

Rev. Ciencia, Tecnología y Humanidades 7(1): 39 – 66, 2016  
 Revista de Investigación Científica  
 Vicerrectorado de Investigación  
 Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo

## Propagación clonal, inducción de callos y biotransformación de precursores en suspensiones celulares de *Piper aduncum* L.

Guillermo E. Delgado Paredes<sup>1</sup>, Consuelo Rojas Idrogo<sup>1</sup> y Massuo J. Kato<sup>2</sup>

### Resumen

*Piper aduncum* es un arbusto o arbolillo distribuido a lo largo de América en el que se han identificado numerosos compuestos biológicamente activos. Diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento fueron ensayadas para la propagación clonal, la inducción y mantenimiento de callos y el establecimiento de suspensiones celulares. Los resultados mostraron una significativa mayor elongación del brote en el tratamiento con medio de cultivo B5 suplementado con AIA 0,02 mg/L y AG3 0,02 mg/L en comparación con otros tratamientos, la inducción de callos en varios tratamientos con BAP o ANA-BAP y el establecimiento de suspensiones celulares en varias combinaciones de auxinas (AIA, ANA o 2,4-D) - citocininas (BAP o KIN). A partir de los callos formados se establecieron suspensiones celulares y estudió la acumulación de metabolitos secundarios. En ese sentido, en suspensiones celulares se examinó el efecto de L-fenilalanina, ácido ferúlico, alcohol coniferílico y eugenol, como precursores en la producción de metabolitos secundarios. La adición de 1,0 o 5,0 mg/L de estos precursores al medio de cultivo MS estimuló la biosíntesis de diversos productos naturales. Como se había asumido, los extractos del medio de cultivo en su fase estacionaria (24 días de cultivo) mostraron la más alta variedad de compuestos acumulados. La identificación de los metabolitos secundarios acumulados en las suspensiones celulares puede proporcionar importante información para la caracterización y estudio de la biosíntesis de los compuestos fenólicos.

**Palabras Clave:** L-fenilalanina, *Piper aduncum*, precursores, reguladores de crecimiento, suspensiones celulares.

### Clonal propagation, callus induction and biotransformation of precursor feeding in cellular suspension of *Piper aduncum* L.

#### Abstract

*Piper aduncum* is a shrub or small tree distributed throughout the American in which many biologically active compounds were identified. The different combinations of plant growth regulators were tested for clonal propagation, callus induction and maintained and cellular suspension established. The results showed significantly higher shoot elongation in the treatment with B5 medium supplemented with 0.02 mg/L IAA and 0.02 mg/L GA3 compared to the other treatments; callus induction in several treatments with BAP or NAA-BAP, and cellular suspension with several combinations of auxins (IAA, NAA or 2,4-D) - cytokinins (BAP or KIN). From a callus culture, cell suspension were established and their metabolite accumulation studied. In this sense, the effect of L-phenylalanine, ferulic acid, coniferyl alcohol and eugenol, as precursor feeding, on production of secondary metabolites in suspension cultures was examined. The addition of 1.0 or 5.0 mg/L of these precursor feeding to the MS culture medium stimulated the biosynthesis of several natural products. As predicted, extracts from the culture medium at the stationary phase (24 days of culture) showed the highest variety of accumulated compounds. The identification of secondary metabolites accumulated in cell suspension culture may provide important information for characterization and studying phenolic metabolites biosynthesis.

**Keywords:** Cell suspension culture, L-phenylalanine, *Piper aduncum*, plant growth regulators, precursor feeding.

<sup>1</sup> Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

guidelg2015@yahoo.es; crojasi2002@yahoo.es

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo

majokato@iq.usp.br

Recibido : 5 junio 2016

Aceptado : 2 julio 2016

## Introducción

La familia Piperaceae, junto a otras familias del orden Piperales tales como las Aristolochiaceae, Saururaceae y Lactoridaceae, es considerada una de las más primitivas, complejas y diversas entre las angiospermas basales, razón por la cual la definición del número de géneros y especies que la componen, su filogenia y modelo de diversidad floral es, en la actualidad, motivo de grandes controversias (Jaramillo y Manos 2001; Jaramillo et al. 2004). Para algunos autores la familia Piperaceae comprende 14 géneros y alrededor de 1950 especies (Mabberley 1997), ampliamente distribuidas en ambos hemisferios, integrando plantas herbáceas, arbustivas, algunas veces trepadoras y árboles; sin embargo, otros autores consideran la ocurrencia de 10 géneros y alrededor de 2000 especies (Brummitt 1992). Para Tebbs (1989) las especies americanas de Piperaceae comprenden a los géneros *Lepianthes* Raf. (*Pothomorphe* Miq.); *Peperomia* R. & P., *Piper* L., *Sarcorrhachis* Trel. y *Trianaeopiper* Trel. Para el Perú se han reportado únicamente los géneros *Peperomia*, *Piper* y *Sarcorrhachis* y 811 especies, de las cuales 528 son consideradas endémicas (Brako y Zarucchi 1993).

La química de las especies del género *Piper* se fundamenta en la

presencia de diversos metabolitos secundarios (Parmar et al. 1997; Kato y Furlan 2007), destacando significativamente la piperamida piperina, el principio activo picante de la pimienta negra (*P. nigrum*) (Parmar et al. 1997). Además de las amidas se han aislado diversos metabolitos secundarios en numerosas especies de *Piper*, destacando los fenilpropanoides (Orjala et al. 1993), lignanos y neolignanos (Benevides et al. 1999, Martins et al. 2000), amidas alifáticas y aromáticas (Silva et al. 2002), alcaloides (Parmar et al. 1998; Dodson et al. 2000), policétidos (Cheng et al. 2003), cromonas (Lago et al. 2004) y diversos compuestos de origen biosintético mixto (Parmar et al. 1997).

La importancia de estos compuestos químicos, aislados de Piperaceae, es notable; como es el caso de los lignoides (lignanos, neolignanos y sustancias relacionadas) que desde la década de los 90 se conoce su amplia diversidad de actividades biológicas: antitumorales, antifúngicas, bactericidas, anti PAF y anti VIH (Ayres y Loike 1990), así como las amidas, con potencial insecticida, moluscicida y fungicida (Dyer y Palmer 2004).

La aplicación de técnicas del cultivo de tejidos *in vitro* como la

propagación clonal, la inducción de callos friables y el establecimiento de suspensiones celulares, en especial en plantas medicinales, tiene la ventaja de producir compuestos bajo condiciones controladas puesto que las células pueden multiplicarse con relativa facilidad y producir metabolitos secundarios (Vanisree *et al.* 2004) que en algunos casos no necesariamente se biosintetizan en las plantas silvestres.

En *Piper* muy pocos estudios fueron realizados en suspensiones celulares; contándose entre estos el análisis fitoquímico en *P. aduncum* observándose la presencia de varios metabolitos secundarios e identificándose a safrol y la lignana grandisina (Delgado *et al.* 2002); asimismo, suspensiones celulares mostraron la producción de las feniletilaminas dopamina y tiramina en *P. cernuum*; mientras que en el caso de *P. crassinervium* cuatro alcaloides fueron aisladas como los mayores compuestos, incluyendo los nuevos 2,3,4-trimetoxi-N-metil-aristolactamo y 3-hidroxi-2-metoxi-N-metil-aristolactamo (Danelutte *et al.* 2005). En *P. solmsianum* también fue detectada la presencia de numerosos metabolitos secundarios, tanto en la fracción células como en la fracción medio de cultivo, en fase exponencial (15 días) como en fase estacionaria (45 días) (Balbuena *et al.* 2009) y en esta misma especie se identificaron los

metabolitos secundarios isoeleicina y grandisina (Vásquez *et al.* 2010). Recientemente, en suspensiones celulares de *P. aduncum* y *P. umbellatum* (*Pothomorphe umbellata*) se detectaron numerosos metabolitos secundarios, tanto en la fracción células como en la fracción medio de cultivo (Delgado-Paredes *et al.* 2013).

Por otro lado, en la producción de metabolitos secundarios a partir del cultivo de células y órganos se han desarrollado numerosas estrategias y métodos para mejorar la producción de biomasa (fase 1) y la acumulación de metabolitos (fase 2). Una de estas estrategias desarrolladas para la fase 2 es el suplemento de precursores al medio de cultivo (Murthy *et al.* 2014). Al respecto, en los primeros estudios realizados, la adición de loganina, triptófano y triptamina incrementó la producción de secologanina (Contin *et al.* 1999) y alcaloides indol (Moreno *et al.* 1993) en suspensiones celulares de ‘chavelita’ (*Catharanthus roseus*), mientras que el colesterol influyó en la producción de conesina en cultivos celulares de *Holarrhena antidysenterica* (Panda *et al.* 1992). Asimismo, en suspensiones celulares de *Juniperus chinensis* la incorporación de los precursores chito-oligosacáridos, chitopentosa y metil jasmonato estimularon la producción de podofilotoxina en 5, 5,2 y 1,5 veces, respectivamente, en relación

