

Determinación del perfil metabolómico de tres especies de *Kalanchoe* en edad temprana

Determination of the metabolomic profile of three Kalanchoe species at an early developmental stage

Scarlett Torres¹; Zulay Niño¹ y Gabriela Salazar¹

¹ Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador

Autor de correspondencia: scarlett.torres@est.ikiam.edu.ec

Resumen

La metabolómica permite analizar todos los metabolitos de un organismo, siendo más diversa en plantas por su producción de compuestos en respuesta al estrés, lo que genera actividad biológica relevante. En Ecuador, el género *Kalanchoe*, especialmente *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe daigremontiana* y *Kalanchoe gastonis-bonnieri*, se utiliza en medicina tradicional y contiene fenoles, flavonoides, terpenos y oligoelementos. Este estudio se centró en hojas jóvenes (~2 meses) para identificar metabolitos mediante extracción con metanol al 80% y ultrasonido, seguido de análisis cualitativo y HPLC-MS/MS. Los datos procesados con MZmine permitieron identificar compuestos de nivel 2 y 3, mostrando coincidencias con plantas adultas, pero también variaciones que evidencian que la edad influye en la construcción del perfil metabolómico.

Abstract

Metabolomics enables the analysis of all metabolites present in an organism and is particularly diverse in plants due to their production of compounds in response to stress, resulting in relevant biological activity. In Ecuador, the genus *Kalanchoe*, especially *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe daigremontiana*, and *Kalanchoe gastonis-bonnieri*, is widely used in traditional medicine and contains phenols, flavonoids, terpenes, and trace elements. This study focused on young leaves (~2 months old) to identify metabolites through extraction with 80% methanol and ultrasound-assisted extraction, followed by qualitative analysis and HPLC-MS/MS. Data processed using MZmine enabled the identification of level 2 and 3 compounds, revealing similarities with adult plants but also variations demonstrating that plant age influences the development of the metabolomic profile.

Optimización de biofábricas vegetales de *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* para la producción de antocianinas con potencial antioxidante y antiinflamatorio mediante estrategias de cultivo y transformación genética

Optimization of plant biofactories of Brassica oleracea var. capitata f. rubra to produce anthocyanins with antioxidant and anti-inflammatory potential through cultivation and genetic transformation strategies

Christian Israel Andrade Romero¹, Liliana Paulina Lalaleo Córdova², Patricia Yissel Dávalos Cerrón³, Andrea Carolina Palacios Rosado⁴, Mateo Patricio Sánchez Sanaguano⁵

1 Universidad Técnica de Ambato. <https://orcid.org/0009-0005-2291-1977>

2 Universidad Técnica de Ambato. <https://orcid.org/0000-0001-8524-0983>

3 Universidad Técnica de Ambato. <https://orcid.org/0009-0004-7294-2678>

4 Universidad Técnica de Ambato. <https://orcid.org/0009-0001-8912-3781>

5 Universidad Técnica de Ambato. <https://orcid.org/0009-0000-1294-113X>

Autor de correspondencia: candrade4813@uta.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.63804/CIBEN.25.bbfs.e1>

Resumen

La creciente demanda de compuestos bioactivos naturales para la salud y la nutrición funcional ha impulsado el desarrollo de sistemas sostenibles de producción vegetal. Este estudio tuvo como objetivo optimizar la germinación, el cultivo in vitro y la transformación genética de *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* para aumentar la acumulación de antocianinas, pigmentos fenólicos con notables propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente, estratificadas en frío y tratadas con ácido giberélico para mejorar la germinación, y luego cultivadas en medio Murashige y Skoog, tanto completo como sin nitrato, suplementado con los elicitores bióticos jasmonato de metilo y ácido salicílico. La transformación genética mediante *Agrobacterium rhizogenes* generó raíces pilosas que expresaron el factor de transcripción AtMYB12 y el gen reportero β -glucuronidasa (GUS). La privación de nitrato incrementó significativamente el contenido de antocianinas y la actividad antioxidante y antiinflamatoria en las plántulas, mientras que la expresión

de AtMYB12 en raíces transformadas produjo un aumento adicional en la concentración de pigmentos y bioactividad. Estos resultados demuestran que la combinación de estrés nutricional con ingeniería genética es una estrategia eficaz para potenciar la producción de antocianinas bioactivas en repollo morado, proporcionando una plataforma sostenible para aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, y contribuyendo a la conservación de valiosos recursos genéticos vegetales.

