

Efecto del metil jasmonato en la producción de los alcaloides galantamina y licorina en plantas de *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora* cultivadas en un sistema de inmersión temporal.

Luigy Alejandro Miranda Velasco

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO
Y CIENCIAS APLICADAS

Biología

Santiago de Cali

2024

Efecto del Metil Jasmonato en la producción de los alcaloides galantamina y licorina en plantas de *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora* cultivadas en un sistema de inmersión temporal.

Luigy Alejandro Miranda Velasco

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIOLOGÍA

Asesoras:

Paola Andrea Caicedo Burbano, PhD

María Eugenia Buitrago González, MSc

Santiago de Cali

2024

AVAL PARA LA ENTREGA DE PDG II

Firma del Asesor:




Maria Eugenia Buitrago González

Firma del Asesor:



Paola Andrea Caicedo Burbano

Firma del estudiante:



Luigy Alejandro Miranda Velasco

Resumen

Las plantas de la familia Amaryllidaceae producen metabolitos secundarios de interés farmacéutico, conocidos como alcaloides. Entre los alcaloides destacan la galantamina por su potencial uso como tratamiento frente a la enfermedad del Alzheimer, y la licorina por sus propiedades antitumorales y antivirales. En Colombia, las plantas de *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora* (ambas pertenecientes a la familia de las Amarilidáceas) son usadas principalmente como plantas ornamentales. Sin embargo, existe un creciente interés en identificar la presencia de alcaloides en dichas plantas, al mismo tiempo que se investiga el uso de compuesto que estimulen la producción de alcaloides en las plantas, debido a que la producción natural de las plantas se da en bajas concentraciones.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del metil jasmonato en la producción de galantamina y licorina en plantas de *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora*, cultivadas en un sistema de inmersión temporal (SIT). Para ello, se aplicó una concentración de 50 μM del elicitor metil jasmonato en dos periodos de cultivo (7 y 15 días). El crecimiento vegetal se evaluó en términos de longitud de hojas, raíces y acumulación de biomasa. La producción de alcaloides, licorina y galantamina, se determinó mediante espectrofotometría UV. Los resultados obtenidos mostraron que el metil jasmonato incrementa significativamente la producción de los alcaloides estudiados, obteniéndose mejores resultados a los 15 días de elicitación en las plantas de *Eucharis grandiflora*. Sin embargo, se encontró que *Zephyranthes carinata* tiene una mejor respuesta en cuanto a medidas físicas en el cultivo en SIT.

Palabras clave: licorina, galantamina, metil jasmonato, cultivos *in vitro*, amarilidáceas.

Introducción

Amaryllidaceae es una familia de angiospermas monocotiledóneas compuesta por plantas herbáceas, en su mayoría perennes y bulbosas. La familia está conformada por alrededor de 1600 especies en 75 géneros¹. Estas plantas se encuentran distribuidas en diferentes regiones del mundo, pero son predominantes en tres ubicaciones geográficas distintas: la zona andina de América del Sur, el sur de África y la cuenca mediterránea².

Estas plantas suelen ser importantes para las comunidades cercanas a los lugares donde se encuentran, ya que algunas de ellas son apreciadas por su cultivo ornamental o se utilizan en la medicina tradicional^{2,3}. En este sentido, se puede mencionar que las representantes de esta familia de plantas producen compuestos llamados alcaloides de amarilidácea (AA), los cuales exhiben diversas actividades biológicas, incluyendo propiedades antitumorales⁴⁻⁷, antivirales⁵, antibacterianas⁸, antifúngicas⁹, antipalúdicas^{5,10}, analgésicas⁵, citotóxicas y larvicidas en mosquitos¹¹.

Los AA son metabolitos secundarios que cumplen funciones de defensa frente a agentes externos¹². En este contexto, los alcaloides se producen en estados específicos de desarrollo y en períodos de estrés, diferenciándose del metabolismo primario al no cumplir una función esencial en la planta¹³. Sin embargo, estos compuestos han demostrado ser útiles para tratar afecciones humanas. Hasta el momento, se han identificado cerca de 500 AA, y muchos de ellos pueden ser de interés debido a sus aplicaciones en el desarrollo de fármacos o en la investigación básica. Entre estos AA, destacan la galantamina y la licorina. La primera se utiliza como principio activo en los medicamentos Razadyne® y Nivalin®, que son dos de los principales tratamientos paliativos contra Alzheimer¹⁴. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la degradación de la acetilcolina al bloquear la enzima acetilcolinesterasa¹⁵⁻¹⁷. Por otro lado, la licorina ha demostrado tener efectos antitumorales, antibacterianos y actividad citotóxica¹⁸, por lo que se emplea en múltiples estudios para desarrollar fármacos con este compuesto¹⁴.

En Colombia se tiene registro de diferentes géneros de Amaryllidaceae¹⁹. Entre ellos se encuentra *Zephyranthes* y *Eucharis*. Dentro del primer género se encuentra la especie

Zephyranthes carinata, varios estudios han reportado que los AA de *Z. carinata* (concretamente los de tipo galantamina) tienen una fuerte inhibición de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), un mecanismo clave en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer que limita el catabolismo de dicha enzima y favorece las conexiones sinápticas²⁰⁻²³. Los AA aislados de *Z. carinata* tienen un potencial terapéutico para el tratamiento no solo paliativo sino también modulador de la enfermedad de alzhéimer, pues pueden llegar a tener mayor efectividad y un mejor perfil de seguridad y tolerabilidad^{20,22}.

Por su parte el género *Eucharis* cuenta con ocho especies presentes en Colombia¹⁹, entre ellas *Eucharis grandiflora*. Estudios han informado que *Eucharis grandiflora* produce una gran variedad de alcaloides, entre los que se pueden encontrar licorina, ismina, trisferidina, tazetina, 3- epimacronina, galantamina, 3-O-Demetiltazetina, sanguinina, hamaina, 8-O-demetilmaritidina y 2-O-Acetillicorina³. Al igual que se mencionó con respecto a los alcaloides de galantamina y licorina y sus efectos biológicos, la 8-O-desmetilmaritidina, ha demostrado tener potencial en el tratamiento de cánceres resistentes a medicamentos²⁴. Además, estudios han demostrado que la sanguinina es un fuerte inhibidor de la colinesterasa, e incluso algunos informes muestran un nivel de inhibición mayor al reportado para la galantamina²⁵. Este tipo de alcaloides se ha reportado principalmente en *Eucharis grandiflora*.

A pesar de que se conoce los potenciales beneficios de estos alcaloides, no han sido utilizados de manera extensiva en la industria farmacéutica. Esto se debe a que se presentan algunos desafíos en la obtención de los alcaloides de las plantas. El principal inconveniente reside en la baja producción natural de estas sustancias por parte de las plantas²⁶, además, diversos factores, como las condiciones ambientales, el estado fisiológico y la genética de las plantas²⁷, así como la aplicación de agentes externos como fertilizantes y fungicidas²⁸, pueden restringir la obtención de estos metabolitos. Estas limitaciones impactan directamente en el tiempo requerido para que las plantas se desarrollen y alcancen la fase de producción que sea rentable²⁹.

A pesar de ello, el interés en comprender su actividad biológica ha generado la necesidad de obtener cantidades significativas de alcaloides. Lo que ha impulsado recientemente el interés en la producción de moléculas biológicamente activas a través del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales³⁰⁻³². Este método abarca un conjunto de técnicas que posibilitan el crecimiento y mantenimiento de células, órganos y tejidos vegetales bajo condiciones ambientales controladas en un medio de composición conocida, con el objetivo de manipular su crecimiento, multiplicación y diferenciación³³. Entre sus ventajas se incluye el control preciso de las condiciones ambientales y la reducción del tiempo de producción^{33,34}.

Entre los sistemas de cultivo *in vitro*, el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) se destaca como un biorreactor reconocido por sus ventajas en cuanto a la facilidad de manejo, escalabilidad y condiciones propicias para el cultivo *in vitro* de plantas y tejidos vegetales³⁵. Adicionalmente, algunos compuestos conocidos como elicitores, poseen la capacidad de inducir o potenciar la biosíntesis de metabolitos secundarios cuando se aplican en cantidades reducidas a las plantas³⁶. Dentro de los elicitores más destacados se encuentran los jasmonatos, compuestos que abarcan ciclopentanona y hormonas vegetales derivadas del ácido α -linolénico³⁷. El ácido jasmónico se establece como el principal precursor de varios compuestos en este grupo, como el metil jasmonato³⁸. Su mecanismo de acción implica la inducción de la expresión de enzimas como PAL (phenylalanine ammonia-lyase) y TD (tyrosine decarboxylase)³⁹⁻⁴¹. Estas enzimas catalizan los primeros pasos de la ruta metabólica de los alcaloides de Amarilidácea (ver figura 1), iniciando con la formación del intermediario O-metilnorbelladina. El acoplamiento oxidativo de -Ortho-para fenol con el intermediario da lugar a la formación de licorina, mientras que el de para-orto fenol conduce a la formación de galantamina⁴², (ver figura 2). Este proceso conduce a un marcado aumento en la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios, incluyendo alcaloides⁴³.

