existe diferencia en cuanto a la coloración, pues las células madre se observan con una coloración verdosa (Figura 3a). En una investigación realizada por Mricha *et al.* (1990), en *Kalanchoe blossfeldiana* explica que la coloración verdosa en las células madre expuestas a un fotoperiodo de 8 horas de oscuridad y 16 de lux a 8100 lux, influye en la actividad del fitocromo que regula el Metabolismo Ácido de Crasuláceas (CAM), alterando la actividad de la fosfopiruvato carboxilasa y ácido málico.

En el caso de los explantes incubados en oscuridad, el mayor porcentaje de explantes inducidos a células madre es de 25% en el medio de cultivo WPM utilizando 1,5 mg/L de 2,4-D. El bajo porcentaje de los explantes inducidos a células madre cultivados en MS en oscuridad con respecto a los cultivados en WPM, es explicado por las

investigaciones realizadas por Tetsumura *et al.* (2008) en *Vaccinium spp* y Kamarul Zaman *et al.* (2020) en *Polyalthia bullata*, donde demuestran que, debido a la concentración de nitrato de amonio (NH_4NO_3) de 1650 mg/L en el medio MS frente a 400 g/L presentes en el medio WPM, se inhibe el crecimiento del tejido vegetal al activar diferentes rutas metabólicas en oscuridad.

Capítulo VI: Conclusiones

Conclusiones

- La composición óptima de medio de cultivo para la introducción de la especie *Kalanchoe pinnata* L., es la concentración completa de sales minerales MS y WPM, en ambos casos suplementados con 30g/L de sacarosa. Pues, evita la oxidación u oscurecimiento de los explantes en un 87% y 88%, respectivamente.
- La fitohormona 2,4-D en concentración de 1,5 mg/L induce la formación de células madre de *Kalanchoe pinnata* L., a partir de hojas, en fotoperiodo tanto en los medios de cultivo MS como WPM con porcentajes de 23% y 28%, respectivamente.
- Los explantes de *Kalanchoe pinnata* L., inducidos a células madre en fotoperiodo presentaron callo de morfología friable con coloración verdosa, en comparación con los callos incubados en oscuridad que presentaron morfología friable y coloración blanquecina.

Capítulo VII: Recomendaciones

Recomendaciones

- Es recomendable utilizar sales minerales WPM para futuros ensayos de introducción de *Kalanchoe pinnata* L., considerando que, si bien su costo es similar al de las sales minerales MS, la cantidad utilizada es de 2,41 g/L frente a 4,423 g/L; permitiendo obtener el doble de rendimiento, aproximadamente.
- Posterior a las ocho semanas de la introducción de los explantes de *Kalanchoe pinnata* L. en un medio de cultivo para la inducción a células madre, se recomienda realizar la separación de los callos y el cambio a un medio de cultivo suplementado con el fitorregulador 2,4-D, para su conservación de las células madre de *Kalanchoe pinnata* L. dentro del banco de germoplasma de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Es recomendable realizar ensayos adicionales que permitan la identificación de los metabolitos secundarios de las células madre de *Kalanchoe pinnata* L., expresados en fotoperiodo y oscuridad; con el fin de estandarizar un protocolo de inducción a células madre en dependencia del metabolito que se requiera obtener.

Bibliografía

- Abdallah, M., & Belal. (2012). Micropropagation of caper (*Capparis spinosa*, L.) from wild plants growing in North Sinai. *Hortscience Journal of Suez Canal University*, 1(1), 15-20. <https://doi.org/10.21608/hjsc.2012.60245>
- Avilés, F., Ríos, D., González, R., & Sánchez-Olate, M. (2010). Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.). <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/45770>
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 153-175. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Bhatti, M., Kamboj, A., Saluja, A. K., & Jain, U. (2012). In vitro evaluation and comparison of antioxidant activities of various extracts of leaves and stems of *Kalanchoe pinnatum*. *International Journal of Green Pharmacy*, 6, 340-347. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.108255>
- Biorad. (2021). Introduction to Affinity Chromatography. Bio-Rad Laboratories. <https://www.bio-rad.com/es-ec/applications-technologies/introduction-affinity-chromatography?ID=MWHAVG4VY>
- Borjas, R., Julca, A., & Alvarado, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 150-164.
- Bottini, A. R. (2019). Fitohormonas. *Anales de la ANAV*, tomo LXX (2017). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/87472>
- Cañal, M. J., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez-Tames, R., & Majada, J. P. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Bioteología Vegetal*, 1(1), Art. 1. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/59>
- Cardozo, J., & Gómez, M. (2019). Contribución al estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. <https://www.revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/159>