Palabras clave: Antocianinas; Brassica; Elicitores; Transformación Genética; Raíces Pilosas; Biofábrica Vegetal

Abstract

The growing demand for natural bioactive compounds for health and functional nutrition has driven the development of sustainable plant-based production systems. This study aimed to optimize the germination, in vitro culture, and genetic transformation of *Brassica oleracea* var. *Capitata* f. *rubra* to increase the accumulation of anthocyanins, phenolic pigments with notable antioxidant and anti-inflammatory properties. Seeds were surface disinfected, cold stratified, and treated with gibberellic acid to enhance germination, and then cultured on Murashige and Skoog medium, both complete and nitrate-free, supplemented with the biotic elicitors methyl jasmonate and salicylic acid. Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes* generated hairy roots expressing the transcription factor AtMYB12 and the reporter gene β -glucuronidase (GUS). Nitrate deprivation significantly increased anthocyanin content and antioxidant and anti-inflammatory activities in seedlings, whereas AtMYB12 expression in transformed roots produced an additional increase in pigment concentration and bioactivity. These findings demonstrate that combining nutrient stress with genetic engineering is an effective strategy to enhance bioactive anthocyanin production in purple cabbage, providing a sustainable platform for applications in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries and contributing to the conservation of valuable plant genetic resources.

Keywords: Anthocyanins; Brassica; Elicitors; Genetic Transformation; Hairy Roots; Plant Biofactory

Introducción

Las antocianinas son pigmentos fenólicos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y citoprotectoras. El repollo morado (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) es una fuente importante de derivados de cianidina acilada estables, con aplicaciones en alimentos, nutracéuticos y cosméticos. Sin embargo, su uso a gran escala está limitado por la variabilidad de campo y los costos de extracción. Se han probado hospedadores microbianos, como *E. coli* y *S. cerevisiae*,

pero requieren ingeniería compleja y altos insumos energéticos, lo que limita su viabilidad.

La biotecnología vegetal ofrece una solución sostenible. El cultivo in vitro bajo condiciones controladas permite estimular metabolitos con elicitores como el jasmonato de metilo (MeJA) y el ácido salicílico (SA), mientras que factores de transcripción como AtMYB12 activan la vía de los fenilpropanoides para mejorar la biosíntesis de pigmentos.

Este estudio evaluó si la privación de nitrato combinada con MeJA o SA aumenta los niveles de antocianinas en plántulas de repollo morado y si la expresión de AtMYB12 en raíces pilosas de *Agrobacterium rhizogenes* potencia aún más el contenido de pigmentos y la bioactividad, apoyando la producción escalable de antocianinas de alto valor.

Metodología

Material vegetal y desinfección de semillas

Las semillas fueron desinfectadas siguiendo el protocolo de Hasan et al. (2021) con algunas modificaciones de tiempo: (i) inmersión en etanol al 70 % durante 15 min, (ii) tres enjuagues de 2 min en agua estéril, (iii) tratamiento con hipoclorito de sodio al 25 % con 0,2 mL de Tween 20 durante 10 min, y (iv) tres enjuagues con agua estéril. Todos los pasos se realizaron bajo agitación constante. Posteriormente, las semillas se sometieron a seis tratamientos de pregerminación combinando temperaturas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y $500\text{ }\mu\text{M}$ de ácido giberélico (GA_3) para romper la latencia. Se registraron el porcentaje de germinación y la tasa de contaminación durante 20 días.

Cultivo in vitro y micropropagación

Las semillas se sembraron en medio sólido Murashige y Skoog (MS) o sin nitrato (MS S/N). Los cultivos se mantuvieron a $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa. Las plántulas germinadas se subcultivaron para obtener plantas uniformes.

Transformación genética

Los explantos foliares se infectaron con tres tratamientos de *A. rhizogenes* (WT-A4, A4 pJCV52-AtMYB12 y A4 pJCV52-GUS). La infección se realizó con una jeringa estéril a lo largo del nervio central abaxial y los explantos se incubaron durante 48 h en oscuridad a $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se transfirieron a medio MS o MS S/N con 500 mg L^{-1} de cefotaxima. Las raíces pilosas surgieron aproximadamente a los 15 días y se subcultivaron en medio sin antibióticos.

Confirmación molecular

Se extrajo ADN genómico mediante el método CTAB modificado (Moreau et al., 2012). Se utilizaron cebadores de Hidalgo et al. (2017) y la polimerasa DreamTaq Green para amplificación por PCR. Los amplicones se visualizaron en geles de agarosa al 1 %.