con el control (Premjet *Et al.* 2002). En suspensiones celulares de *Centella asiatica*, una especie originaria de Malasia, se suplementó cuatro precursores de la ruta biosintética de los triterpenos: escualeno, farnesil pirofosfato, isopentenil pirofosfato y leucina, destacando ampliamente escualeno 0,08 a 0,32 mg/L en la producción de ácido asiático, ácido madecásico, asiaticósido y madecasósido (Kiong *et al.* 2005). En suspensiones celulares de *Mitragyna speciosa*, una Rubiaceae nativa del sudeste asiático, se incrementó la producción de mitraginina con el suplemento de los precursores triptófano, loganina y extracto de levadura más no con ácido salicílico (Zuldin *et al.* 2013). Por otro lado, suspensiones celulares de *Mucuna pruriens* fueron suplementadas con los elicitores metil jasmonato, quitina, pectina y extracto de levadura y el precursor L-tirosina en la producción de L-Dopa (3, 4-dihidroxi-L-fenilalanina), observándose un incremento del metabolito secundario en especial con el precursor L-tirosina (Raghavendra *et al.* 2011). En suspensiones celulares de *Withania somnifera*, una Solanaceae medicinal productora de lactonas esteroideas denominadas “withanólidos” se estudió el efecto de los elicitores cloruro de cadmio, cloruro de aluminio y quitosano y los precursores

colesterol, ácido mevalónico y escualeno, observándose que la máxima producción de withanólidos se alcanzó con la combinación quitosano 100 mg/L y escualeno 6 mM (Sivanandhan *et al.* 2014) y en cultivo de callos de *Zingiber officinale* se observó que la producción de 6-gingerol fue positivamente influenciada por la adición de ácido mevalónico y extracto de levadura, mientras que la fenilalanina no ejerció efecto alguno ni en el incremento del peso del callo ni en la producción del metabolito secundario (El-Nabarawu *et al.* 2015). Pero no solamente las plantas superiores producen metabolitos secundarios sino también otras especies, como el hongo endofítico *Entrophosphora infrequens*, aislado de la corteza interna de *Nothapodytes foetida* para la producción del compuesto anticancerígeno camptotecina, con la incorporación de precursores y modificación del medio de cultivo, alcanzándose la mayor producción del metabolito con el suplemento de triptófano y leucina (Amna *et al.* 2012). Asimismo, la producción de vanilina con el suplemento de los precursores ácido ferúlico, eugenol y glucosa en cultivos de bacterias, hongos y levaduras (Gallage y Møller 2015); sin embargo, factores como la determinación de la fase del cultivo en el tiempo y la concentración del precursor deben ser investigadas al incorporarlo

en la suspensión celular (Murthy *et al.* 2014). Una amplia revisión de literatura sobre el uso de elicitores y precursores en la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares ha sido presentada por Vanisree y Tsay (2004), Vanisree *et al.* (2004), Namdeo (2007), Karuppusamy (2009) y Ling *et al.* (2011).

El objetivo del presente estudio fue estudiar el efecto de los precursores fenilalanina, ácido ferúlico, alcohol coniferílico y eugenol en la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *P. aduncum* establecidas a partir de callos provenientes de explantes de plántulas de semillas germinadas *in vitro*.

## Metodología

### Material biológico

El material biológico estuvo conformado por espigas de plantas adultas (con frutos y semillas maduros) de *Piper aduncum* L. ‘matico’ o ‘nudillo’ colectadas en el río Cumbil (Chota, Cajamarca), en la sierra del Perú, y en el Parque Estadual da Serra do Mar - Picinguaba (Ubatuba), São Paulo (Brasil). La especie fue identificada por el Dr. Guillermo E. Delgado Paredes en base a comparaciones con muestras herborizadas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque, la Universidad Nacional de Trujillo, la Universidad de São Paulo y el Instituto de Botánica de São Paulo y las descripciones realizadas por Trelease (1936) y Yuncker (1972). Una muestra fue depositada en el herbario del Instituto de Química de la Universidad de São Paulo.

### Establecimiento del cultivo *in vitro*

Las semillas fueron desinfestadas con alcohol etílico 70% por 60 segundos y

luego con hipoclorito de sodio concentrado (CLOROX® con 4,0% de cloro activo) durante 5 minutos y luego removidos con 3-5 enjuagues con agua destilada esterilizada. Las semillas desinfestadas fueron cultivadas a razón de 5-8 semillas por tubo de ensayo conteniendo el medio de cultivo conformado por las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con sacarosa 3,0% y gelificado con agar 0,6%.

### Propagación clonal e inducción de callos

Después de tres meses de germinadas las semillas, una media de 3-5 explantes (ápices caulinares y segmentos nodales) fueron cultivados en varios tratamientos con interacción de reguladores de crecimiento, en medio de cultivo MS o B5 (Gamborg *et al.* 1968) suplementado con sacarosa 3,0% y agar 0,6%, con la finalidad de obtener elongación del brote y la eventual inducción de un callo basal.



Una vez seleccionado el medio de cultivo de propagación clonal, con formulación MS suplementado con los reguladores de crecimiento ácido indol-3-acético (AIA) 0,02 mg/L y ácido giberélico (AG3) 0,02 mg/L, sacarosa 2,0% y agar 0,6%, y alcanzado las plántulas una altura de 5-8 cm, secciones de hojas, peciolo, entrenudos y raíces, de 1,0 cm de longitud, fueron cultivados en medio de cultivo de inducción de callos con formulación MS suplementado con sacarosa 2,0% y varios reguladores de crecimiento como las auxinas [2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético), AIA, ANA (ácido naftaleneacético) y DICAMBA (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico)], incorporados individualmente, o en combinaciones entre la auxina ANA y la citocinina BAP (6-benzilaminopurina). El mantenimiento de callos se realizó, por subcultivos sucesivos, en varias formulaciones de medio de cultivo MS o B5 suplementado con sacarosa 3,0%, agar 0,6% y diversos reguladores de crecimiento.

#### **Establecimiento de suspensiones celulares**

Callos semi-friables a friables, obtenidos en los experimentos sobre inducción de callos fueron cultivados en medio de cultivo MS o B5 líquido con formulación MS suplementado con sacarosa 2,0% y los mismos reguladores de crecimiento utilizados en el proceso de inducción de callos. Simultáneamente, los callos también fueron cultivados en otras formulaciones de medio de cultivo.

#### **Incorporación de precursores: fenilalanina, ácido ferúlico, alcohol coniferílico y eugenol**

La incorporación de precursores tuvo como objetivo observar semi-cuantitativamente un posible incremento en la concentración relativa de algunas sustancias presentes tanto en la fracción células como en la fracción medio de cultivo, después del suplemento de diversos sustratos fenilpropanoicos como fenilalanina, ácido ferúlico, alcohol coniferílico y eugenol.

Fueron establecidas suspensiones celulares de *P. aduncum*, provenientes de callos de hoja, con la formulación AS-6 (B5 + 2,4-D 0,5 mg/L + KIN 0,1 mg/L) en erlenmeyers de 250 mL conteniendo 15 mL de la suspensión celular y 35 mL de medio de cultivo. La suspensión celular se estableció con 2,0 g de células en peso fresco y después de alcanzada la fase estacionaria, hecho que ocurrió aproximadamente dos semanas después de la instalación, se adicionaron los precursores en las concentraciones de 1,0 y 5,0 mg/L a razón de tres erlenmeyers/tratamiento.

El tratamiento control incorporó únicamente una solución MeOH-H<sub>2</sub>O, utilizada como solvente de los sustratos. La adición de precursores en forma aséptica fue realizada por filtración a través de membranas millipore de 0,22 µm (Filter unit, Cole-Parmer Instrument Co.). La pureza de los precursores ácido coniferílico

y eugenol fue verificada a través de CLAE (cromatografía líquida de alta eficiencia) y RMN de  $^1\text{H}$  y la purificación fue realizada a través de cromatografía plana y cromatografía en columna.

Los extractos obtenidos con acetato de etilo (AcOEt), tanto de la fracción células como de la fracción medio de cultivo, fueron analizados por CLAE (cromatógrafo SHIMADZU LC-10AD) en las siguientes condiciones:

MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) → MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (30 min) → MeOH:H<sub>2</sub>O (1:0) (5 min) → MeOH:H<sub>2</sub>O (1:0) (5 min) flujo 1,0 mL/min; concentración 1,0 mg/mL; inyección 50  $\mu\text{L}$  y  $\lambda$  de detección 254 + 280 nm.

#### **Condiciones de incubación**

En todos los cultivos, a las sales minerales MS o B5 se suplementó las vitaminas m-inositol 100 mg/L y tiamina.HCl 1,0 mg/L. En el caso del establecimiento de suspensiones celulares al medio de cultivo se suplementó, además, las vitaminas piridoxina.HCl 0,5 mg/L y ácido nicotínico 0,5 mg/L, glicina 2,0 mg/L y caseína hidrolizada (CH) 250 mg/L. En la germinación de semillas y en la propagación clonal se utilizaron tubos de ensayo de 120x15 mm y 150x18 mm, respectivamente; en la inducción

y mantenimiento de callos se utilizaron frascos de vidrio de 70x45 mm y en el establecimiento de suspensiones celulares se utilizaron erlenmeyers de 250 y 500 mL. El pH de los medios de cultivo fue ajustado en  $5,8 \pm 0,1$  con KOH o HCl 0,1 N, antes de incorporar el agar, en el caso de los medios de cultivo gelificados. La esterilización se realizó en autoclave a 15 lbs/pulg<sup>2</sup> de presión y temperatura de 121 oC durante 20-25 minutos. Las condiciones ambientales de incubación fueron las siguientes: temperatura 24-26 oC, irradiancia de 1-2 W.m<sup>-2</sup>, para la germinación de semillas y la inducción y mantenimiento de callos y 8-10 W.m<sup>-2</sup>, para la propagación clonal y el establecimiento de suspensiones celulares y la humedad relativa 80-90%. Las suspensiones celulares se mantuvieron en agitación rotatoria permanente a 80-100 rpm.

#### **Evaluación de resultados**

La evaluación de resultados se realizó después de 45 días de cultivo con excepción de las suspensiones celulares que se evaluaron después de 24 días de establecidas. Los resultados fueron expresados cualitativamente en base a una escala empírica elaborada para la formación de brotes y raíces y la inducción y mantenimiento de callos.