- Castillo, A. (2017). Propagación de plantas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo.
- Doğan, M. (2022). Influence of Different Concentrations of Murashige and Skoog Medium on Multiple Shoot Regeneration of *Staurogyne repens* (Nees) Kuntze. *Journal of Engineering Technology and Applied Sciences*, 7(1), Art. 1.
<https://doi.org/10.30931/jetas.1055833>
- Ducoing, H. P., Jiménez, G. S., & Sosa, M. R. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Ferreira, R. T., Coutinho, M. A. S., Malvar, D. do C., Costa, E. A., Florentino, I. F., Costa, S. S., & Vanderlinde, F. A. (2014). Mechanisms Underlying the Antinociceptive, Antiedematogenic, and Anti-Inflammatory Activity of the Main Flavonoid from *Kalanchoe pinnata*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, e429256. <https://doi.org/10.1155/2014/429256>
- García, B., Pineda, B., Castelblanque, L., Antón, T., Medina, M., Roque, E., Torresi, C., Beltrán, J. P., Moreno, V., & Cañas, L. A. (2010). Efficient transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* and production of male-sterile plants by engineered anther ablation. *Plant Cell Reports*, 29(1), 61-77. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0798-8>
- García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27(1), Art. 1.
[https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path\[\]=795](https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=article&op=view&path[]=795)
- Gómez, O. T. (2008). Una aplicación de la prueba chi cuadrado con SPSS. *Industrial Data*, 11(1), 73-77.
- González de León, S., Herrera, I., & Guevara, R. (2016). Mating system, population growth, and management scenario for *Kalanchoe pinnata* in an invaded seasonally dry tropical forest. *Ecology and Evolution*, 6(13), 4541-4550.
<https://doi.org/10.1002/ece3.2219>

- Gutiérrez, P. A. G., López, J., & Gómez, C. (2019). Notas sobre las especies de *Kalanchoe* (Crassulaceae) ocasionales y naturalizadas en Cuba. *Collectanea Botanica*, 38, e011-e011. <https://doi.org/10.3989/collectbot.2019.v38.011>
- Ivanov, V. B. (2003). The Problem of Stem Cells in Plants. *Russian Journal of Developmental Biology*, 34(4), 205-212. <https://doi.org/10.1023/A:1024988214581>
- Jackson, S. D. (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytologist*, 181(3), 517-531. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02681.x>
- Kamarul Zaman, M. A., Azzeme, A. M., Ramle, I. K., Normanshah, N., Ramli, S. N., Shaharuddin, N. A., Ahmad, S., & Abdullah, S. N. A. (2020). Induction, Multiplication, and Evaluation of Antioxidant Activity of *Polyalthia bullata* Callus, a Woody Medicinal Plant. *Plants*, 9(12), Art. 12. <https://doi.org/10.3390/plants9121772>
- Kolavi, S. (2014, mayo 30). Micropropagation and Mutation Studies in Pomegranate (*Punica granatum* L.). [https://www.semanticscholar.org/paper/MICROPROPAGATION-AND-MUTATION-STUDIES-IN-\(Punica-Kolavi/6d237bbf35c025ad2c027172199214cd7c07c8ee](https://www.semanticscholar.org/paper/MICROPROPAGATION-AND-MUTATION-STUDIES-IN-(Punica-Kolavi/6d237bbf35c025ad2c027172199214cd7c07c8ee)
- Kun, M. (2019). Serie de divulgación sobre insectos de importancia ecológica, económica y sanitaria.
- Lebigre, J.-M. (1998). Boiteau P. et Allorge-Boiteau L., 1995 -*Kalanchoé* de Madagascar. *Systématique, écophysiologie et phytochimie. Les Cahiers d'Outre-Mer*, 51(202), 223-224.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010). *Biotechnología y mejoramiento vegetal II: Vol. II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.*
- Lima, F. F. do N. (2022). Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hexânico e etanólico da folha de coirama *Kalanchoe pinnata* (lam.) pers. <https://rii.ufam.edu.br//handle/prefix/6378>
- McCown, B. H., & Sellmer, J. C. (1987). General media and vessels suitable for woody plant culture. *Forestry Sciences (Netherlands)*. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=General+media+and+vessels+suitab

le+for+woody+plant+culture&author=McCown%2C+B.H.+%28Wisconsin+Univ.%2C+Madison%2C+WI+%28USA%29.+Dept.+of+Horticulture%29&publication_year=1987

