



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA**

---

---

**Producción de fenilpropanoides en cultivos celulares y rizogénicos de  
*Buddleja cordata*, planta empleada en la Medicina Tradicional Mexicana**

**TESIS**

para obtener el grado de

**Doctor en Biotecnología**

**PRESENTA**

**María Elena Estrada Zúñiga**

Director

Dr. Francisco Cruz Sosa

Febrero del 2010

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio 471-01/Doctorado en Biotecnología”

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido no sólo una labor enriquecedora en mi formación como investigadora, sino una etapa en mi vida que me ha otorgado un sin fin de satisfacciones. Dentro de dichas satisfacciones, se encuentra el haber observado el proceso de des-diferenciación en órganos de tepezán hasta la visualización microscópica de células dividiéndose. Por lo que agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, al CONACYT y principalmente a mis instructores por ser partícipes de una ardua labor acerca de la impartición de conocimientos para conmigo:

Al Dr. Francisco Cruz Sosa, por darme espacio en su grupo de investigación referente al Cultivo de Tejidos Vegetales, así también por su constante y tenaz empeño para ir siempre más allá de lo planteado...

Al Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter, por su manera acertada de orientarme hacia cómo transmitir adecuadamente los conocimientos...

Al Dr. Mario Rodríguez Monroy, por sus pertinentes observaciones que me hicieron ver dónde debía de enriquecerme de conocimientos...

A la Dra. Leticia Buendía González y al Dr. Juan Orozco Villafuerte, por compartirme sus amplios conocimientos en Cultivo de Tejidos Vegetales, además por su perspicacia que siempre me orientó a analizar con mayor profundidad mis experimentos...

Así también, agradezco a todas aquellas personas que me apoyaron en el laboratorio y en la UAM-I...

A mis padres, por apoyarme desde siempre y permitirme conocer la libertad y lo que ella implica; a mis hermanos, cuñada y sobrino por posibilitar una convivencia siempre con tendencia hacia enriquecernos como individuos y familia, haciendo énfasis a todos los momentos gratos y los caóticos que hemos vivido...

*Algunas veces cuando el flujo parece ir en sentido contrario, provocando un mal sabor de boca y golpes bajos, existe una puerta que deja ver una pequeña luz que puede convertirse en un destello...*

*Gracias a todos aquellos que con una sonrisa y un apoyo tan sincero me regalaron su brillo, especialmente Lety, Juan, Toñito y Panchito...*

## INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION .....	1
1.1 Explotación de plantas medicinales .....	2
1.1.2 Biotecnología .....	4
1.1.2.1 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) .....	6
1.1.2.1.1 Establecimiento de CTV .....	7
1.1.2.1.1.1 Fuente de explantes .....	7
1.1.2.1.1.2 Componentes nutricionales del medio de cultivo .....	8
1.1.2.1.1.3 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV) .....	9
1.1.2.1.1.3.1 Auxinas y citocininas .....	12
1.1.2.1.1.3.2 Giberelinas (GAs), poliaminas, brasinoesteroides, ácido abscísico (ABA) y etileno .....	13
1.1.2.1.1.3.3 Jasmonatos (JA) y ácido salicílico (SA) .....	15
1.1.2.1.1.4 Temperatura, pH y luz .....	15
1.1.2.1.2 Aplicaciones del CTV .....	16
1.1.2.1.2.1 El CTV como modelo para estudios de genética, bioquímica y fisiología de plantas .....	16
1.1.2.1.2.2 Micropropagación o propagación clonal por cultivo <i>in vitro</i> .....	17
1.1.2.1.2.3 Producción de metabolitos secundarios .....	17
2. ANTECEDENTES .....	21
2.1 <i>Buddleja cordata</i> “tepozán” .....	21
2.1.1 Sinonimia .....	21
2.1.2 Descripción botánica y distribución geográfica .....	22
2.1.3 Usos, interacción biológica, farmacología y fitoquímica .....	22
2.1.4 CTV en especies asociadas a <i>B. cordata</i> .....	26
3. JUSTIFICACION .....	27
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo general .....	28
4.1.1 Objetivos particulares .....	28

5. HIPOTESIS .....	30
6. MATERIALES Y METODOS .....	31
6.1 Colecta y determinación taxonómica del material vegetal .....	32
6.2 Material vegetal y establecimiento del cultivo aséptico .....	32
6.3 Medio de cultivo para inducción y condiciones de incubación .....	33
6.4 Mantenimiento y estabilidad de los cultivos .....	34
6.5 Extracción de fenilpropanoides .....	35
6.6 Determinación de fenilpropanoides por TLC y HPLC .....	36
6.6.1 TLC .....	36
6.6.2 Preparación de estándares y condiciones de trabajo para HPLC .....	36
6.7 Establecimiento de cultivos de células en suspensión .....	37
6.7.1 Cinéticas de crecimiento .....	38
6.8 Estadística .....	39
7.RESULTADOS Y DISCUSION .....	40
7.1 Establecimiento de cultivos asépticos .....	40
7.2 Inducción de callo y raíz en explantes foliares inmaduros .....	42
7.3 Mantenimiento y estabilidad de las líneas celulares .....	46
7.4 Producción de fenilpropanoides en cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. cordata</i> .....	48
7.5 Contenido de fenilpropanoides en líneas celulares y planta silvestre ....	49
7.6 Establecimiento de cultivos de células en suspensión .....	50
8. CONCLUSIONES .....	54
9. PERSPECTIVAS .....	56
10. REFERENCIAS .....	58
11. ANEXOS .....	70