Investigaciones han revelado aumentos sustanciales en la concentración de diversos metabolitos secundarios con la adición de jasmonatos en sistemas *in vitro*, centrándose en los alcaloides y, más específicamente, estudiando su efecto en la producción de galantamina y licorina^{29,31,43}, entre otros. La optimización tanto de la concentración como del tiempo de

exposición de los elicitores en los cultivos *in vitro* emerge como un factor crítico para lograr una producción exitosa de metabolitos secundarios³⁷.

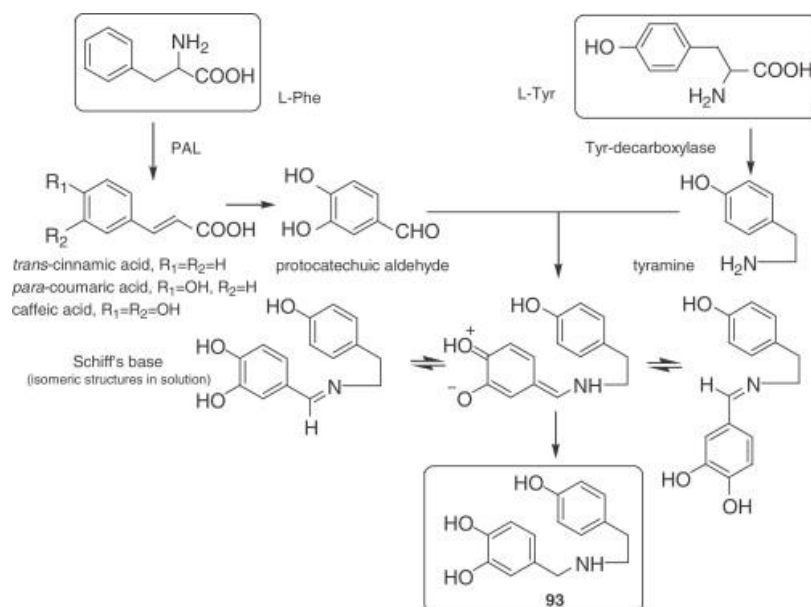


Figura 1: Vía biosintética de norbelladina (representada con el número 93), sintetizada a partir de L-fenilalanina (L-Phe) y L-tirosina (L-Tyr), por acción de las enzimas phenylalanine ammonia-lyase (PAL) y tyrosine decarboxylase (TD).⁴¹.

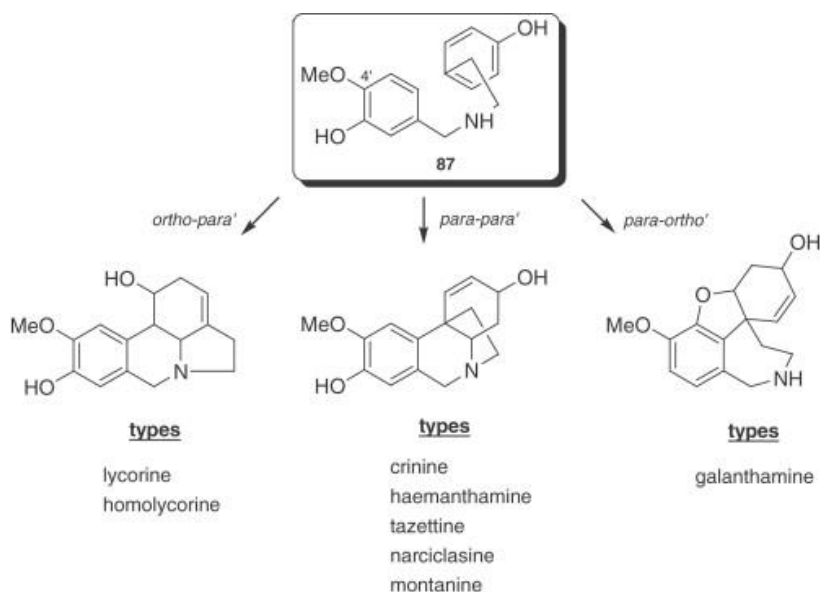


Figura 2: Acoplamiento oxidativo de fenol en alcaloides de Amarilidácea, partiendo del intermediario O-metilnorbelladina (representado con el número 87).⁴¹

Es crucial resaltar que la respuesta a estos estímulos es altamente dependiente de la especie de la planta, así como de la concentración específica del elicitador y la duración de la exposición. Por ejemplo, en el caso de las plantas de *Z. carinata*, se ha observado que el metil jasmonato puede aumentar la producción de alcaloides como la galantamina y licorina; sin embargo, se ha notado un impacto negativo en la acumulación de biomasa y en ciertos parámetros de crecimiento, como el desarrollo de raíces y hojas^{14,29,31,40,42,43}. En contraste, la información disponible sobre el uso de elicitores en plantas de *E. grandiflora* es limitada, lo que hace que determinar el efecto de los elicitores en esta planta constituya un ámbito innovador y pueda proporcionar perspectivas sobre el comportamiento de esta especie frente a la producción de alcaloides.

En este contexto, este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del metil jasmonato en la producción de los alcaloides galantamina y licorina en plantas de *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora* cultivadas en un sistema de inmersión temporal (SIT). Los objetivos específicos son determinar los tiempos de cultivo óptimos en los cuales el metil jasmonato puede inducir una mayor producción de galantamina y licorina, y evaluar su efecto en el desarrollo y la acumulación de biomasa de las plantas.

Metodología

1. Introducción de material vegetal a cultivo *in vitro*.

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología de la Universidad ICESI, utilizando plantas de *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora* que formaban parte de la colección de plantas de cultivo *in vitro*. Además, con el objetivo de aumentar el número de plantas disponibles para el experimento, se hizo introducción de plantas procedentes del vivero ubicado en la misma universidad al sistema de cultivo *in vitro*. Estas plantas se mantuvieron en condiciones de sombra proporcionada por una polisombra, emulando las condiciones propias de un sotobosque, similar al entorno natural de las plantas. Cabe destacar que el vivero se encuentra en condiciones ambientales no controladas, es decir, reflejaba las condiciones naturales de la zona de estudio en Cali, incluyendo variaciones en temperatura, humedad y fotoperiodo.

Se introdujeron 12 bulbos de *Zephyranthes carinata* y 12 bulbos de *Eucharis grandiflora*. Los procesos realizados para la desinfección y la posterior siembra en un sistema *in vitro* se describirán detalladamente en los siguientes párrafos.

1.1 Preparación de medios de cultivo

En el transcurso del proyecto, se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige and Skoog) completo⁴⁴, suplementado con sucrosa 3% y bencilopurina (BAP) (1ml/L) para estimular el crecimiento y la generación de bulbos en estas plantas y gel rite al 2%, como agente gelificante. Los reactivos se obtuvieron de PhytoTech Labs®. Adicionalmente, se ajustó el pH del medio a 5.8, (medio MSA1B). Respecto al cultivo de *E. grandiflora*, se empleó el mismo medio de cultivo con las mismas adiciones, sin embargo, se añadió carbón vegetal (Duchefa Biochemie ®) 0.1%. Esta adición se realizará con el propósito de neutralizar los compuestos fenólicos que la planta pudiera secretar y, de este modo, evitar cualquier interferencia de estos compuestos en el desarrollo del experimento. Adicionalmente, para hacer el cultivo en medio de inmersión temporal se empleó el medio MS líquido suplementado con sucrosa al 3%.

1.2 Desinfección de material.

El proceso de desinfección del material vegetal procedente del vivero, previo a su introducción en el cultivo *in vitro*, fue el siguiente: inicialmente, se realizó una limpieza física de los bulbos mediante un lavado con agua corriente, eliminando tierra, escamas exteriores deterioradas, tallos y raíces. Posteriormente, en una cabina de flujo laminar (Esco®), se llevó a cabo tres inmersiones de los bulbos en etanol al 70%, con cada inmersión durando 2 minutos y con una agitación constante. A continuación, se hizo un enjuague con agua estéril para eliminar cualquier residuo de etanol. Luego, los bulbos se sumergieron en una solución desinfectante compuesta por hipoclorito de sodio 5%, Tego 51 (Evonik®) al 2%, y Tween 20 (4 gotas por 100 ml de solución) durante 20 minutos, con agitación constante. Finalmente, se realizó un lavado final con agua estéril hasta la desaparición de la espuma residual.

1.3 introducción de material a un sistema de cultivo *in vitro* permanente.