- Mengel, K., Kirkby, E., Kosegarten, H., & Thomas, A. (2001). Principles of Plant Nutrition (pp. 541-552). https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2_12
- Monfort, L. E. F., Bertolucci, S. K. V., Lima, A. F., de Carvalho, A. A., Mohammed, A., Blank, A. F., & Pinto, J. E. B. P. (2018). Effects of plant growth regulators, different culture media and strength MS on production of volatile fraction composition in shoot cultures of *Ocimum basilicum*. *Industrial Crops and Products*, 116, 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.075>
- Mricha, A., Brulfert, J., Pierre, J. N., & Queiroz, O. (1990). Phytochrome-mediated responses of cells and protoplasts of green calli obtained from the leaves of a CAM plant. *Plant Cell Reports*, 8(11), 664-666. <https://doi.org/10.1007/BF00269988>
- Muñoz Martínez, A. S., Monar, M., Ugsha Jimenez, Y. E., Cabrera Valarezo, J. V., Puma Vaque, L. H., & Ríos, M. (2020). Etnofarmacología de *Kalanchoe pinnata* en Amazonía: Uso medicinal de " chugri yuyu ". http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/366
- Ortiz, D. G., Lumbreras, E. L., & Picornell, J. A. R. (2009). La familia Crassulaceae en la flora alóctona valenciana. José Luis Benito Alonso.
- Paniagua, N. Y., Bussmann, R. W., & Romero, C. (2020). *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Crassulaceae. En N. Y. Paniagua (Ed.), *Ethnobotany of the Andes* (pp. 1-4). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2_157-1
- Peterson, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., & Stahlman, P. W. (2016). 2,4-D Past, Present, and Future: A Review. *Weed Technology*, 30(2), 303-345. <https://doi.org/10.1614/WT-D-15-00131.1>
- Pierre, E., Drapek, C., & Benfey, P. N. (2018). Regulation of Division and Differentiation of Plant Stem Cells. *Annual review of cell and developmental biology*, 34, 289-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062459>

- Rajsekhar, P. B., Bharani, R. S. A., Ramachandran, M., Angel, K. J., & Rajsekhar, S. P. V. (2016). The "Wonder Plant" *Kalanchoe pinnata* (Linn.) Pers.: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6,(3), 151-158.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60326>
- Rehman, R., Al-Sabahi, J., Ghaffar, A., Nadeem, F., & Umar, A. (2019). Phytochemical, Morphological, Botanical and Pharmacological Aspects of a Medicinal Plant: *Kalanchoe pinnata* -A Review Article.
- Reinoso, J. (2003). El efecto de las Fitohormonas en la fruticultura. *La Granja*, 2(1), Art. 1.
- Rodríguez, M. M., Latsague, M. I., Chacón, M. A., & Astorga, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111-118.
<https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Sánchez, A. (2020). Prueba Chicuadrado. Departamento de Educación Virtual.
<https://repositorio.konradlorenz.edu.co/handle/001/2475>
- Santos, M. R. A., Ferreira, M. G. R., Guimarães, M. C. M., Lima, R. A., & Oliveira, C. L. L. G. (2014). Callogenesis in leaves of *Kalanchoe pinnata* Lam. By 2,4-D and BA action. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16, 760-764. https://doi.org/10.1590/1983-084x/13_031
- Silva, E. F. da, Freitas, E. P. de, Silva, E. P. da, Silva, J. M. M. da, & Paula, N. A. de. (2022). Desenvolvimento de um creme anti-inflamatório e cicatrizante à base de *Kalanchoe pinnata*, aloe vera e dysphania ambrosioides.
<http://ric.cps.sp.gov.br/handle/123456789/9982>
- Smith, G., & Crouch, N. (2021). *Crassula xmortii* (Crassulaceae subfam. Crassuloideae), a new natural hybrid between *C. perforata* and *C. rubricaulis* from South Africa's southern Cape. *Phytotaxa*, 487, 97-102. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.487.1.9>
- Stahl, Y., & Simon, R. (2004). Plant stem cell niches. *International Journal of Developmental Biology*, 49(5-6), Art. 5-6. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041929ys>

- Suárez, I. E. (2020). Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., & Kunitake, H. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 72-74. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>
- Torres, J. A. (2017). Obtención de callo in vitro a partir de explantes de hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*) y su posterior determinación del contenido de fenoles y capacidad antioxidante. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/13375>
- Witte, C.-P., Tiller, S. A., Taylor, M. A., & Davies, H. V. (2002). Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 103-104. <https://doi.org/10.1023/A:1012966218478>
- ZeWei, W., Yan, Z., ShuaiZheng, Q., JunJie, Z., Wei, Y., YaDong, Z., XueZeng, L., & JinFeng, Z. (2018). Tissue culture regeneration of hybrid Liquidambar styraciflua × L. formosana. *Journal of Beijing Forestry University*, 40(8), 42-49.