Extracción y cuantificación de antocianinas

Se maceraron plántulas (60 días) y raíces pilosas confirmadas (30 días) (1:2 p/v) en etanol al 96 % acidificado con HCl 1 M (85:15) a 70 °C y 800 rpm durante 120 min. Los sobrenadantes se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y se almacenaron a 4 °C en frascos ámbar. El contenido total de antocianinas (TAC) se determinó mediante el método diferencial de pH (Tan et al., 2021) y se expresó como mg equivalentes de cianidina-3-glucósido por 100 g de peso fresco.

Ensayos de bioactividad

La capacidad antioxidante se midió mediante el ensayo de captura del radical DPPH a 517 nm (Pusty et al., 2024). La actividad antiinflamatoria se evaluó midiendo la inhibición de la desnaturalización de albúmina a 660 nm (Yesmin et al., 2020).

Diseño experimental y análisis estadístico

Se aplicó un diseño factorial A × B: para plántulas (medio: MS o MS S/N; elicitor: control, MeJA, SA); para raíces pilosas (medio: MS o MS S/N; transformación: WT-A4, AtMYB12, GUS). Las variables dependientes fueron TAC, DPPH (%) e inhibición (%). Los datos se analizaron mediante ANOVA multifactorial y prueba de Tukey ($p < 0,05$) usando SPSS v.27.

Resultados y Discusión

Tratamiento de semillas y establecimiento in vitro

La estratificación en frío con GA₃ permitió alta germinación (≈ 84 %) y baja contaminación (≈ 16 %) en ambos medios, confirmando que GA₃ rompió la latencia y promovió el crecimiento embrionario (Miceli et al., 2019). Los tratamientos sin GA₃ o con temperaturas >20 °C mostraron menor germinación, coincidiendo con Tuan et al. (2018).

Optimización del crecimiento bajo estrés nutricional

Las plántulas en MS alcanzaron ≈ 13 cm, mientras que las de MS S/N ≈ 9 cm, confirmando el papel del nitrógeno en la elongación celular y la biosíntesis de pigmentos (Pasternak & Steinmacher, 2024). MeJA y SA redujeron aún más el crecimiento ($< 2,5$ cm), consistente con reportes de senescencia inducida por jasmonatos (Kamińska, 2021). A pesar de su menor tamaño, la deficiencia de nitrógeno y el estrés por MeJA activan la acumulación de antocianinas mediante PAL, CHS y F3H (Zhang et al., 2021), mostrando un compromiso entre biomasa y metabolismo secundario.

Inducción de raíces pilosas y transformación genética

A. rhizogenes generó raíces pilosas estables en ambos medios, con mayor ramificación en MS. La PCR confirmó la integración de rolC y la presencia del transgén AtMYB12, mientras que la ausencia de virD confirmó la eliminación bacteriana. Los explantos tratados con MeJA o SA no formaron raíces pilosas, probablemente por apoptosis inducida por estrés (Zlotorynski, 2020).

Perfil de antocianidinas y antocianinas totales

La cianidina predominó en todas las muestras (> 50 %), consistente con Stoica et al. (2023). La deficiencia de nitrógeno elevó TAC a 44,8 mg Cya-3-glu / 100 g frente a 30,1 mg en MS. Las raíces pilosas con AtMYB12 alcanzaron los niveles más altos ($\sim 27,8$ mg g⁻¹), apoyando la activación génica mediada por MYB en etapas tempranas y tardías (Song et al., 2018). MeJA aumentó moderadamente los pigmentos, mientras que SA tuvo efecto mínimo.

Actividades antioxidante y antiinflamatoria

Las plántulas con deficiencia de nitrógeno mostraron mayor capacidad antioxidante (65 % DPPH) que los controles en MS (45 %), confirmando que las antocianinas inducidas por estrés mejoran la captura de radicales (Nawaz et al., 2018). Los extractos de raíces pilosas con AtMYB12 presentaron las actividades antioxidante (≈ 72 %) y antiinflamatoria (≈ 79 %) más altas, comparables al fármaco de referencia diclofenaco. MeJA y SA redujeron ambas actividades, probablemente por redirigir el metabolismo hacia otros compuestos defensivos (Chaves et al., 2018).

Conclusiones

Este estudio demostró que la privación de nitrato y la elicitación con fitohormonas incrementan la acumulación de antocianinas en repollo morado, mientras que la expresión de AtMYB12 mediante *A. rhizogenes* potencia aún más el contenido de pigmentos y la bioactividad. Las raíces

pilosas con AtMYB12 mostraron las mayores actividades antioxidante y antiinflamatoria, confirmando el valor de la transformación genética dirigida para enriquecer metabolitos secundarios. Estos hallazgos destacan a las biofábricas vegetales *in vitro*, incluyendo plántulas y raíces transformadas genéticamente, como plataformas sostenibles para la producción industrial de antocianinas. Investigaciones futuras deberían optimizar estrategias de cultivo a gran escala y explorar factores de transcripción adicionales o estreses combinados para maximizar el rendimiento y las propiedades funcionales de los compuestos bioactivos.