Para el proceso de introducción, se empleó la técnica de "twin-scaling" con el fin de inducir la formación de bulbillos *in vitro*⁴⁵. En este proceso, se retiraron las 4 escamas más externas de los bulbos como medida para reducir la contaminación. Luego, se cortó el bulbo de manera transversal, descartando la parte apical. A continuación, la parte basal del bulbo se dividió en seis secciones, y de cada sección se seleccionaron 3 pares de escamas unidas por la placa basal, como se muestra en la imagen 3. Esto se realizó con la asistencia de un estereoscopio (Nikon ®), y se introdujeron en el medio de cultivo MSA1B, asegurando que el área de la placa basal del ex plante estuviera en contacto con el medio de cultivo para garantizar la apertura de las escamas y la formación de nuevos bulbillos. Se sembraron de 2 a 4 pares de escamas por recipiente, dependiendo del tamaño del frasco.



Figura 3: De izquierda a derecha se muestran, plantas de *Z. carinata*, plantas de *E. grandiflora* y técnica de twin-scaling.

En este proyecto, se procesaron un total de 12 bulbos de *Zephyranthes carinata* y 12 bulbos de *Eucharis grandiflora* procedentes del invernadero, lo que resultara en la siembra de 48 pares de escamas por bulbo. Además de utilizar el material procedente del vivero, se emplearon bulbos presentes en cultivo *in vitro* al inicio del proyecto, en concreto se usaron 16 bulbos con estas características, de los cuales se obtuvieron 12 escamas por bulbo. En todos los casos, los bulbillos se propagaron en medio MSA1B.

Los cultivos *in vitro* se mantuvieron en una sala a temperatura constante de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas bajo luz blanca y 8 horas de oscuridad, y con una humedad relativa del 70%.

2. Introducción de bulbos de *E. Grandiflora* y *Z. Carinata* al sistema de inmersión temporal.

El Sistema de Inmersión Temporal (SIT) utilizado se encuentra en el cuarto de crecimiento del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. Consta de tres componentes: un compresor sin aceite de la marca Kaeser Dental 5T, que controla la presión del aire y facilita el intercambio de medio entre los recipientes; paneles o estantes con mangueras de silicona Tygon 3350 que conectan cada unidad de cultivo (dos recipientes para el intercambio del medio); y los recipientes de cultivo, que en este estudio consistieron en pares de Erlenmeyer de 250 mL cada uno.

Cada unidad de cultivo, o réplica, se compone de dos Erlenmeyer cerrados con tapones de caucho grado alimenticio, conectados por una manguera de silicona Tygon 3350 que permite el paso del medio de cultivo entre ellos. El sistema incluye un tubo de vidrio en forma de "Y" con tapón de goma tipo septum en la manguera, permitiendo inyectar, mediante jeringa y aguja hipodérmica estéril, el medio de cultivo una vez consumido o evaporado, devolviéndolo a su volumen inicial (ver figura 4).

El diseño del SIT preserva la integridad morfológica de las plantas *in vitro* y reduce el estrés mecánico al posibilitar el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los tejidos vegetales durante breves periodos, renovando la atmósfera gaseosa. Además, destaca por su facilidad de preparación, esterilización y manipulación, y permite ajustar la composición del medio mediante una simple transferencia, ofreciendo oportunidades para la automatización³⁵. En estos experimentos, se programó una frecuencia de intercambio de 3 veces al día, con una duración de 15 minutos cada vez, y se cultivaron las plantas en medio MS líquido suplementado con un 3% de sucrosa. El volumen del medio se mantuvo constante mediante adiciones cuando fue necesario.



Figura 4: a, SIT instalado, a la izquierda Erlenmeyer con plantas y a la derecha Erlenmeyer donde se agrega inicialmente el medio de cultivo. b, inyección de medio de cultivo por el tapón tipo septum.¹⁴

2.1 Preparación de los tratamientos con metil jasmonato para la inducción en la producción de alcaloides en plantas de *E. Grandiflora* y *Z. Carinata*.

Para la transición de las plantas desde el sistema de cultivo *in vitro* permanente al sistema de inmersión temporal, se llevó a cabo la remoción de hojas y raíces, conservando únicamente los bulbillos. Este procedimiento tuvo como objetivo simplificar su inserción en los Erlenmeyer, garantizar la asepsia del ensayo y estandarizar el estado fisiológico de los tejidos a evaluar. En cada matraz Erlenmeyer, se introdujeron la cantidad necesaria de bulbillos para alcanzar un peso fresco de 2,5 g por matraz (entre 18 y 21 bulbillos de *Zephyranthes carinata* y 10 a 14 de *Eucharis grandiflora*). En el matraz emparejado (réplica), se añadieron 40 ml de medio MS suplementado con sacarosa al 3%. Se evaluó el efecto del metil jasmonato en el medio de cultivo a una concentración de 50 μM , para ello, este compuesto fue incorporado 7 días después de la introducción de los bulbillos en el sistema de inmersión temporal. La cosecha de los bulbillos se realizó a los 7 y 15 días posteriores a la introducción del elicitor en el medio de cultivo. Como control, se incluyeron plantas cultivadas en el sistema de inmersión temporal en el mismo medio de cultivo, pero sin el uso de elicitores, manteniendo el mismo período de 7 y 15 días.

Una semana después de iniciar el cultivo, se realizaron inyecciones de 5 mL de medio (con o sin elicitores según el tratamiento) con el propósito de compensar la reducción del medio

debida a la evaporación y al consumo por parte de las plantas, manteniendo así el volumen inicial de 40 mL.

3. Toma de medidas morfológicas

Después del tratamiento con metil jasmonato, se retiraron las plantas de los sistemas de inmersión temporal (SIT) y se procedió a medir su peso fresco, comparándolo con las mediciones previas al ingreso al SIT. Además, para determinar la biomasa de los bulbillos, estos fueron pesados después de haber sido secados en un horno durante 72 horas. Todas las mediciones se realizaron utilizando una balanza de la marca Sartorius. Los datos de biomasa corresponden a los datos de peso seco de los bulbos, ya que de esta manera se tiene en cuenta la masa real de la planta, descartando la variación que proporciona el contenido de humedad de cada planta.

Finalmente, para obtener las medidas de longitud de las hojas y raíces más largas, se empleó un papel milimetrado para realizar las mediciones correspondientes, tomando en cuenta la raíz y la hoja más extensa de todos los bulbillos.

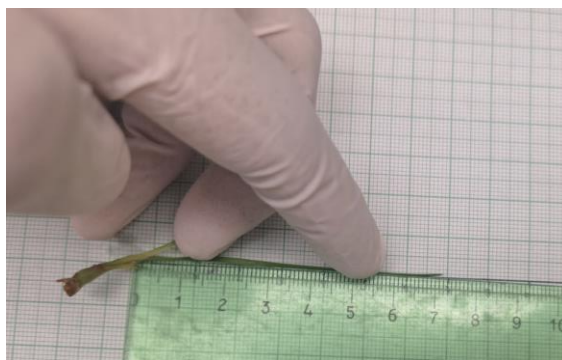


Figura 5: técnica usada para medir el largo de hojas, en este caso de un bulbo de Z. carinata.

4. Extracción de alcaloides.

La extracción de alcaloides siguió el protocolo establecido por Fernández (2018). Inicialmente, se secó el material vegetal a 55 °C durante cuatro días para eliminar la humedad y determinar su peso seco. Luego, se tomó una muestra de 300 mg de material vegetal, que fue macerada con nitrógeno líquido. La mezcla resultante se resuspendió en ácido clorhídrico al 5% con una relación peso-volumen del 6%. Esta suspensión se sometió a sonicación (Qsonica®) durante 16 minutos a una amplitud del 65% en intervalos de 59 segundos,

seguido de una centrifugación a 5000 rpm para separar el sobrenadante (fase ácida), que se recuperó en un erlenmeyer de 125 mL. El precipitado resultante se trató con HCl tres veces más, realizando la centrifugación y el vortex en cada lavado.

El sobrenadante recolectado se lavó con hexano tres veces para eliminar las grasas, utilizando una relación 1:1 con la fase ácida. Después de cada lavado, se agitó a 300 rpm durante una hora y se separaron las fases en un balón de decantación. Se aumentó el pH de la fase ácida a 9 mediante la adición de hidróxido de amonio al 28%, a continuación, la muestra se agitó a 300 rpm durante 24 horas. Posteriormente, se añadió cloroformo en proporción 1:1 y se agitó durante 3 horas, separando las fases en un balón de decantación y conservando la fase orgánica (cloroformo, enriquecido con los alcaloides). Este paso se repitió dos veces.

Se realizaron dos lavados adicionales con agua tipo 2 en relación 1:1, agitándolos a 300 rpm durante 10 minutos cada uno. Finalmente, se filtró la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro para eliminar trazas de agua, y se llevó a rotoevaporación a 40 °C y un vacío entre 280-600 bares.

Los alcaloides se recuperaron del balón utilizando metanol y se transfirieron a un vial de vidrio y se llevó al horno hasta que se evaporara el metanol para calcular el rendimiento de la extracción. Luego, se resuspendieron en metanol y se almaceno a 4 °C hasta la cuantificación.