## Resultados y Discusión

### Germinación de semillas y cultivo de tejidos

La germinación de semillas fue 30% cuando se sembraron hasta 15 días después de colectadas, bajando la tasa de germinación conforme transcurría el tiempo hasta alcanzar 0%, después de 12 meses. Estos datos están en relación con lo reportado por Delgado-Paredes et al. (2012) quienes señalaron que a 7 meses de colectadas las semillas únicamente germinaron en una tasa de 9,6%. Es posible que esta variación así como otras observadas en varias especies de *Piper* (Delgado-Paredes et al. 2012) esté relacionada con aspectos ecológicos como temperatura, régimen de lluvias, actividad de los polinizadores, entre otros factores, que determinan la mayor o menor tasa de fertilización del embrión zigótico.

La propagación clonal, a partir de ápices caulinares y segmentos nodales provenientes de plántulas de semillas germinadas *in vitro*, se observó únicamente en los medios de cultivo que incorporaron AIA 0,02 mg/L - AG3 0,02 mg/L y ANA 0,02 mg/L - AG3 0,02 mg/L, aunque en el medio de cultivo con AIA-AG3 se alcanzó un desarrollo armónico del sistema radicular por lo que fue escogido para el procesos de propagación clonal (Tabla 1, figura 1).

En otros tratamientos ensayados no se observó elongación del brote pero sí la inducción del callo en la base del explante aunque mayormente de naturaleza dura y compacta. Estos resultados están en relación con los obtenidos en otras especies de *Piper* como *P. aduncum*, *P. cernuum*, *P. regnellii* y *P. solmsianum* (Delgado-Paredes et al. 2012) y *P. solmsianum* (Vásquez et al. 2010). A diferencia de otros estudios donde se utilizaron dos fases en el crecimiento de los explantes que conllevó a la utilización de dos medios de cultivo, elongación y enraizamiento, tal como fue reportado para *P. longum* (Bhat et al. 1995) y *P. nigrum* (Hussain et al. 2011), en nuestro estudio la elongación y enraizamiento del brote se alcanzó simultáneamente en un único medio de cultivo. Por otro lado, en el tratamiento suplementado únicamente con sacarosa 4,0%, sin ningún regulador de crecimiento, no se observó elongación del brote aunque Balbuena et al. (2009) reportaron para *P. solmsianum* crecimiento óptimo del brote en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, lo que estaría indicando la ocurrencia de un significativo efecto varietal.

La inducción de callos se observó en varios explantes, pobremente cuando se incorporó auxinas únicamente (Tabla



2) y de mayor tamaño en diversas combinaciones de auxinas-citocininas (ANA-BAP) o citocininas únicamente (BAP) (Tabla 3, figura 2), separándose las regiones de naturaleza friable; estos callos fueron mantenidos por subcultivos sucesivos en medios de cultivo de similar formulación (Tabla 4). En especies del género *Piper* la inducción de callos friables fue reportada por primera vez en segmentos nodales de *P. longum* en varias combinaciones de ANA - BAP (Bhat *et al.* 1992) así como en entrenudos de *P. nigrum* en tratamientos con BA o KIN (Bhat *et al.* 1995), en peciolo de *P. solmsianum* en varias combinaciones de 2,4-D - BAP (Balbuena *et al.* 2009) y recientemente en varias auxinas y combinaciones de auxinas-citocininas en peciolo y hojas de *P. regnellii* y *P. solmsianum* (Delgado-Paredes *et al.* 2013). Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos en nuestro trabajo lo que demostró que varios explantes de *P. aduncum* son competentes para la inducción de callos y principalmente en combinaciones de auxinas-citocininas.

En lo referente a suspensiones celulares, estas fueron establecidas en numerosas formulaciones de medio de cultivo incorporando auxinas-citocininas (Tabla 5). Estas suspensiones celulares alcanzaron la fase estacionaria

a los 24 días tal como fue reportado para *P. aduncum* (Delgado *et al.* 2002) y numerosas especies de *Piper* como *P. aduncum*, *P. cernuum*, *P. crassinervium*, *P. regnellii*, *P. solmsianum* y *P. umbellatum* (Delgado-Paredes *et al.*, 2013); sin embargo, en *P. solmsianum* fue reportada una fase estacionaria prolongada hasta los 42 días (Balbuena *et al.* 2009) lo que puede atribuirse a que el medio de cultivo no fue suplementado con aditivos orgánicos complejos como la caseína hidrolizada (Delgado-Paredes *et al.* 2013).

#### **Biotransformación de precursores**

Los cromatogramas CLAE expresan los resultados de la incorporación de los precursores fenilalanina, ácido ferúlico, alcohol coniferílico y eugenol, en suspensiones celulares con el medio de cultivo AS-6, para las fracciones células y medio de cultivo, en la condición de  $\lambda$  254 y  $\lambda$  280 nm.

La L-fenilalanina es un aminoácido aromático precursor de importantes metabolitos secundarios como L-dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina), norepinefrina y epinefrina, durante el proceso que conlleva a la formación de tirosina; asimismo, forma parte de la estructura de neuropéptidos

como vasopresina, somatostatina, melanotropina, encefalina, entre otros. El suplemento de L-fenilalanina, con detección de  $\lambda$  254 nm (Figuras 3A y B), para la fracción células, cuando se incorporó 1,0 mg/L, se observó la ocurrencia de un pequeño pico que correspondió a una sustancia con tR  $\approx$  21 min y un pico grande que correspondió a una sustancia con tR  $\approx$  32 min, mientras que cuando se incorporó 5,0 mg/L el pico pequeño prácticamente desapareció en tanto que el pico grande mostró una inferior intensidad relativa (Figura 3A). En lo referente a la fracción medio de cultivo, cuando se incorporó 1,0 mg/L se formaron dos picos con tR  $\approx$  13 min y 18 min en tanto que cuando se incorporó 5,0 mg/L se formaron tres picos con tR  $\approx$  13 min, 15 min y 18 min (Figura 3B). Con detección de  $\lambda$  280 nm (Figuras 4A y B), para la fracción células, cuando se incorporó fenilalanina 1,0 y 5,0 mg/L, se observó la formación de picos de manera similar a lo mostrado en la figura 1A (Figura 4A); sin embargo, para la fracción medio de cultivo solamente cuando se incorporó 5,0 mg/L se observó la formación de un pequeño pico con tR  $\approx$  16 min (Figura 4B). En general, cuando se suplementó el precursor L-fenilalanina se observó una mayor formación de picos en la condición  $\lambda$  254 nm respecto a la condición  $\lambda$  280 nm, cuando se incorporó 1,0 mg/L

respecto a 5,0 mg/L y ligeramente en la fracción células respecto a la fracción medio de cultivo.

Varios estudios han destacado el rol de la fenilalanina como precursor de importantes metabolitos secundarios señalando entre estos que la adición de fenilalanina en suspensiones celulares de *Salvia officinalis* estimuló la producción de ácido rosmarínico (Ellis y Tower 1970) y mejoró la acumulación de paclitaxel (taxol) en *Taxus cuspidata* (Fett-Neto et al. 1994; Fett-Neto y DiCosmo 1996). En suspensiones celulares de *Juniperus chinensis* la adición de fenilalanina incrementó la producción de podofilotoxina en 2,6 veces comparado con el control (Premjet et al. 2002). Asimismo, en suspensiones celulares de *Psoralea corylifolia* el suplemento de fenilalanina 0,5 mM conllevó a incrementar la producción de las isoflavonas daidzeina y genisteina (Shinde et al. 2009). Por otro lado, en cultivos celulares de *Larrea divaricata* el suplemento de L-fenilalanina 0,5 mM resultó en un incremento del ácido nordihidroguaiarético (NDGA) en 2,2 veces respecto al control (Palacio et al. 2011). En suspensiones celulares de *Arnebia euchroma*, una Boraginaceae originaria de los Himalaya, se suplementó L-fenilalanina con la finalidad de incrementar la producción

de la naftoquinona shikonina y sus derivados acetilshikonina (ACS) e isobutirilshikonina (IBS); sin embargo, la incorporación del precursor en las concentraciones de 0,01 o 0,1 mM únicamente incrementó la producción de biomasa celular pero en ningún caso se incrementó los metabolitos secundarios indicados (Sykłowska-Baranek et al. 2012). Como se conoce, la fenilalanina es un compuesto clave en la ruta de los fenilpropanoides y es convertida por la enzima PAL a ácido trans-cinnámico, precursor del ácido hidroxibenzoico; este compuesto, al acoplarse con geranil pirofosfato (derivado de la ruta del mevalonato) por la enzima hidroxibenzoato-*m*-geraniltransferasa, conduce a la biosíntesis de shikoninas; sin embargo, no siempre el suplemento de fenilalanina ha resultado positivo puesto que en cultivo de callos de *Zingiber officinale* no estimuló ni el incremento celular ni la producción de 6-gingerol (El-Nabarawy et al. 2015). Recientemente, en cultivo de callos de *Verbascum thapsus*, una Scrophulariaceae medicinal, el suplemento de triptófano 150 mg/L incrementó la producción de timol en 390%, en comparación con la planta madre (Al-Jobouri et al. 2016).