Referencias bibliográficas

Chaves, S., Santos, A. L. dos, Chalfun, A., Zhao, J., Peres, L. E. P., & Benedito, V. (2018). Understanding the genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in plants – Tools for breeding purple varieties of fruits and vegetables. *Phytochemistry*, 153, 11–27. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.013>

Hasan, A. M., ElKaaby, E. A. J., & AL-J, R. M. Kh. (2021). In Vitro Effects of Different Combinations of Phytohormones on Callus Induction from Different Explants of Cabbage Brassica Oleracea Var. Capitata L. Seedlings. *Iraqi Journal of Science*, 3476–3486. <https://doi.org/10.24996/ijis.2021.62.10.7>

Hidalgo, D., Georgiev, M., Marchev, A., Bru-Martínez, R., Cusido, R. M., Corchete, P., & Palazon, J. (2017). Tailoring tobacco hairy root metabolism for the production of stilbenes. *Scientific Reports*, 7(1), 17976. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18330-w>

Kamińska, M. (2021). Role and activity of jasmonates in plants under *in vitro* conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(3), 425–447. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02091-6>

Miceli, A., Moncada, A., Sabatino, L., & Vetrano, F. (2019). Effect of Gibberellic Acid on Growth, Yield, and Quality of Leaf Lettuce and Rocket Grown in a Floating System. *Agronomy*, 9(7), 382. <https://doi.org/10.3390/agronomy9070382>

Moreau, H., Verhelst, B., Couloux, A., Derelle, E., Rombauts, S., Grimsley, N., Van Bel, M., Poulain, J., Katinka, M., Hohmann-Marriott, M. F., Piganeau, G., Rouzé, P., Da Silva, C., Wincker, P., Van de Peer, Y., & Vandepoele, K. (2012). Gene functionalities and genome structure in *Bathycoccus prasinos* reflect cellular specializations at the base of the green lineage. *Genome Biology*, 13(8), R74. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r74>

Nawaz, H., Shad, M. A., & Muzaffar, S. (2018). Phytochemical Composition and Antioxidant

Potential of Brassica. In Brassica Germplasm - Characterization, Breeding and Utilization. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76120>

Pasternak, T. P., & Steinmacher, D. (2024). Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. *Plants*, 13(2), 327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>

Pusty, K., Kumar, K., Giri, S., Raj, G., Tiwari, A., Shaikh, A., & Béla, K. (2024). Ultrasound assisted phytochemical extraction of red cabbage by using deep eutectic solvent: Modelling using ANFIS and optimization by genetic algorithms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 102, 106762. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106762>

Song, H., Yi, H., Lee, M., Han, C.-T., Lee, J., Kim, H., Park, J.-I., Nou, I.-S., Kim, S.-J., & Hur, Y. (2018). Purple Brassica oleracea var. capitata *F. rubra* is due to the loss of BoMYBL2-1 expression. *BMC Plant Biology*, 18(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1290-9>

Stoica, R., Ganciarov, M., Constantinescu, D., Capră, L., Suică, I., Senin, R., Pricope, G., Ivan, G., Călin, C., & Oancea, F. (2023). Sustainable Recovery of Anthocyanins and Other Polyphenols from Red Cabbage Byproducts. *Foods*, 12(22), 4157. <https://doi.org/10.3390/foods12224157>

Tan, C., Dadmohammadi, Y., Lee, M. C., & Abbaspourrad, A. (2021). Combination of copigmentation and encapsulation strategies for the synergistic stabilization of anthocyanins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3164–3191. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12772>

Tuan, P. A., Kumar, R., Rehal, P. K., Toora, P. K., & Ayele, B. T. (2018). Molecular Mechanisms Underlying Abscisic Acid/Gibberellin Balance in the Control of Seed Dormancy and Germination in Cereals. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00668>

Yesmin, S., Paul, A., Naz, T., Rahman, A. B. M. A., Akhter, S. F., Wahed, M. I. I., Emran, T. Bin, & Siddiqui, S. A. (2020). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*, 6(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00207-7>

Zhang, N., Jiao, S., & Jing, P. (2021). Red Cabbage Rather Than Green Cabbage Increases Stress Resistance and Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, 10(6), 930. <https://doi.org/10.3390/antiox10060930>

Zlotorynski, E. (2020). The secret of increased (root) hair density. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(11), 657–657. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00302-0>