5. Cuantificación por espectrofotometría.

Se realizó la cuantificación de galantamina y licorina mediante espectrofotometría UV utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Primero, se llevó a cabo un espectro de barrido en el rango de 200 a 600 nm para determinar la absorbancia máxima de ambos compuestos. Una vez identificadas las longitudes de onda de absorbancia máxima, se desarrollaron curvas de calibración para galantamina y licorina. Para la galantamina, se emplearon soluciones con concentraciones de 0.0125, 0.025, 0.050, 0.075 y 0.1 g/L de bromhidrato de galantamina (Supelco®). Para la licorina, se utilizaron concentraciones de 0.0125, 0.025, 0.0375, 0.05 y 0.075 g/L de clorhidrato de licorina (Sigma-Aldrich®). Ambos compuestos fueron disueltos en metanol. En este análisis se usó 1 ml de muestra, el cual era

el resultado de la extracción ácida de los alcaloides en donde se usó 300 mg para cada tratamiento.

6. Análisis estadístico

Para este experimento se realizó un diseño de bloques completamente al azar para analizar las variables propuestas. En este diseño se tuvieron 4 niveles que fueron los controles a los 7 y 15 días de cultivo y los cultivos expuestos durante 7 y 15 días a metil jasmonato, así mismo, el factor de bloqueo fue las especies de planta que se analizó. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los análisis se hicieron usando análisis de varianza (ANOVA) y para evaluar las diferencias entre los grupos, se utilizó la prueba de Tukey con la función `HSD.test` del paquete `agricolae` en R⁴⁶ con una significancia $p < 0.05$. Estas pruebas fueron realizadas en el programa R versión 4.4.0.

Resultados

1. Propagación de material vegetal

Se obtuvieron un total de 422 y 412 plántulas de *Z. carinata* y *E. grandiflora* respectivamente, esto mediante la técnica de twin scaling. Esto se traduce en un porcentaje de inducción del 86-88%. Al considerar la pérdida del 4% debido a la contaminación, la efectividad de propagación fue del 82 y 84% para *Z. carinata* y *E. grandiflora* respectivamente. Además, se considera que una tasa de contaminación menor al 10% indica que el proceso de introducción del material es altamente efectivo.

2. Medidas físicas de las plantas.

Luego del tratamiento se observó que las plantas de *Z. carinata* tuvieron una mejor respuesta a su cultivo en el sistema de inmersión temporal, siendo capaces de producir una mayor cantidad de hojas y raíces. Este comportamiento se registró tanto en los tratamientos con metil jasmonato como en los grupos control. Por su parte, las plantas de *E. grandiflora* tuvieron un pobre desempeño en este sentido como se puede observar en la figura 6. Teniendo en cuenta lo anterior, los análisis físicos se realizaron únicamente con las plantas que presentaban hojas y raíces, con el fin de evitar variaciones excesivas provocada por los datos atípicos que supondrían las plantas sin hojas o raíces.

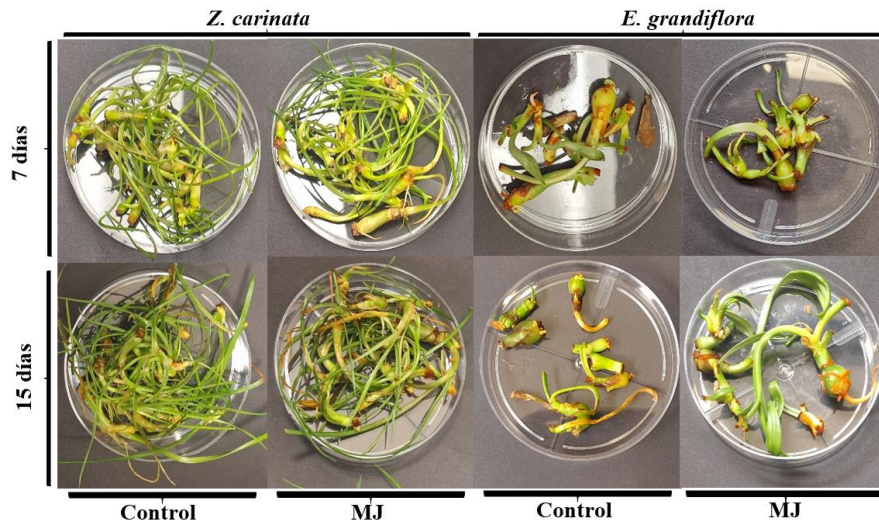


Figura 6: Plantas de *Z. carinata* y *E. grandiflora* cosechadas después de haber sido sometidas a los distintos tratamientos propuestos en este trabajo en el sistema de inmersión temporal.

También se pudo evidenciar que las plantas de *Z. carinata* presentaron hojas más largas que las de *E. grandiflora* esto es fácilmente explicado por las diferencias en la morfología y fisiología de ambas especies. El experimento arrojó como resultado que los tratamientos en los que se agregó metil jasmonato (MJ) tuvieron hojas más largas en comparación con los promedios. Prueba de ello es que tanto el control de 15 días como el tratamiento con MJ de 7 días no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ambas plantas. Esto contrasta con estudios anteriores donde la aplicación de MJ provocaba una fuerte disminución en el crecimiento de las hojas^{14,47}. En este estudio, se encontró que los tratamientos con MJ incrementaron el largo de la hoja más larga en un 13-16% en ambas plantas y para cada tiempo de cultivo.

Por otro lado, las raíces vieron disminuido su crecimiento con la adición de MJ, efecto que se notó de forma más severa en *Z. Carinata*. Las plantas expuestas durante 7 días a MJ redujeron el tamaño de su raíz en aproximadamente un 30%, y este efecto se intensificó con el tiempo, ya que esta especie presentó una reducción del 50% cuando fue expuesta a 15 días de tratamiento con MJ (en comparación con los controles). En el caso de *E. Grandiflora*, también se observó una reducción en la tasa de crecimiento en la raíz más larga, teniendo una disminución de aproximadamente el 60% en 7 días de tratamiento. Sin embargo, a los 15 días de tratamiento, esta tasa de reducción se redujo a la mitad. Estos resultados se pueden

observar de manera grafica en la figura 7. Además, es importante señalar que todos los tratamientos tuvieron una variación significativa, esto puede ser ocasionado por el hecho de que no todas las plantas produjeron raíces, esto puede estar asociado a una respuesta propia de cada planta o el hecho de que cuando las plantas están sumergidas en el medio, pueden absorber nutrientes por toda la superficie de la planta.

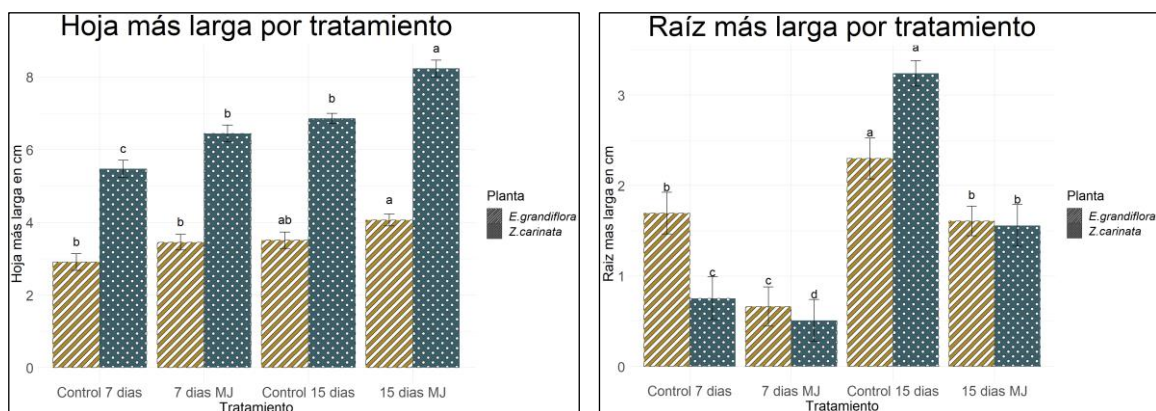


Figura 7: En el panel izquierdo, se muestra el promedio de la hoja más larga para cada tratamiento evaluado (*Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora*), incluyendo cultivos a 7 y 15 días con metil jasmonato y sus respectivos controles. En el panel derecho, se presenta el promedio de la raíz más larga para cada tratamiento. En ambos paneles, se incluyen barras de error que representan la desviación estándar y las letras indican las diferencias significativas según la prueba de Tukey.

En cuanto a la biomasa de las plantas, en la gráfica 8 se observa que *Z. carinata* tiende a producir una mayor cantidad de biomasa en comparación con *E. grandiflora*. Sin embargo, esto contrasta con las observaciones físicas evidentes en la figura 6, donde se muestra que las plantas de *E. grandiflora* son notablemente más grandes que las de *Z. carinata*. La explicación de este fenómeno radica en que la biomasa mostrada en la figura 8 se calcula como un promedio por SIT. Además, para alcanzar el peso fresco inicial de 2.5 gramos, generalmente se necesitó un mayor número de plantas de *Z. carinata*. Por lo tanto, se puede decir que la mayor biomasa puede explicarse porque hay un mayor número de plantas contribuyendo a esta variable en los SIT de *Z. carinata* que en los de *E. grandiflora*.