El ácido ferúlico es un importante componente biológico y estructural de

la pared celular de las plantas y puede encontrarse libre, como homodímeros, o esterificado con proteínas o polisacáridos en la pared celular; es un precursor del alcohol coniferílico, el cual provee uno de los monómeros para la biosíntesis de la lignina. Asimismo, en cereales el ácido ferúlico es esterificado con arabinosa, glucosa, xilosa o galactosa, integradas como parte de la pectina o la fracción hemicelulósica de la pared celular (Harris y Trethewey 2010). El suplemento de ácido ferúlico, con detección de  $\lambda$  254 nm (Figuras 5A y B), para la fracción células, solamente cuando se incorporó 5,0 mg/L, se observó la ocurrencia de un pequeño pico que correspondió a una sustancia con tR  $\approx$  12 min (Figura 5A). En lo referente a la fracción medio de cultivo, cuando se incorporó 1,0 mg/L se formaron dos picos grandes con tR  $\approx$  13 min y 15 min y un pico pequeño con tR  $\approx$  18 min en tanto que cuando se incorporó 5,0 mg/L se formaron tres picos pequeños con tR  $\approx$  13 min, 17 min y 18 min (Figura 5B). Con detección de  $\lambda$  280 nm (Figuras 6A y B), para la fracción células, cuando se incorporó 1,0 y 5,0 mg/L, solamente se observó la formación de un pico pequeño con tR  $\approx$  12 min (Figura 6A); sin embargo, para la fracción medio de cultivo cuando se incorporó 1,0 mg/L se observó la formación de un pico grande con tR  $\approx$  13 min y un pico pequeño

con  $tR \approx 15$  min, en tanto que cuando se incorporó 5,0 mg/L se formaron dos picos pequeños con  $tR \approx 13$  min y  $tR \approx 17$  min (Figura 6B). En general, cuando se suplementó el precursor ácido ferúlico se observó una mayor formación de picos en la condición  $\lambda$  280 nm respecto a la condición  $\lambda$  254 nm, cuando se incorporó 1,0 mg/L respecto a 5,0 mg/L y en la fracción medio de cultivo respecto a la fracción células.

El suplemento de ácido ferúlico, en cultivos celulares de *Vanilla planifolia*, resultó en un incremento de vanilina (Romagnoli y Knorr 1988), en tanto que en suspensiones celulares de *Capsicum annuum* cv. P1482 se observó la biotransformación de una porción de ácido ferúlico en los fenilpropanoides vanilina, el mayor saborizante, y capsaicina, el principal metabolito secundario característico de las especies de *Capsicum*; la concentración de vanilina fue relativamente más alta que los niveles de capsaicina cuando se suplementó ácido ferúlico 0,6 mM (Kang et al. 2005).

El alcohol coniferílico es un monolignol que se sintetiza a través de la vía bioquímica de los fenilpropanoides que cuando polimeriza con compuestos

aromáticos relacionados, forma lignina o lignanos; es un intermediario en la biosíntesis del eugenol, estilbenoides y cumarinas. El suplemento de alcohol coniferílico, con detección de  $\lambda$  254 nm (Figuras 7A y B), para la fracción células, no posibilitó la formación de picos cuando se incorporó 1,0 y 5,0 mg/L (Figura 7A), aunque en la fracción medio de cultivo, cuando se incorporó 1,0 mg/L predominaron dos picos de intensidad moderada con  $tR \approx 13$  min y  $tR \approx 18$  min; cuando se incorporó 5,0 mg/L se formaron los mismos picos pero con una intensidad ligeramente mayor (Figura 7B). Con detección de  $\lambda$  280 nm (Figuras 8A y B), para la fracción células, cuando se incorporó 1,0 y 5,0 mg/L, solamente se observó la formación de un pico de moderada y menor intensidad con  $tR \approx 11$  min y  $tR \approx 21$  min, respectivamente (Figura 8A) mientras que en la fracción medio de cultivo, tanto cuando se incorporó 1,0 mg/L como 5,0 mg/L, se observó la ocurrencia de un pico de moderada intensidad con  $tR \approx 13$  min (Figura 8B). En general, cuando se suplementó el precursor alcohol coniferílico se observó una similar formación de picos tanto en la condición  $\lambda$  280 nm como en la condición  $\lambda$  254 nm y del mismo modo cuando se incorporó 1,0 mg/L y 5,0 mg/L así como en las fracciones células y medio de cultivo.

En suspensiones celulares de *Juniperus chinensis* la adición de alcohol coniferílico incrementó en 6 veces la producción de podofilotoxina en comparación con el control (Premjet *et al.* 2002). El alcohol coniferílico ha sido también utilizado como precursor en la biosíntesis del flavonolignano silimarino en suspensiones celulares de *Silybum marianum*, observándose un incremento significativo del metabolito secundario después de 72 h del suplemento de alcohol coniferílico 46  $\mu$ M (Tumova *et al.*, 2006). Asimismo, el complejo alcohol coniferílico  $\beta$ -ciclodextrina fue utilizado como precursor en la acumulación de podofilotoxina en suspensiones celulares de *Podophyllum hexandrum* (Uden *et al.* 1989).

Referente a eugenol, con detección de  $\lambda$  254 nm (Figuras 9A y B), para la fracción células, se observó la formación de varios picos pequeños cuando se incorporó 1,0 y 5,0 mg/L (Figura 9A), aunque en la fracción medio de cultivo, cuando se incorporó 1,0 y 5,0 mg/L se observó la formación de dos picos de moderada intensidad con  $tR \approx 13$  min y  $tR \approx 18$  min (Figura 9B). Con detección de  $\lambda$  280 nm (Figuras 10A y B), para la fracción células, cuando se incorporó 1,0 mg/L se observó la formación de dos picos de

moderada intensidad con  $tR \approx 11$  min y  $tR \approx 14$  min y un pico pequeño con  $tR \approx 21$  min; cuando se incorporó 5,0 mg/L se observó la formación de los mismos picos pero con mayor intensidad (Figura 10A) mientras que en la fracción medio de cultivo, tanto cuando se incorporó 1,0 mg/L como 5,0 mg/L, se formaron dos picos de moderada a alta intensidad con  $tR \approx 10$  min y  $tR \approx 13$  min (Figura 10B). En general, cuando se suplementó el precursor eugenol se observó una mayor formación de picos y de mayor intensidad en la condición  $\lambda$  280 nm respecto a la condición  $\lambda$  254 nm, cuando se incorporó 5,0 mg/L respecto a 1,0 mg/L y en la fracción medio de cultivo respecto a la fracción células.

Eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil)-fenol) es el principal componente del aceite de clavo y es preparado del 'árbol del clavo' *Syzygium aromaticum* y actualmente es aislado en gran escala (Bauer *et al.* 2008); este precursor, en la vía de degradación utilizando *Pseudomonas*, conlleva a la producción de vanilina, ácido vanílico y ácido protocatechuico (Gallage y Møller 2015). Asimismo, una ruta propuesta para la síntesis de eugenol e isoeugenol es a partir de fenilalanina, teniendo como intermediario al alcohol coniferílico en la síntesis de lignina y lignanos (Koeduka *et al.* 2006)



## Conclusiones

La propagación clonal a partir de ápices caulinares y segmentos nodales, obtenidos de plántulas de semillas germinadas *in vitro*, se observó en medio de cultivo suplementado con AIA 0,02 mg/L y AG3 0,02 mg/L. La inducción y mantenimiento de callos se observó en varios explantes, mayormente en medio de cultivo suplementado con la citocinina BAP o la combinación auxina (ANA)-citocinina (BAP), en tanto que el establecimiento de suspensiones celulares se alcanzó en varias formulaciones de medio de cultivo suplementado con varias combinaciones de auxinas-citocininas.

El suplemento de los precursores fenilpropanoides: L-fenilalanina, ácido ferúlico, alcohol coniferílico y eugenol, en las concentraciones de 1,0 y 5,0 mg/L, en medio de cultivo B5 suplementado con 2,4-D 0,5 mg/L y KIN 0,1 mg/L, permitió observar la biosíntesis de varios metabolitos secundarios, tanto en la fracción células como en la fracción medio de cultivo, con detección de  $\lambda$  254 y  $\lambda$  280 nm, lo que abre posibilidades de biosintetizar en gran escala metabolitos secundarios de significativa importancia comercial.

## Referencias Bibliográficas

- Al-Jibouri, A.M.J., Abedi, A.S., Ali, A-J.A. & Majeed, D.M. 2016. Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. *American Journal of Plant Sciences* 7:84-91.
- Amna, T., Amina, M., Sharma, P.R., Puri, S.C., Al-Youssef, H.M., Al-Taweel, A.M. & Qazi, G.N. 2012. Effect of precursors feeding and media manipulation on production of novel anticancer pro-drug camptothecin from endophytic fungus. *Brazilian Journal of Microbiology* 43:1476-1490.
- Ayres, D.C. & Loike, J.D. 1990. Lignans-chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press. 424 p.
- Balbuena, T., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Kato, M.J. & Floh, E.I.S. 2009. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). *Acta Botánica Brasileira* 23:274-281.
- Bauer, K., Garbe, D. & Surburg, H. 2008. Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses (Weinheim: John Wiley).
- Benevides, P.J.C., Sartorelli, P. & Kato, M.J. 1999. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. *Phytochemistry* 52:339-343.