Por otro lado, Se encontró que ambas plantas aumentan su biomasa en los SIT que contenían MJ tanto a los 7 como a los 15 días de cultivo. Como es de esperarse las plantas que tienen más tiempo en el medio incrementa su biomasa, por ello, los mejores resultados de biomasa de obtuvieron a los 15 días de cultivo. Cabe resaltar que, esto está en concordancia con otras

publicaciones en donde encontraron que una dosis pequeña menor de 50 μM no interfería en el crecimiento de la planta⁴⁷.

A pesar de que existen artículos en donde se ha encontrado que el MJ en pequeñas dosis no interfieren en la acumulación de biomasa. También existen una gran cantidad de artículos en donde la aplicación de inductores ralentiza el desarrollo de la planta^{48,49}. En dichos artículos se explica que, los elicitores pueden reducir el crecimiento de las plantas al desviar recursos de los procesos de crecimiento hacia los mecanismos de defensa. Cuando las plantas detectan inductores, activan sus sistemas de defensa, lo que a menudo implica la producción de metabolitos secundarios como los alcaloides. Esta respuesta requiere una cantidad significativa de energía y recursos, que luego no están disponibles para las actividades de crecimiento primario, como la división y el alargamiento celular^{50,51}.

Esto se debe a que los inductores desencadenan respuestas inmunes en las plantas, que incluyen producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de genes relacionados con la defensa. Estos procesos consumen mucha energía y pueden conducir a una reducción en el crecimiento general de las plantas, ya que los recursos se asignan a la defensa en lugar del crecimiento⁵⁰.

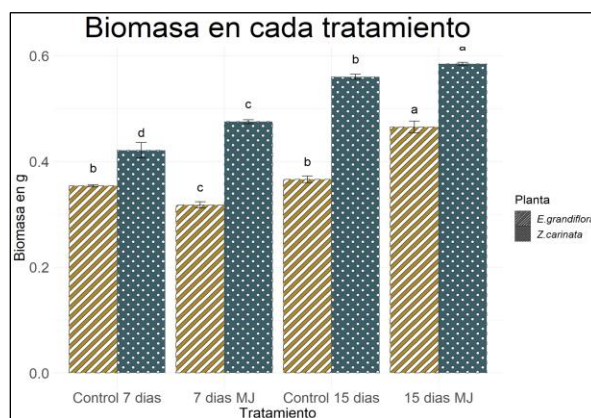


Figura 8: Biomasa acumulada promedio de *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora* bajo diferentes tratamientos. Los tratamientos incluyen cultivos a 7 y 15 días con metil jasmonato y sus respectivos controles. Las barras de error indican la desviación estándar, y las letras sobre las barras muestran las diferencias significativas determinadas por la prueba de Tukey.

A pesar de esta información, y teniendo en cuenta la poca información específica para las especies estudiadas en este trabajo, se puede especular con que los elicitores estén

interviniendo en las rutas metabólicas de las plantas de una manera diferente a la habitual en otros grupos de plantas.

3. Obtención de alcaloides galantamina y licorina.

Se usó la espectrofotometría UV para cumplir con uno de los objetivos del trabajo, el cual era determinar la concentración de galantamina y licorina presentes en las plantas evaluadas en cada uno de los tratamientos. Para ello se realizó un espectro de barrido, en donde se encontró que la absorbancia máxima para los compuestos era de 289 nm y 286 nm para galantamina y licorina respectivamente, estos resultados se ajustan a lo reportado en la teoría para estos compuestos^{52,53}. Adicionalmente, en la figura 9 se muestra los resultados de las curvas de calibración realizadas para obtener la concentración de los alcaloides extraídos de las plantas estudiadas.

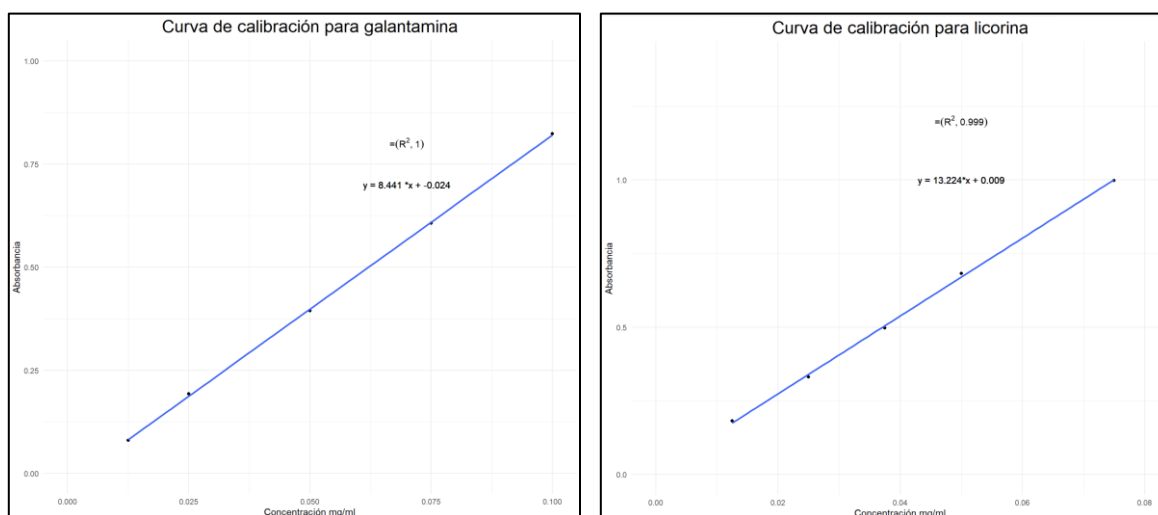


Figura 9: de izquierda a derecha se muestran las curvas de calibración realizadas para galantamina y licorina respectivamente. también se muestra el R^2 de la recta y su ecuación.

Como regla general se observó que los tratamientos que incluían MJ producían una mayor cantidad de alcaloides comparado con su respectivo control. Estos incrementos en la producción de alcaloides han sido ampliamente estudiados en diversos estudios. Los cuales indican que el efecto beneficioso del metil jasmonato en el aumento de la producción de alcaloides se debe a que este compuesto aumenta la actividad de la enzima tirosina-decarboxilasa, que está involucrada en la vía biosintética de alcaloides tipo isoquinoleína y Amarilidácea^{47,54-56}. La activación de esta encima hace que la L-tirosina se convierta en

tiramira y posteriormente, por medio de acción de otras enzimas presentes en la cascada de señalización de respuesta al estrés, se convierta en norbelladina la cual es el principal intermediario en la producción de todos los tipos de alcaloides de amarilidácea⁴¹.

Siguiendo con un análisis de las plantas usadas en este trabajo, se encontró que las plantas de *E. grandiflora* presentaban una mejor respuesta en cuanto a su producción de los alcaloides estudiados. Así mismo, se encontró que, a mayor tiempo de cultivo, mayor es la producción de alcaloides. También, los tratamientos con metil jasmonato presentaron una mejor respuesta en cuanto a la producción de ambos alcaloides en comparación con sus respectivos controles. Incluso en *Z. carinata*, las plantas cultivadas con 50 μ M de MJ durante 7 días, muestran una mayor producción de licorina y galantamina si se comparan con el control de las plantas cultivadas por 15 días sin MJ (Figura 10). Es decir, que entre más tiempo de exposición tengan los tejidos al elicitor, mayor es la producción de alcaloides. En consecuencia, el valor más alto se obtuvo a los 15 días de exposición (0.65 mg/ml en *Z. carinata* y 0.89 mg/ml en *E. grandiflora* en el caso de la galantamina y 0.53 mg/ml en *Z. carinata* y 0.64 mg/ml en *E. grandiflora* para licorina), mientras que las menores concentraciones se obtuvieron en los controles (sin MJ) a los 7 días de cultivo.

En cuanto a *E. grandiflora*, se encontró que las plantas producen una mayor cantidad de alcaloides a mayor tiempo de cultivo, y los resultados son mejores cuando el medio estaba suplementado con MJ. Un punto importante de resaltar es que, para galantamina, el tratamiento de cultivo por 15 días con MJ muy similar a su control, esto puede obedecer a que el cultivo en el SIT fue suficiente para estimular la planta o se deba a un error experimental, ya que este es un resultado atípico al compararlo con la respuesta de los otros tratamientos estudiados. A pesar de ello, se puede mencionar que *E. grandiflora* posee una mejor respuesta en cuanto a la producción de licorina y galantamina al compararla con *Z. carinata*. Prueba de ello es que, para 15 días con metil jasmonato se tiene que *E. grandiflora* produce en promedio 24% más de galantamina y 10% más de licorina.