- Bhat, S.R., Kackar, A., Chandel, K.P.S. 1992. Plant regeneration from callus cultures of *Piper longum* L. by organogenesis. *Plant Cell Reports* 11:523-528.
- Bhat, S.R., Chandrel, K.P.S., Malik, S.K. 1995. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper species*. *Plant Cell Reports* 14:398-402.
- Brako, L. & Zarucchi, J.L. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA.
- Brummitt, R.K. 1992. Vascular Plant Families and Genera. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Cheng, M.J., Lee, S.J., Chang, Y.Y., Wu, S.H., Tsai, I.L., Jayaprakasam, B. & Chen, Y.Y. 2003. Chemical and cytotoxic constituents from *Peperomia sui*. *Phytochemistry* 63:603-608.
- Contin, A., van der Heijden, R. & Verpoorte, R. 1999. Effects of alkaloid precursor feeding and elicitation on the accumulation of secologanin in a *Catharanthus roseus* cell suspensions culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56:111-119.
- Danelutte, A.P., Costantin, M.B., Delgado, G.E., Braz-Filho, R. & Kato, M.J. 2005. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16:1425-1430.
- Delgado, G.E., Rojas, C., Nunomura, S.M. & Kato, M.J. 2002. Análisis fitoquímico en suspensiones celulares de *Piper aduncum* L. (“matico”). *Avance en Ciencia & Tecnología (UNPRG, Lambayeque, Perú)* 3:15-26.
- Delgado-Paredes, G.E., Kato, M.J., Vásquez-Dueñas, N., Minchala-Patiño, J. & Rojas-Idrogo, C. 2012. Cultivo de tejidos de *Piper* sp. (Piperaceae): Propagación, organogénesis y conservación de germoplasma in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología* 14:49-60.
- Delgado-Paredes, G.E., Kato, M.J. & Rojas-Idrogo, C. 2013. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12:269-282.
- Dodson, C.D., Dyer, L.A., Searcy, J., Wright, Z. & Letourneau, D.K. 2000. Cenocladime a dihydropyridone alkaloid from *Piper cenocladum*. *Phytochemistry* 53:51-54.
- Dyer, L.A. & Palmer, A.D.N. 2004. *Piper*: A model for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 214 pp.
- El-Nabarawy, M.A., El-Kafafi, S.H., Hamza, M.A. & Omar, M.A.

2015. The effect of some factor son stimulating the growth and production of active substances in *Zingiber officinale* callus cultures. *Annals of Agricultural Science* 60:1-9.
- Ellis, B.E. & Towers, G.H.N. 1970. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Journal of Biochemistry* 118:291-297.
- Fett-Neto, A.G. & DiCosmo, F. 1996. Production of paclitaxel and related toxoids in cell cultures of *Taxus cuspidata*: perspectives for industrial applications. In: DiCosmo, F. & Misawa, M. (eds.). *Plant Cell Culture: Secondary Metabolism toward Industrial Application*. CRC Press, New York. pp. 139-166.
- Fett-Neto, A.G., Stewart, J.M., Nicholson, S.A., Pennington, J.J. & DiCosmo, F. 1994. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *T. cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering* 44:967-971.
- Gallage, N.J. & Møller, B.L. 2015. Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Molecular Plant* 8:40-57.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. & Ojima, K. 1968. Nutrient requeriments of suspension cultures of soybean roots cell. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Harris, P.J. & Trethewey, J.A.K. 2010. The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochemistry Reviews* 9:19-33.
- Hussain, A., Naz, S., Nazir, H. & Khan, Z. 2011. Tissue culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 43:1069-1078.
- Jaramillo, M.A. & Manos, P.S. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* 88:706-716.
- Jaramillo, M.A., Manos, P.S. & Zimmer, E.A. 2004. Phylogenetic relationships of the periantless Piperales reconstructing the evolution of floral development. *International Journal of Plant Science*. 165:403-416.
- Kang, S-M., Jung, H-Y., Kang, Y-M. & Choi, M-S. 2005. Biotransformation and impact of ferulic acid on phenylpropanoid and capsaicin levels in *Capsicum annuum* L. cv. P1428 cell suspension cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:3449-3453.
- Karuppusamy, S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1222-1239.
- Kato, M.J. & Furlan, M. 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure*

- and Applied Chemistry 79:529-538.
- Kiong, A.L.P., Mahmood, M., Fadzillah, N.M. & Daud, S.K. 2005. Effects of precursor supplementation on the production of triterpenes by *Centella asiatica* callus culture. Pakistan Journal of Biological Sciences 8:1160-1169.
- Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D.R., Vassão, D.G., Jackson, B.L., Kish, C.M., Orlova, I., Spassova, S.M., Lewis, N.G., Noel, J.P., Baiga, T.J., Dudareva, N. & Pichersky, E. 2006. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. PNAS 103:10128-10133.
- Lago, J.H.G., Ramos, C.S., Casanova, D.C.C., Morandim, A.A., Bergamo, D.C.B., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Furlan, M., Guimaraes, E.F., Young, M.C.M. & Kato, M.J. 2004. Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. Journal of Natural Products 67:1783-1788.
- Ling, A.P.K., Ong, S.L. & Sobri, H. 2011. Strategies in enhancing secondary metabolites production in plant cell cultures. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology 5:94-101.
- Martins, R.C.C., La Torre, L.R., Sartorelli, P. & Kato, M.J. 2000. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. Phytochemistry 55:843-846.
- Mebberley, D.J. 1997. The Plant Book. A Portable Dictionary of the Higher Plants. New York, USA: Cambridge University Press.
- Moreno, P.R.H., van der Heijden, R. & Verpoorte R. 1993. Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspensions cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports 12:702-705.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologie Plantarum 15:473-497.
- Murthy, H.N., Lee, E-J. & Paek, K-Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118:1-16.
- Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy Reviews 1:69-79.
- Orjala, J., Erdelmeier, C.A.J., Wright, A.D., Rali, T. & Sticher, O. 1993. Five nem prenylated *p*-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. Planta Medica 59:813-818.
- Palacio, L., Cantero, J.J., Cusido, R. &

- Goleniowski, M. 2011. Phenolic compound production by *Larrea divaricata* Cav. plant cell cultures and effect of precursor feeding. *Process Biochemistry* 46:418-422.
- Panda, A.K., Bisaria, V.S. & Mishra, S. 1992. Alkaloid production by plant cell cultures of *Holarrhena antidysenterica*: II Effect of precursor feeding and cultivation in stirred bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 39:1052-1057.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. & Boll, P.M. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46:597-673.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Gupta, S., Talwar, S., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Azim, A., Malhotra, S., Kumar, N., Jain, R., Sharma, N.K., Tyagi, O.D., Lawrie, S.J., Errington, W., Howarth, O.W., Olsen, C.E., Singh, S.K. & Wengel, J. 1998. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. *Phytochemistry* 49:1069-1078.
- Premjet, D.P., Itoh, K. & Tachibana, S. 2002. Enhancement of podophyllotoxin production by biogenetic precursors and elicitors in cell suspension cultures of *Juniperus chinensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 5:1267-1271.
- Raghavendra, S., Ramesh, C.K., Kumar, V. & Khan, M.H.M. 2011. Elicitors and precursor induced effect on L-Dopa production in suspension cultures of *Mucuna pruriens* L. *Frontiers in Life Science* 5:127-133.
- Romagnoli, L.G. & Knorr, D. 1988. Effects of ferulic acid treatment on growth and flavour development of cultured *Vanilla planifolia* cells. *Food Biotechnology*. 2:93-104.
- Shinde, A.N., Malpathak, N. & Fulzele, D.P. 2009. Optimized production of isoflavones in cell cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14:612-618.
- Silva, R.V., Navickiene, H.M.D., Kato, M.J., Bolzani, V., Méda, C.I., Young, M.C.M & Furlan, M. 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 59:521-527.
- Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A. & Manickavasagam. M. 2014. Enhanced of biosynthesis of withanolides by elicitation and precursor feeding in cell suspension culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal in shake-flask culture and bioreactor. *PLoS ONE* 9(8): e104005.
- Syklowska-Baranek, K., Pietrosiuk, A., Naliwajski, M.R., Kawiak, A., Jeziorek, M., Wyderska, S., Łojkowska, E. & Chinou, I. 2012. Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia*



- euchroma* (Royle) Johnst. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 48:555-564.
- Tebbs, M.C. 1993. Revision of Piper (Piperaceae) in the New World. 2, The taxonomy of *Piper* section *Lepianthes* and *Radula*. Bulletin of the Natural History Museum 23:1-50.
- Tumova, L., Rimakova, J., Tuma, J. & Dusck, J. 2006. *Silybum marianum* in vitro – flavolignan production. Plant, Cell & Environment 52:454-458.
- Trelease, W. 1936. Piperaceae. In: Flora of Peru (MacBride, J.F., ed.). Field Museum of Natural History, Chicago, USA.
- Uden, W. van., Pras, N., Visser, J.F. & Malingre, T.M. 1989. Detection and identification of podophyllotoxin produced by cell cultures derived from *Podophyllum hexandrum* Royle. Plant Cell Reports 8:165-168.
- Vanisree, M. & Tsay, H-S. 2004. Plant cell cultures – an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2:29-48.
- Vanisree, M., Lee, C.Y., Lo, S.F., Nalawade, S.M., Lin, C.F. & Tsay, H.S. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue culture. Botanical Bulletin - Academia Sinica 45:1-22.
- Vásquez, N., Kato, M.J., Rojas, C., Malquichagua, K. & Delgado, G. 2010. Tissue culture and production of secondary metabolites from micropropagated plants of *Piper solmsianum*. Ciencia, Tecnología y Humanidades. UNPRG, Lambayeque (Perú) 1:15-21.
- Yuncker, T.G. 1972. The Piperaceae of Brazil. Hoehnea 2:19-366.
- Zuldin, N.N.M., Said, I.M, Noor, N.M., Zainal, Z., Kiat, C.J. & Ismail, I. 2013. Induction and analysis of the alkaloid mitragynine content of a *Mitragyna speciosa* suspension culture system upon elicitation and precursor feeding. The Scientific World Journal. Volume 2013, Article ID 209434, 11 pages

## ANEXO

**Tabla. 1.**

*Propagación clonal por cultivo de ápices caulinares y segmentos nodales de plantas in vitro de Piper aduncum<sup>a,b</sup>.*

Tratamientos (mg/L) <sup>c</sup>	Respuestas morfológicas		
	Brotos <sup>d</sup>	Raíces <sup>e</sup>	Callos <sup>f</sup>
MS + ANA 0,02 + AG3 0,02 + BAP 0,05	-	-	+++
MS + ANA 0,01 + AG3 0,01 + PP 12,5	-	+	-
MS + sacarosa 4,0%	-	-	-
MS + BAP 0,5	-	-	++
MS + BAP 1,0	-	-	++
MS + BAP 2,0	-	-	+++
MS + ANA 0,01 + BAP 1,0 + PP 12,5	-	-	++
MS + ANA 0,01 + BAP 0,5 + PP 12,5	-	-	++
B5 + AIA 0,02 + AG3 0,02	+++	+++	-
B5 + ANA 0,02 + AG3 0,02	++	++	-

<sup>a</sup> Evaluación después de 45 días de cultivo

<sup>b</sup> Resultado de 10 explantes/tratamiento

<sup>c</sup> MS y B5 suplementados con vitaminas, sacarosa 3,0% y PP, Plant Prod (NPK)

<sup>d</sup> Brote; -, sin elongación; +, elongación no mayor de 1,0 cm; +++, elongación mayor de 3,0 cm.

<sup>e</sup> Raíz; -, sin formación; +, 1-2 raíces pequeñas (< 1,0 cm) o raíces numerosas pequeñas; ++, 1-2 raíces (1,0-2,0 cm); +++, 3-5 raíces (> 2,0 cm).

<sup>f</sup> Callo; -, sin formación; +, callo pequeño; ++, callo cubre parcialmente el explante; +++, callo cubre totalmente el explante.

**Tabla. 2.**

*Inducción de callos y formación de raíces de P. aduncum en medio de cultivo con auxinas<sup>a,b</sup>.*

Reguladores de crecimiento <sup>c</sup> (mg/L)				Respuestas morfológicas <sup>d</sup>		
2,4-D	ANA	AIA	DICAMBA	Hoja	Peciolo	Raíz
0,2				+	+	-
2,0				-	-	-
	0,2			-/r	-	-
	2,0			+/r	-	+++
		0,2		-/r	-	-/r
		2,0		-/r	-	-/r
			0,05	+	+++/r	
			0,5	+	-	

<sup>a</sup> Evaluación después de 45 días de cultivo

<sup>b</sup> Resultado de 10 explantes/tratamiento

<sup>c</sup> MS suplementado con vitaminas y sacarosa 3,0%

<sup>d</sup> -, sin formación de callo; +, callo pequeño; ++, callo cubre parcialmente el explante; +++, callo cubre totalmente el explante; r, formación de raíces.

**Tabla. 3.**

*Inducción de callos de P. aduncum en medio de cultivo con citocininas y auxinas-citocininas<sup>a,b</sup>.*

Reguladores de crecimiento <sup>c</sup> (mg/L)				Respuestas morfológicas <sup>d</sup>		
ANA	BAP	Hoja	Pecíolo	Entrenudo	Nudo	Raíz
0,5	0,2				+++	
1,0	0,2	+	++		+++	
	0,5	+++		++		+++
	1,0			+++		
	2,0			+++		
0,01	0,5					+++
0,01	1,0					+++

<sup>a</sup>Evaluación después de 45 días de cultivo

<sup>b</sup>Resultado de 10 explantes/tratamiento

<sup>c</sup>MS suplementado con vitaminas y sacarosa 3,0%

<sup>d</sup>-, sin formación de callo; +, callo pequeño; ++, callo cubre parcialmente el explante; +++, callo cubre totalmente el explante.

**Tabla. 4.**

*Mantenimiento de callos de P. aduncum en varias formulaciones de medio de cultivo<sup>a,b</sup>.*

Medio de cultivo <sup>c</sup> (mg/L)	Respuesta del callo <sup>d</sup>
B5 + ANA 1,0 + BAP 0,2	+
MS + ANA 2,0	+
MS + 2,4-D 0,2 + AG3 0,5	+
MS + AIA 0,5 + BAP 2,0	-
B5 + ANA 0,01 + BAP 1,0	-
B5 + BAP 0,1	-
MS + DICAMBA 1,0	-
B5 + BAP 0,5	-
B5 + DICAMBA 0,5	+
B5 + TDZ 0,5	-

<sup>a</sup> Evaluación después de 45 días de cultivo

<sup>b</sup> Resultado de 10 repeticiones/tratamiento

<sup>c</sup> MS y B5 suplementados con vitaminas, y sacarosa 3,0% .

<sup>d</sup>+,mantenimiento positivo del callo; -, mantenimiento negativo del callo.

**Tabla. 5.**

*Eantenimiento desuspensiones celulares de P. aduncum en varias formulaciones de medio de cultivo<sup>a,b</sup>.*

Medio de cultivo <sup>c</sup> (mg/L)	Respuesta del callo <sup>c</sup>
B5 + ANA 0,5 + BAP 0,1	+++
B5 + AIA 0,5 + BAP 0,1	++
B5 + 2,4-D 0,5 + BAP 0,1	++
B5 + ANA 0,5 + KIN 0,1	+
B5 + AIA 0,5 + KIN 0,1	++
B5 + 2,4-D 0,5 + KIN 0,1 (AS-6)	+++
<sup>d</sup> MS + 2,4-D 0,2 + AG <sub>3</sub> 0,5	+++
<sup>d</sup> B5 + ANA 0,1 + BAP 1,0	+++ <sup>f</sup>
B5 + 2,4-D 0,2 + BAP 0,5	+++
MS + BAP 0,5	++
B5 + DICAMBA 0,05	+++
B5 + ANA 1,0 + BAP 0,2	+++

<sup>a</sup> Evaluación 24 días después del cultivo

<sup>b</sup> Resultado de 5 repeticiones/tratamiento

<sup>c</sup> MS o B5 suplementado con vitaminas y sacarosa 3,0%

<sup>d</sup> Además: piridoxina.HCl 0,5 mg/L, ácido nicotínico 0,5 mg/L, glicina 2,0 mg/L y caseína hidrolizada 250 mg/L

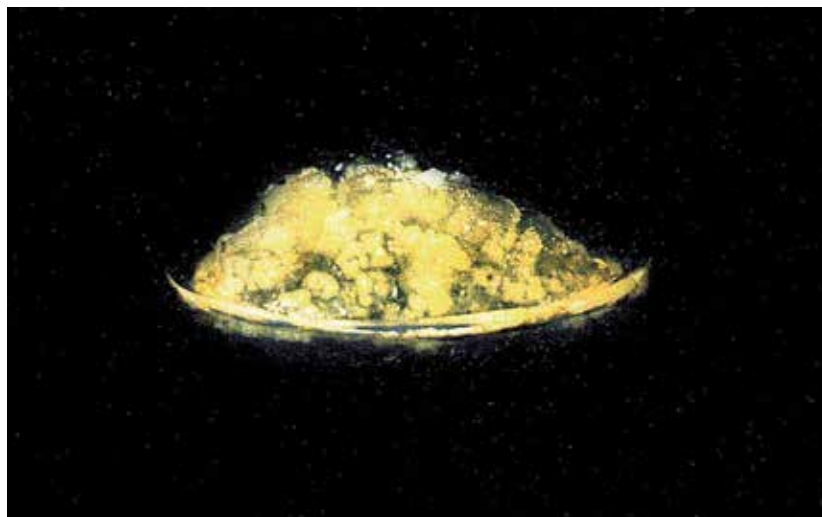
<sup>e</sup>-, sin desarrollo celular; +, pobre desarrollo celular; ++, moderado desarrollo celular; +++, óptimo desarrollo radicular

<sup>f</sup> formación de teratomas (estructuras semejantes a raíces)