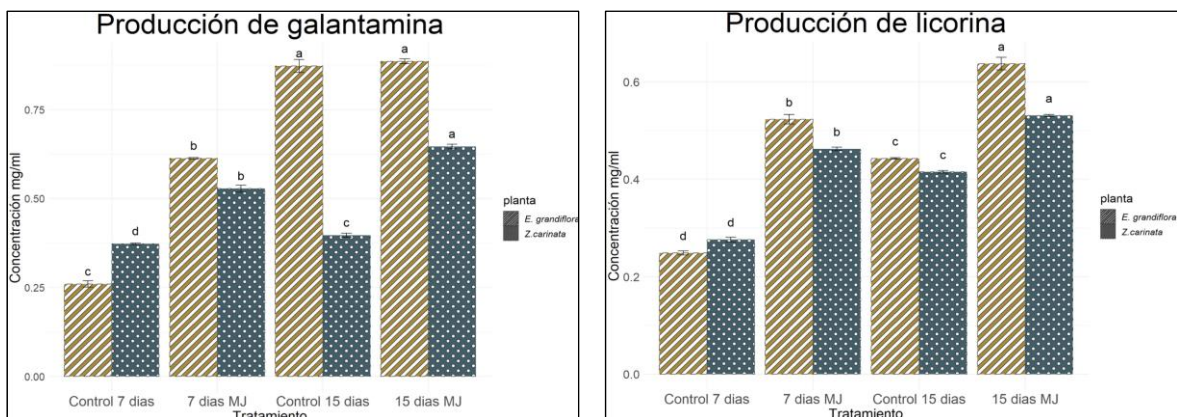


Figura 10: Producción promedio de galantamina y licorina en *Zephyranthes carinata* y *Eucharis grandiflora* bajo diferentes tratamientos (7 y 15 días de cultivo con metil jasmonato y su respectivo control sin metil jasmonato). En el panel izquierdo, se muestra la producción de galantamina, y en el panel derecho, la producción de licorina, en cada tratamiento evaluado. Las letras indican el resultado de las pruebas estadísticas, donde letras iguales no representan diferencias estadísticamente significativas. Cada tipo de planta se presenta como un bloque diferente, resaltando la variabilidad entre ellas.

Ahora, si se comparan los tratamientos con los controles se tiene que en *Z. carinata*, se incrementa un 15% la producción de galantamina con el tratamiento de metil jasmonato 7 días, y 25 % a los 15 días (ambos con respecto a su control) y para *E. grandiflora*, se incrementa en 35 % en el tratamiento de 7 días y 1.30% en el tratamiento de 15 días igualmente en comparación con su respectivo control.

Para licorina los incrementos son más modestos, pues se encontró que *Z. carinata* cultivada por 7 días con MJ, incrementaba la producción del compuesto en 19% y para 15 días en 12%. Por otro lado, *E. grandiflora* incrementaba su producción de licorina en 27% cuando se cultivaba por 7 días con MJ y 19% a los 15 días, todo esto al comparar el cultivo con el elicitor y su control.

De estos datos se puede decir que, para el caso de la galantamina, ambas plantas incrementan significativamente su producción de alcaloides a mayor tiempo de cultivo con el elicitor, cuando se compara con el respectivo control y teniendo en cuenta el resultado atípico de la producción de galantamina a los 15 días por parte de *E. grandiflora*. Por otro lado, en la producción de licorina, ambas plantas reducen el porcentaje de incremento del alcaloide en el cultivo por 15 días, con respecto al de 7 días, esto puede deberse a la producción de otros

compuestos en respuesta al estrés generado por el elicitor, dejando de lado la producción de este tipo de alcaloide^{26,36,43}.

también es importante señalar que estos resultados van en línea con lo reportado en trabajos anteriores sobre este tema, Por ejemplo, se ha reportado que el elicitor MJ aumentan en un 54 % la producción total de alcaloides en comparación con los controles en plantas de *Z. carinata*¹⁴. Adicionalmente en otras plantas de la familia amarilidácea como *L. chinensis* cultivadas durante 10 días en medio semisólido suplementado con MJ 100 μ M tuvieron un aumento del 1.49% y 1.37% de aumento en galantamina y licorina respectivamente en la concentración de alcaloides totales en relación con el control⁵¹. De igual forma, en un cultivo de brotes de *Leucojum aestivum* en inmersión temporal se presentó un aumento significativo de galantamina y alcaloides totales con respecto al control, cuando se adicione MJ a 100 μ M. Por otra parte, un estudio en brotes de *Narcissus confusus*, encontró que la adición de MJ 25 μ M mejoraba en 3.8% la producción de galantamina en medio de cultivo líquido con respecto a los controles⁴⁷. Así mismo, en plantas de *Z. candida*, *Z. grandiflora* y *Z. citrina* se encontró que el tratamiento de metil jasmonato mejora la producción de licorina, en donde el mejor tratamiento para ello fue el tratamiento del medio con 100 μ M de metil jasmonato⁴⁹, además, encontraron que los bulbos eran la parte de la planta que más alcaloides producía.

Como ya se mencionó, el tiempo de elicitación también fue un factor determinante en la producción de alcaloides. Estudios han encontrado que *Leucojum aestivum* fue capaz de producir alcaloides en diferentes cantidades, en relación con el tiempo de inducción. Por ejemplo, con la adición de ácido jasmonico 25 μ M, por 7 días a un cultivo que llevaba 28 días establecido. produjo un aumento de la galantamina de 1,4 veces y de licorina de 1,77 veces en comparación con el control⁵⁷. Por otro lado, en evaluaciones hechas en SIT, la adición al medio de cultivo de MJ en diferentes tiempos: al inicio del cultivo (25 μ M) y a la cuarta, sexta y séptima semana (100 μ M). El mejor tratamiento fue a la séptima semana con un aumento en la concentración de alcaloides de 29.2 %⁵⁸. También, cuando se estudiaron en cultivos en SIT tipo RITA® diferentes tiempos de cultivo (10 horas; 3 y 7 días) con medio suplementado con MJ (0.5, 50 y 100 μ M). Los mejores tratamientos para la producción de

galantamina fueron 5 y 50 μM a los siete días con un aumento de 344 %, y para el caso de la licorina también fue a los siete días con la concentración de 50 μM y un aumento de 83 %⁴⁸. Dados estos resultados, indican que, bajo las condiciones evaluadas, el tiempo de adición de elicitores es uno de los principales factores a tener en cuenta a la hora de buscar la optimización en procesos de obtención de alcaloides. Esto a su vez plantea una nueva oportunidad de estudio, en donde se evalúen tiempos más prolongados de cultivo de las plantas cultivadas en medios suplantados con MJ.

Por último, los resultados encontrados parecen apoyar ideas previas que mencionan que, existe una relación inversa entre el peso seco y la producción de alcaloides⁴⁰. Ya que como se evidencia en la grafica 8, *E. grandiflora* presenta una menor cantidad de biomasa (tomada como peso seco en este estudio) en comparación con *Z. carinata*, aun así, fue la planta que más alcaloides produjo. En este sentido, se encontró los tratamientos con mayor producción de alcaloides fueron aquellos en los que el crecimiento de raíces fue menor, lo cual concuerda con estudios previos realizados en plantas de *Z. carinata*, en donde se llegó a esta misma conclusión¹⁴. Caso opuesto fue la relación del crecimiento de hojas, y su contribución a la producción de alcaloides, pues al menos para *E. grandiflora*, parece indicarse que el pobre desarrollo de hojas potencia la producción de alcaloides. Sin embargo, este efecto puede estar impulsado por procesos fisiológicos propios de las plantas. Aunque, es importante resaltar que esta última afirmación es especulativa, ya que en la actualidad no existe literatura que pueda soportar esta afirmación para esta especie de planta. Nuevamente, esta incógnita puede ser la base para futuros trabajos sobre la producción de alcaloides, en donde se estudie la producción de alcaloides en cada órgano de la planta. Lo anterior teniendo en cuenta que *E. grandiflora* presento un mejor rendimiento que *Z. carinata*, planta que ha sido más estudiada.

Conclusión

Este estudio se centra en evaluar la producción de alcaloides en dos plantas de la familia Amarilidácea, *Z. carinata* y *E. grandiflora*, utilizando un enfoque de cultivo *in vitro* e inducción mediante elicitores, con el objetivo de mejorar las condiciones y la producción natural de alcaloides útiles para la industria farmacéutica.

Para lograr esto, se estableció una metodología que permitiera la propagación eficiente de estas plantas en sistemas in vitro. La técnica de “twin scaling” demostró ser adecuada para este propósito, ya que se obtuvo una alta tasa de supervivencia y desarrollo en ambas especies estudiadas.

Además, se analizaron las medidas físicas de las plantas para identificar diferencias en su reacción al tratamiento con metil jasmonato. Se observaron diferencias notables en la respuesta de las plantas al cultivo: *Z. carinata* mostró una mejor adaptación al sistema de inmersión temporal y una mayor producción de hojas y raíces en comparación con *E. grandiflora*. Aunque las tendencias en la biomasa no fueron estadísticamente significativas, se detectó una leve influencia negativa del metil jasmonato en el crecimiento de las plantas.