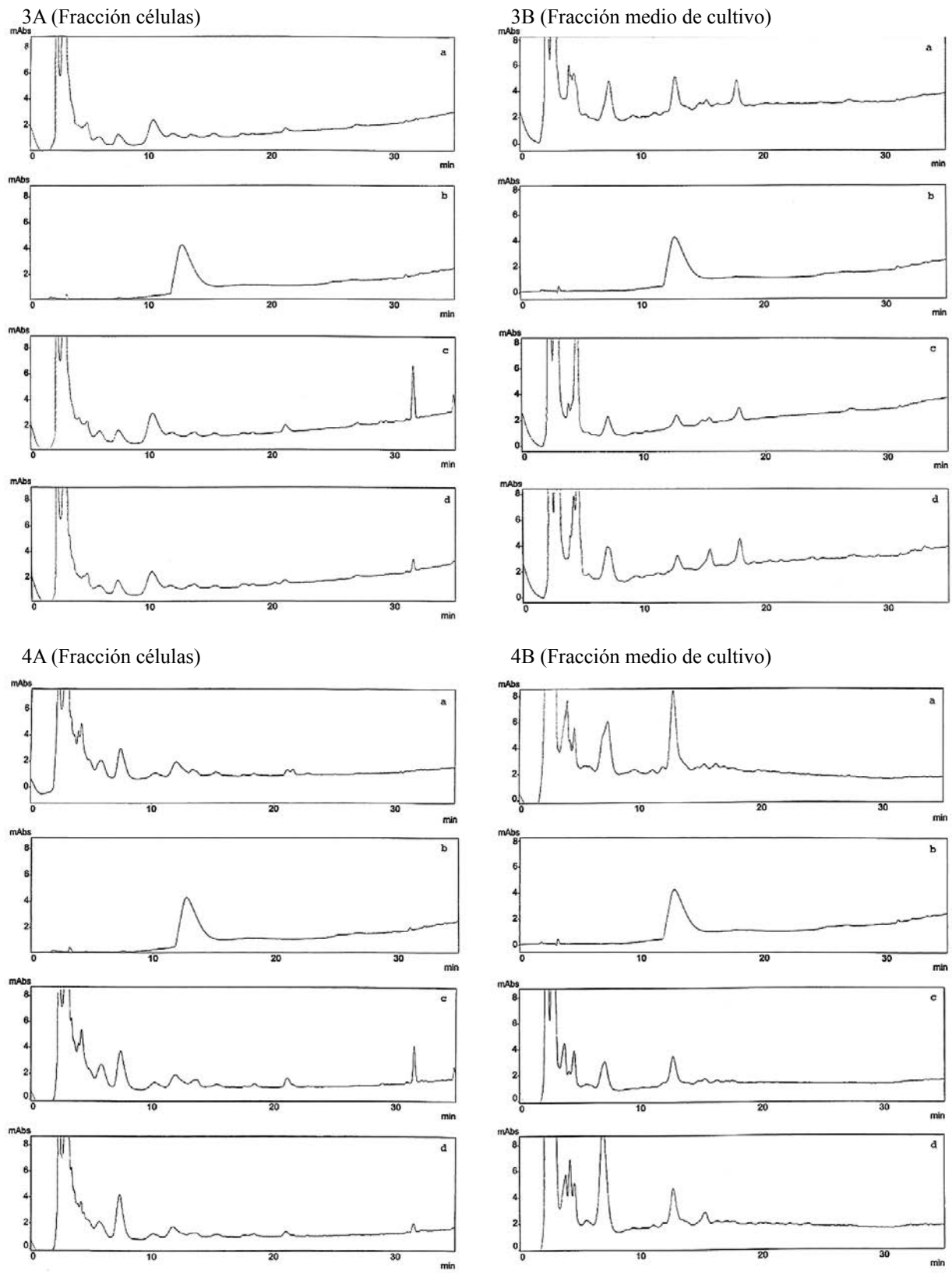


**Figura 1.** Propagación clonal por nudos de *P. aduncum* en medio de cultivo MS suplementado con AIA 0,2 mg/L y AG3 0,02 mg/L (a) y MS suplementado con ANA 0,02 mg/L y AG3 0,02 mg/L (b).

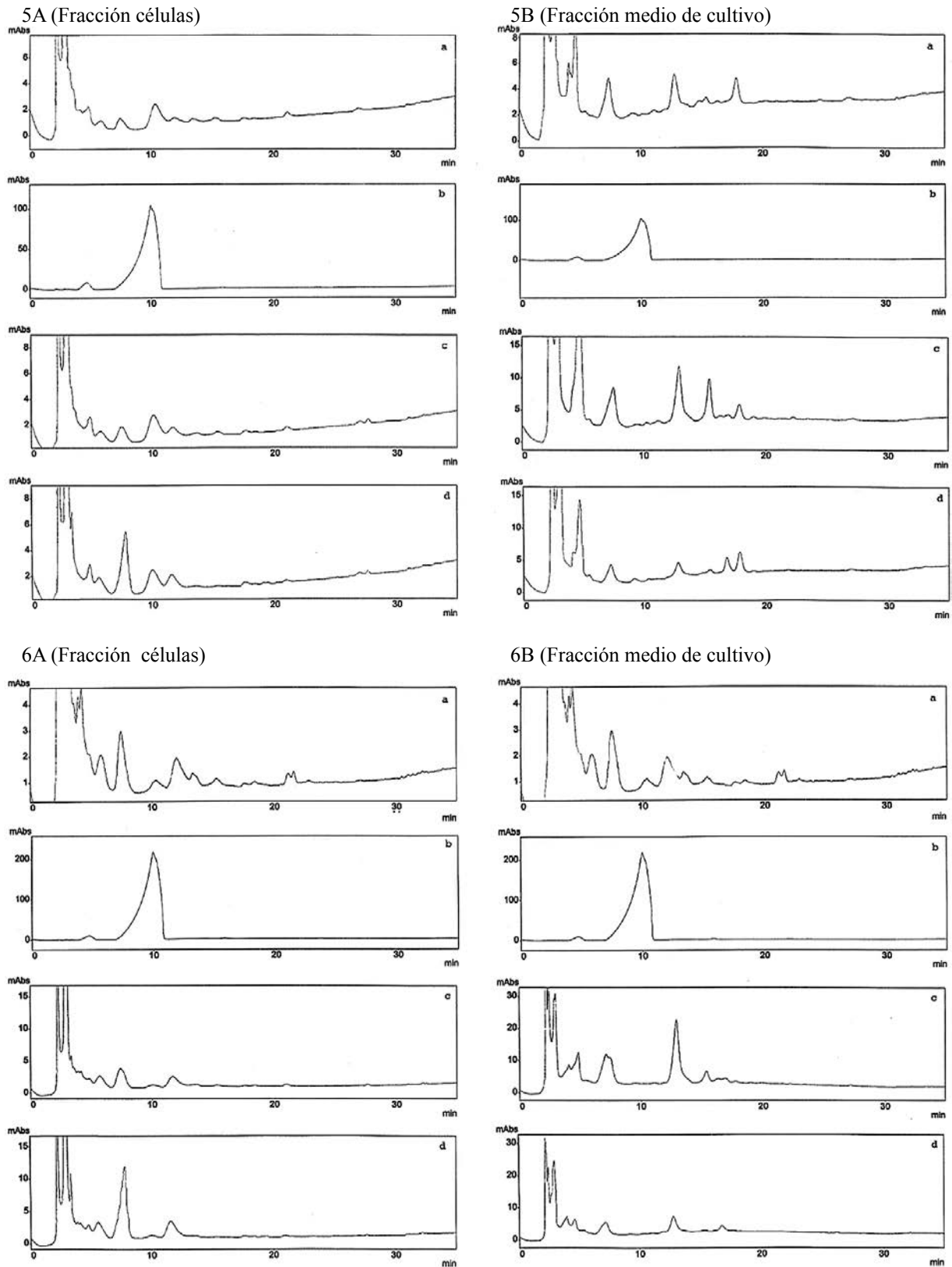




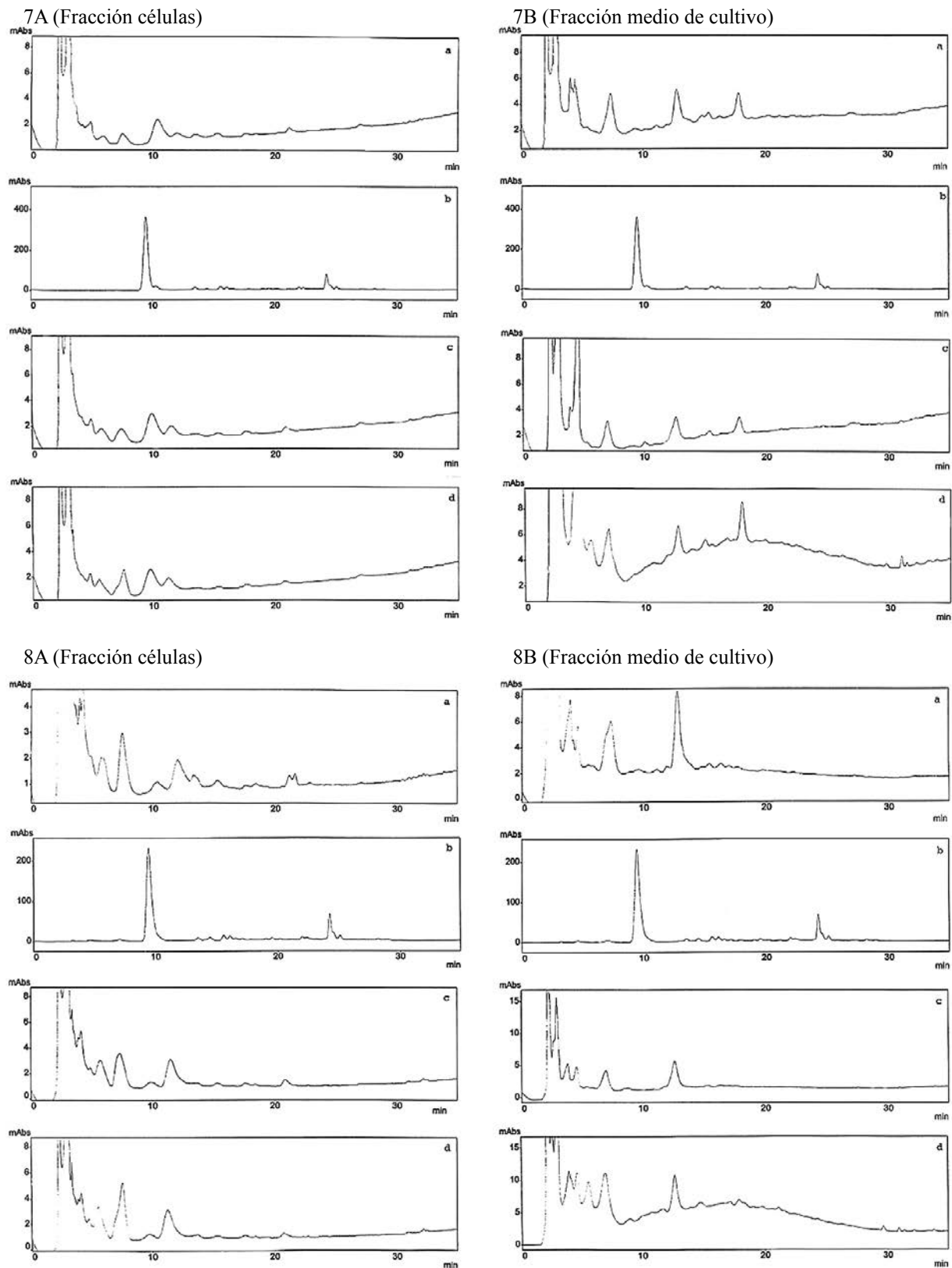
**Figura 2.** Inducción de callos friables en hoja de *P. aduncum*, después de 45 días de cultivo, en medio de cultivo MS, BAP 0,5 mg/L y sacarosa 2,0%.