El aspecto más relevante del estudio radica en la producción de alcaloides. Mediante espectrofotometría UV, se confirmó que los tratamientos con metil jasmonato favorecen la producción de galantamina y licorina, siendo *E. grandiflora* la especie que mostró una mejor respuesta en la producción de estos compuestos. Estos hallazgos coinciden con investigaciones anteriores, reforzando la idea de que la aplicación de metil jasmonato interviene directamente en la ruta biosintética de los alcaloides, favoreciendo su producción. Se determinó que el tiempo de exposición al elicitor es un factor crucial en la biosíntesis de alcaloides, obteniéndose mejores resultados con tiempos de exposición más prolongados. El mejor resultado se obtuvo en plantas de *E. grandiflora* cultivadas durante 15 días en presencia de metil jasmonato, con un incremento del 24% en la producción de galantamina y del 10% en la producción de licorina respecto al control.

Estos resultados abren la puerta a nuevas interrogantes, como la reacción de *E. grandiflora* a un mayor tiempo de cultivo con el elicitor o el uso de otros elicitores en ambas plantas, especialmente en *E. grandiflora*, dado que la información bibliográfica sobre esta especie es limitada.

Finalmente, esta investigación contribuye a comprender mejor la producción y obtención de metabolitos secundarios en plantas de la familia amarilidácea, especialmente en el estudio de

alcaloides. Ya que, incrementar la producción de alcaloides como la licorina y la galantamina abre la puerta a que otros grupos de investigación puedan obtener materias primas para investigar el potencial uso terapéutico de estos compuestos frente a diversas enfermedades, como el Alzheimer, el cáncer y las infecciones virales.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Paola Caicedo Burbano por recibirme bajo su dirección, así como por su invaluable orientación y sus valiosos comentarios a lo largo del desarrollo de este trabajo. También extendo mi gratitud a María Eugenia Buitrago por su co-dirección, orientación, ayuda práctica y significativas contribuciones en el laboratorio. Agradezco a Brandon Ortiz por su orientación en el proceso de extracción, también a Andrés Arana por su contribución en identificar alternativas en la cuantificación de los alcaloides. Por último, agradezco a la Universidad ICESI por hacer posible este proyecto mediante su financiación y el préstamo de sus instalaciones.

Referencias

1. Xu, Z. & Chang, L. Amaryllidaceae. *Identification and Control of Common Weeds: Volume 3* 877–889 (2017) doi:10.1007/978-981-10-5403-7_34.
2. Nair, J. J., Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F. & Van Staden, J. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: A Review. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800938> **8**, 1335–1350 (2013).
3. CABEZAS Quimico, F. *et al.* Alcaloides y actividad biológica en eucharis amazonica, e. grandiflora, caliphruria subdentata y crinum kunthianum, especies colombianas de amaryllidaceae. *Scientia et Technica, ISSN 0122-1701, Vol. 1, N.º. 33, 2007, págs. 237-241* **1**, 237–241 (2007).
4. Masi, M. *et al.* Alkaloids isolated from Haemanthus humilis Jacq., an indigenous South African Amaryllidaceae: Anticancer activity of coccinine and montanine. *South African Journal of Botany* **126**, 277–281 (2019).
5. He, M., Qu, C., Gao, O., Hu, X. & Hong, X. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *RSC Adv* **5**, 16562–16574 (2015).
6. Pellegrino, S. *et al.* The Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine Binds the Eukaryotic Ribosome to Repress Cancer Cell Growth. *Structure* **26**, 416-425.e4 (2018).
7. Zhang, P. *et al.* Lycorine inhibits melanoma cell migration and metastasis mainly through reducing intracellular levels of β -catenin and matrix metalloproteinase 9. *J Cell Physiol* **234**, 10566–10575 (2019).

8. Leon, F. & Evidente, A. Advances on the Amaryllidacea Alkaloids Collected in South Africa, Andean South America and the Mediterranean Basin. *Molecules* **2023**, Vol. 28, Page 4055 **28**, 4055 (2023).
9. Nair, J. J. & van Staden, J. Insight to the antifungal properties of Amaryllidaceae constituents. *Phytomedicine* **73**, 152753 (2020).
10. Nair, J. J. & van Staden, J. Antiplasmodial constituents in the minor alkaloid groups of the Amaryllidaceae. *South African Journal of Botany* **126**, 362–370 (2019).
11. Masi, M. *et al.* Sarniensine, a mesembrine-type alkaloid isolated from *Nerine sarniensis*, an indigenous South African Amaryllidaceae, with larvicidal and adulticidal activities against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* **116**, 34–38 (2017).
12. Anjali *et al.* Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress* **8**, 100154 (2023).
13. Sharma, A., Sharma, S., Kumar, A., Kumar, V. & Sharma, A. K. Plant Secondary Metabolites: An Introduction of Their Chemistry and Biological Significance with Physicochemical Aspect. *Plant Secondary Metabolites: Physico-Chemical Properties and Therapeutic Applications* 1–45 (2022) doi:10.1007/978-981-16-4779-6_1/COVER.
14. Martínez, J. F. Optimización de la producción de alcaloides en plantas de *Zephyranthes carinata* cultivadas in vitro en Sistemas de Inmersión Temporal. (Universidad Icesi, 2021).
15. Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A. & Pandey, D. K. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol Adv* **35**, 178–216 (2017).
16. Cortes, N., Sabogal-Guaqueta, A. M., Cardona-Gomez, G. P. & Osorio, E. Neuroprotection and improvement of the histopathological and behavioral impairments in a murine Alzheimer's model treated with *Zephyranthes carinata* alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **110**, 482–492 (2019).
17. Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. & Houghton, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* **14**, 289–300 (2007).
18. Chen, H. *et al.* Antiviral activity of lycorine against Zika virus in vivo and in vitro. *Virology* **546**, 88–97 (2020).
19. Alzate, F. *et al.* Sinopsis de la familia Amaryllidaceae en Colombia. *Biota Colomb* **20**, 2–20 (2019).
20. Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A. & Pandey, D. K. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnol Adv* **35**, 178–216 (2017).
21. Cortes, N., Sabogal-Guaqueta, A. M., Cardona-Gomez, G. P. & Osorio, E. Neuroprotection and improvement of the histopathological and behavioral impairments in a murine Alzheimer's model treated with *Zephyranthes carinata* alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **110**, 482–492 (2019).
22. Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. & Houghton, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* **14**, 289–300 (2007).
23. Cortes, N. *et al.* Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sci* **122**, 42–50 (2015).
24. Katoch, D., Kumar, D., Padwad, Y. S., Singh, B. & Sharma, U. Pseudolycorine N-oxide, a new N-oxide from *Narcissus tazetta*. *Nat Prod Res* **34**, 2051–2058 (2020).

25. Ka, S. *et al.* Gigantelline, gigantellinine and giganocrinine, cherylline- and crinine-type alkaloids isolated from *Crinum jagus* with anti-acetylcholinesterase activity. *Phytochemistry* **175**, 112390 (2020).
26. Isah, T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research 2019 52:1* **52**, 1–25 (2019).
27. Ruan, X. *et al.* Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Total Alkaloids, Peimisine, Peimine and Peiminine from the Bulb of *Fritillaria thunbergii* Miq, and Evaluation of Antioxidant Activities of the Extracts. *Materials 2016, Vol. 9, Page 524* **9**, 524 (2016).
28. Yang, L. *et al.* Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules 2018, Vol. 23, Page 762* **23**, 762 (2018).
29. Ptak, A. *et al.* Elicitation of galanthamine and lycorine biosynthesis by *Leucojum aestivum* L. and *L. aestivum* ‘Gravety Giant’ plants cultured in bioreactor RITA®. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **128**, 335–345 (2017).
30. Yue, W. *et al.* Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol* **36**, 215–232 (2016).
31. Syeed, R. *et al.* Methyl Jasmonate Elicitation for In Vitro Lycorine Accumulation in Three Zephyranthes Species and Comparative Analysis of Tissue-Cultured and Field Grown Plants. *Horticulturae* **9**, 832 (2023).
32. Chandran, H., Meena, M., Barupal, T. & Sharma, K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* **26**, e00450 (2020).
33. Marchev, A. S., Yordanova, Z. P. & Georgiev, M. I. Green (cell) factories for advanced production of plant secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol* **40**, 443–458 (2020).
34. Mett, V., Farrance, C. E., Green, B. J. & Yusibov, V. Plants as biofactories. *Biologicals* **36**, 354–358 (2008).
35. Laurain-Mattar, D. & Ptak, A. Amaryllidaceae Alkaloid Accumulation by Plant In Vitro Systems. *Reference Series in Phytochemistry* 203–223 (2018) doi:10.1007/978-3-319-54600-1_4/COVER.
36. Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K. & Puri, S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J Appl Res Med Aromat Plants* **12**, 1–12 (2019).
37. Wasternack, C. & Strnad, M. Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds. *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 2539* **19**, 2539 (2018).
38. Ho, T. T., Murthy, H. N. & Park, S. Y. Methyl Jasmonate Induced Oxidative Stress and Accumulation of Secondary Metabolites in Plant Cell and Organ Cultures. *Int J Mol Sci* **21**, (2020).
39. Zhao, J., Davis, L. C. & Verpoorte, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* **23**, 283–333 (2005).
40. Alisandre Valverde, D. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL METIL JASMONATO Y EL ÁCIDO JASMÓNICO EN LA LIBERACIÓN DE ALCALOIDEOS PRODUCIDOS in vitro EN *Zephyranthes carinata*. (UNIVERSIDAD ICESI, SANTIAGO DE CALI, 2017).

41. Bastida, J., Lavilla, R. & Viladomat, F. Chapter 3 Chemical and Biological Aspects of Narcissus Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Biology* **63**, 87–179 (2006).
42. Barragan Anzola, I. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE ALCALOIDES A PARTIR DE BULBILLOS DE ZEPHYRANTHES CARINATA UTILIZANDO EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL. (Universidad ICESI, Santiago de cali, 2017).
43. Kang, S. M. *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*. *Plant Science* **166**, 745–751 (2004).
44. Murashige, T. & Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**, 473–497 (1962).
45. Guerrero-Valencia, F. A. *et al.* Micropropagación del lirio amazónico (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) mediante organogénesis directa. *Polibotanica* **0**, 141–153 (2021).
46. Mendiburu, F. CRAN - Package agricolae. <https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/index.html> (2023).
47. Colque, R., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Med* **70**, 1180–1188 (2004).
48. Ptak, A. *et al.* Elicitation of galanthamine and lycorine biosynthesis by *Leucojum aestivum* L. and *L. aestivum* ‘Gravety Giant’ plants cultured in bioreactor RITA®. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **128**, 335–345 (2017).
49. Syeed, R. *et al.* Methyl Jasmonate Elicitation for In Vitro Lycorine Accumulation in Three *Zephyranthes* Species and Comparative Analysis of Tissue-Cultured and Field Grown Plants. *Horticulturae* **9**, 832 (2023).
50. Li, Z., Liu, J., Ma, W. & Li, X. Characteristics, Roles and Applications of Proteinaceous Elicitors from Pathogens in Plant Immunity. *Life* 2023, Vol. 13, Page 268 **13**, 268 (2023).
51. Mu, H. mei *et al.* Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and alkaloid accumulation of *Lycoris chinensis* seedlings. *Z Naturforsch C J Biosci* **64**, 541–550 (2009).
52. Bokov, D. O. STANDARDIZATION OF SNOWDROP (*GALANTHUS* L.) HERBAL PHARMACEUTICAL SUBSTANCES BY UV-SPECTROPHOTOMETRY. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **11**, 207–211 (2018).
53. Numan Taspinar, Y. & Bulduk, İ. Alternative Analytical Methods for Quantification of Galantamine in Pharmaceuticals. *Aegean Journal of Medical Sciences* **5**, 58–64 (2022).
54. Xu, S. *et al.* Identification and differential regulation of microRNAs in response to methyl jasmonate treatment in *Lycoris aurea* by deep sequencing. *BMC Genomics* **17**, 1–15 (2016).
55. Ivanov, I., Georgiev, V., Georgiev, M., Ilieva, M. & Pavlov, A. Galanthamine and related alkaloids production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture using a temporary immersion technology. *Appl Biochem Biotechnol* **163**, 268–277 (2011).
56. Wang, R. *et al.* Transcriptome analysis of secondary metabolism pathway, transcription factors, and transporters in response to methyl jasmonate in *Lycoris aurea*. *Front Plant Sci* **7**, 234040 (2017).
57. Ivanov, I., Georgiev, V. & Pavlov, A. Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *J Plant Physiol* **170**, 1122–1129 (2013).

58. Schumann, A. *et al.* Production of galanthamine by *leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Appl Biochem Biotechnol* **167**, 1907–1920 (2012).

Anexos

Tabla 1: Datos de medidas morfológicas y físicas recolectadas durante el experimento.

| Planta | Tratamiento | Hoja más larga (cm) | Raíz más larga (cm) | Peso fresco inicial (g) | Peso fresco final (g) | Peso seco (mg) |
|-----------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------------|-----------------------|----------------|
| <i>Z. carinata</i> | Control 7 días | 5.4500 | 0.7250 | 2.5020 | 5.2210 | 0.4380 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 7 días | 5.2500 | 0.7500 | 2.5030 | 5.1260 | 0.4130 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 7 días | 5.7222 | 0.7875 | 2.5100 | 5.1480 | 0.4120 |
| <i>Z. carinata</i> | 7 días MJ | 6.3500 | 0.5000 | 2.5100 | 5.6690 | 0.4710 |
| <i>Z. carinata</i> | 7 días MJ | 6.2783 | 0.5600 | 2.5200 | 5.6730 | 0.4780 |
| <i>Z. carinata</i> | 7 días MJ | 6.7100 | 0.4667 | 2.5080 | 5.6030 | 0.4770 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 15 días | 6.8050 | 3.2833 | 2.5120 | 6.3170 | 0.5575 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 15 días | 6.7611 | 3.2200 | 2.5080 | 6.3860 | 0.5572 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 15 días | 7.0227 | 3.2143 | 2.5100 | 6.3250 | 0.5657 |
| <i>Z. carinata</i> | 15 días MJ | 7.9722 | 1.5333 | 2.5080 | 6.6500 | 0.5824 |
| <i>Z. carinata</i> | 15 días MJ | 8.3786 | 1.5600 | 2.5110 | 6.6600 | 0.5840 |
| <i>Z. carinata</i> | 15 días MJ | 8.3625 | 1.5833 | 2.5130 | 6.6450 | 0.5879 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 7 días | 3.2500 | 1.7000 | 2.5050 | 5.2190 | 0.3540 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 7 días | 2.6667 | 1.7333 | 2.5130 | 5.1040 | 0.3560 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 7 días | 2.8125 | 1.6500 | 2.5230 | 5.1090 | 0.3520 |
| <i>E. grandiflora</i> | 7 días MJ | 3.7000 | 0.6400 | 2.5120 | 4.7080 | 0.3120 |
| <i>E. grandiflora</i> | 7 días MJ | 3.2875 | 0.6500 | 2.5090 | 4.7200 | 0.3180 |
| <i>E. grandiflora</i> | 7 días MJ | 3.3750 | 0.7000 | 2.5210 | 4.8930 | 0.3240 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 15 días | 3.6429 | 2.2833 | 2.5090 | 5.3320 | 0.3593 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 15 días | 3.2500 | 2.3286 | 2.5080 | 5.3850 | 0.3682 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 15 días | 3.6429 | 2.2857 | 2.5170 | 5.3190 | 0.3715 |
| <i>E. grandiflora</i> | 15 días MJ | 4.2385 | 1.7600 | 2.5080 | 5.9850 | 0.4676 |
| <i>E. grandiflora</i> | 15 días MJ | 3.9143 | 1.5250 | 2.5100 | 5.9700 | 0.4534 |
| <i>E. grandiflora</i> | 15 días MJ | 4.0438 | 1.5400 | 2.5110 | 6.1050 | 0.4753 |

Tabla 2: contenido de galantamina y licorina para cada uno de los tratamientos evaluados

| Planta | Tratamiento | Galantamina (mg/ml) | Licorina (mg/ml) |
|-----------------------|-----------------|---------------------|------------------|
| <i>Z. carinata</i> | Control 7 días | 0.3752 | 0.2724 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 7 días | 0.3699 | 0.2610 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 7 días | 0.3724 | 0.2952 |
| <i>Z. carinata</i> | 7 días MJ | 0.5296 | 0.4664 |
| <i>Z. carinata</i> | 7 días MJ | 0.5173 | 0.4595 |
| <i>Z. carinata</i> | 7 días MJ | 0.5363 | 0.4608 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 15 días | 0.3971 | 0.4181 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 15 días | 0.3912 | 0.4132 |
| <i>Z. carinata</i> | Control 15 días | 0.4025 | 0.4142 |
| <i>Z. carinata</i> | 15 días MJ | 0.6520 | 0.5285 |
| <i>Z. carinata</i> | 15 días MJ | 0.6469 | 0.5333 |
| <i>Z. carinata</i> | 15 días MJ | 0.6392 | 0.5306 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 7 días | 0.2602 | 0.2451 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 7 días | 0.2688 | 0.2535 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 7 días | 0.2504 | 0.2477 |
| <i>E. grandiflora</i> | 7 días MJ | 0.6105 | 0.5212 |
| <i>E. grandiflora</i> | 7 días MJ | 0.6144 | 0.5335 |
| <i>E. grandiflora</i> | 7 días MJ | 0.6130 | 0.5141 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 15 días | 0.8580 | 0.4192 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 15 días | 0.8663 | 0.4681 |
| <i>E. grandiflora</i> | Control 15 días | 0.8932 | 0.4408 |
| <i>E. grandiflora</i> | 15 días MJ | 0.8932 | 0.6520 |
| <i>E. grandiflora</i> | 15 días MJ | 0.8796 | 0.6282 |
| <i>E. grandiflora</i> | 15 días MJ | 0.8839 | 0.6311 |