**Figuras 3A-B y 4A-B.** Cromatogramas CLAE, en la condición de  $\lambda$  254 nm y  $\lambda$  280 nm, respectivamente, de la incorporación del precursor fenilalanina en medio de cultivo AS-6, de suspensiones celulares de *P. aduncum*. Izquierda, A (fracción células) (a) control MeOH 1,0 mL, (b) padrón fenilalanina, (c) fenilalanina 1,0 mg/L y (d) fenilalanina 5,0 mg/L. Derecha, B (fracción medio de cultivo) (a) control MeOH 1,0 mL 5,0 mg/L. (b) padrón fenilalanina, (c) fenilalanina 1,0 mg/L y (d) fenilalanina 5,0 mg/L.

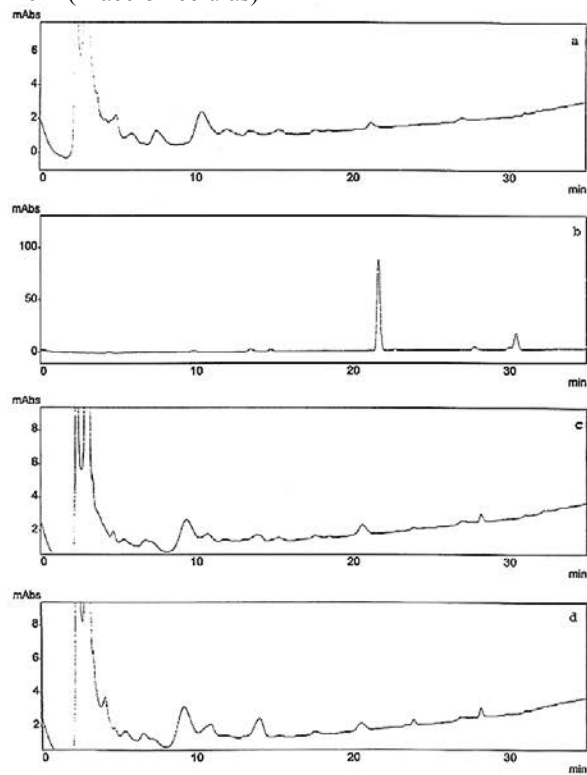


**Figuras 5A-B y 6A-B** Cromatogramas CLAE, en la condición de  $\lambda$  254 nm y  $\lambda$  280 nm, respectivamente, de la incorporación del precursor ácido ferúlico en medio de cultivo AS-6, de suspensiones celulares de *P. aduncum*. Izquierda, A (fracción células) (a) control MeOH 1,0 mL, (b) padrón ácido ferúlico, (c) ácido ferúlico 1,0 mg/L y (d) ácido ferúlico 5,0 mg/L. Derecha, B (fracción medio de cultivo) (a) control MeOH 1,0 mL, (b) padrón ácido ferúlico, (c) ácido ferúlico 1,0 mg/L y (d) ácido ferúlico 5,0 mg/L.

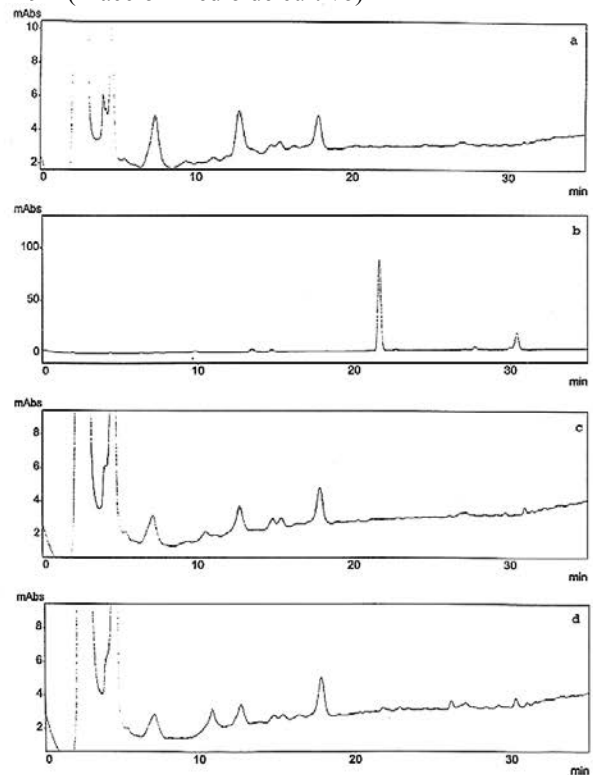


**Figuras 7A-B y 8A-B.** Cromatogramas CLAE, en la condición de  $\lambda$  254 nm y  $\lambda$  280 nm, respectivamente, de la incorporación del precursor alcohol coniferílico en medio de cultivo AS-6, de suspensiones celulares de *P. aduncum*. Izquierda, A (fracción células) (a) control MeOH 1,0 mL, (b) padrón alcohol coniferílico, (c) alcohol coniferílico 1,0 mg/L y (d) alcohol coniferílico 5,0 mg/L. Derecha, B (fracción medio de cultivo) (a) control MeOH 1,0 mL, (b) padrón alcohol coniferílico, (c) alcohol coniferílico 1,0 mg/L y (d) alcohol coniferílico 5,0 mg/L.

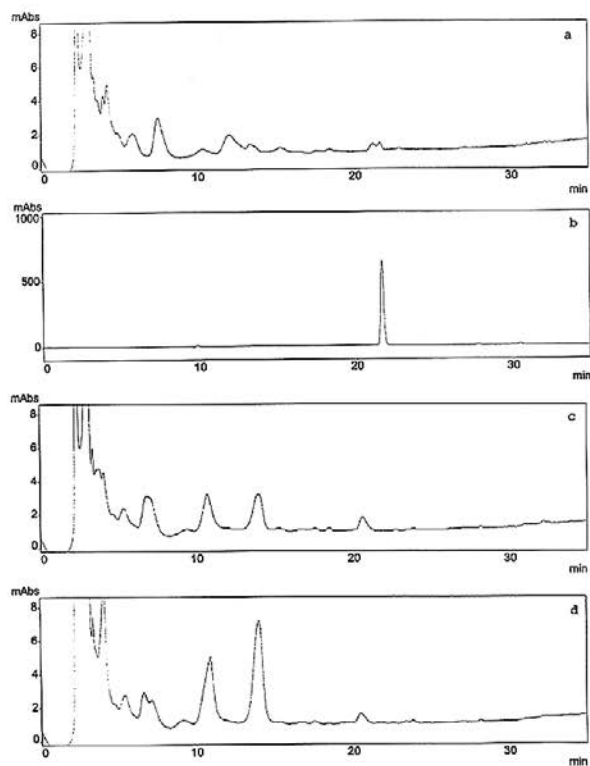
9A (Fracción células)



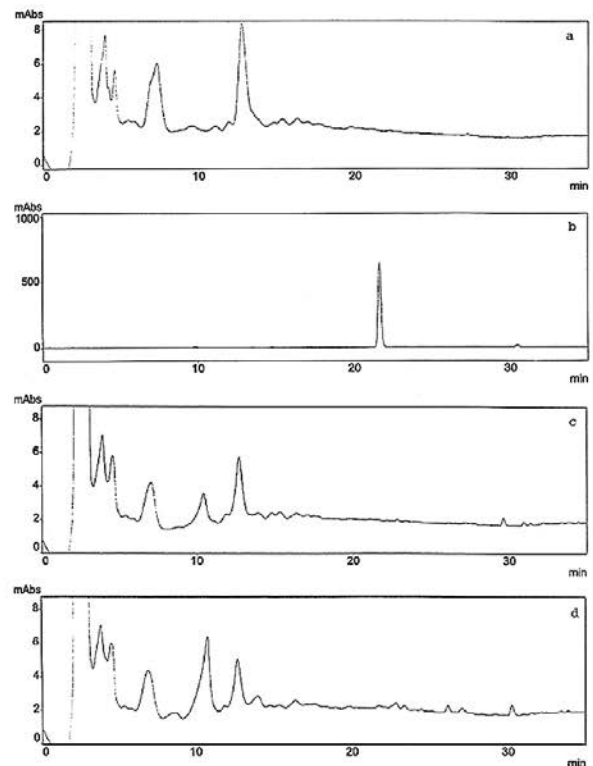
9B (Fracción medio de cultivo)



10A (Fracción células)



10B (Fracción medio de cultivo)



**Figuras 9A-B y 10A-B.** Cromatogramas CLAE, en la condición de  $\lambda$  254 nm y  $\lambda$  280 nm, respectivamente, de la incorporación del precursor eugenol en medio de cultivo AS-6, de suspensiones celulares de *P. aduncum*. Izquierda, A (fracción células) (a) control MeOH 1,0 mL, (b) padrón eugenol, (c) eugenol 1,0 mg/L y (d) eugenol 5,0 mg/L. Derecha, B (fracción medio de cultivo) (a) control MeOH 1,0 mL, (b) padrón eugenol, (c) eugenol 1,0 mg/L y (d) eugenol 5,0 mg/L.