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la adición de la solución antioxidante durante el proceso de segmentación y/o en el medio de cultivo sobre el porcentaje de explantes viables evaluados después de 20 días de incubación.....	42
Tabla 2. Porcentaje de callo y raíz inducidos en explantes de hoja inmadura bajo distintos niveles de auxina con citocinina después de 30 días de cultivo .....	44
Tabla 3. Parámetros de crecimiento determinados en tres subcultivos de las líneas celulares de <i>B. cordata</i> .....	47
Tabla 4. Valores de Rf obtenidos para los fenilpropanoides producidos en los cultivos <i>in vitro</i> de <i>B. cordata</i> .....	49
Tabla 5. Contenido de fenilpropanoides en extractos metanólicos de cultivos <i>in vitro</i> y hojas de <i>B. cordata</i> .....	50

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estado actual y perspectiva de las plantas medicinales en México .....	3
Cuadro 2. Plantas medicinales de uso extensivo en México .....	5
Cuadro 3. Clasificación de los metabolitos secundarios y su producción por CTV.....	19
Cuadro 4. Principales metabolitos asociados a la propiedad curativa de <i>B. cordata</i> y sus respectivas actividades .....	25
Cuadro 5. Concentraciones de auxinas y citocininas para la inducción de callo o respuestas morfogénicas de <i>B. cordata</i> .....	34

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Fórmulas estructurales de los RCV comúnmente empleados en CTV .....	11
Fig. 2 Algunas de las interacciones involucradas en la red de transducción de señales en células de plantas .....	12
Fig. 3 Algunos mecanismos fisiológicos y bioquímicos elucidados por CTV .....	16
Fig. 4 Esquema sobre aplicaciones del CTV .....	20
Fig. 5 Descripción botánica de <i>B. cordata</i> y su distribución geográfica .....	23
Fig. 6 Metodología para el establecimiento de cultivos asépticos .....	33
Fig. 7 Metodología para la caracterización del crecimiento y producción de fenilpropanoides de los cultivos de células en suspensión .....	39
Fig. 8 Características de los explantes cultivados 20 días después de ser tratados con solución antioxidante durante el proceso de Inmersión y segmentación y/o en el medio de cultivo .....	42
Fig. 9 Callo y raíz inducidos en explantes de hoja inmadura de <i>B. cordata</i> bajo la adición de AIA, ANA y 2,4-D con KIN .....	45
Fig. 10 Crecimiento y producción de fenilpropanoides en cultivos de células en suspensión de <i>B. cordata</i> .....	52

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1 Composición de los cinco medios de cultivo comúnmente usados en CTV .....	71
ANEXO 2 Preparación del medio de cultivo MS .....	72
ANEXO 3 Determinación de azúcares totales por el método Fenol-Sulfúrico .....	75
ANEXO 4 Determinación de los parámetros cinéticos $\mu$ y $q_p$ .....	76
ANEXO 5 Curvas patrón para los estándares de fenilpropanoides .....	79
ANEXO 6 Cromatogramas .....	82
ANEXO 7 Artículo .....	88

## ABREVIATURAS

$\mu$	Velocidad específica de crecimiento
2,4,5-T	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2iP	N <sub>6</sub> -isopentiladenina
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido 3-indolacético
AIB	Ácido 3-indolbutírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
ANOVA	Análisis de varianza
B	Boro
B5	Medio de cultivo desarrollado por Gamborg (1968)
BAP	N <sub>6</sub> -bencilaminopurina ó N <sub>6</sub> -benciladenina
BM	Biomasa máxima
BRs	Brasinoesteroides
Ca	Calcio
Co	Cobalto
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
Cu	Cobre
DAD	Detector de arreglo de fotodiodos
Fe	Fierro
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
GAs	Giberelinas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
I	Yodo
IC	Índice de crecimiento
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
JA	Ácido jasmónico o jasmonatos
K	Potasio

KIN	Cinetina (6-furfuril aminopurina)
Maíz Bt	Maíz transgénico cuya denominación "Bt" deriva de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
MS	Medio de cultivo desarrollado por Murashige y Skoog (1962)
N	Nitrógeno
Nitsch y Nitsch	Medio de cultivo desarrollado por Nitsch y Nitsch (1969)
OMS	Organización Mundial de la Salud
w/v	Peso/volumen (concentración)
P	Fósforo
PF	Peso fresco
PIC	Picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolinico)
PS	Peso Seco
qp <sub>L, v</sub>	Velocidad específica de producción de Linarina o Verbascósido
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
Rf	Factor de retención
S	Azufre
SA	Ácido salicílico
td	Tiempo de duplicación
TDZ	Tidiazuron (N-fenil N'1,2,3-tidiazol-5-yl urea)
TLC	Cromatografía en placa fina (Thin Layer Chromatography)
Tr	Tiempo de retención
VC	Viabilidad celular
v/v	Volumen/volumen (concentración)
White	Medio de cultivo desarrollado por White (1963)
WHO	World Health Organization
WPM	Medio de cultivo "Woody Plant Medium"
Y <sub>x/s</sub>	Rendimiento de biomasa con respecto al sustrato
Zea	Zeatina
Zn	Zinc

## RESUMEN

En la actualidad los efectos nocivos de la actividad antropogénica son observados de manera considerable alrededor del mundo, por lo que las plantas se han convertido en un símbolo de una forma de vida más natural y saludable. Muchos productos derivados de las plantas como insecticidas, cosméticos, alimentos y principios activos para elaborar medicamentos son empleados frecuentemente por el hombre. En México, el uso de plantas medicinales como práctica terapéutica, mejor conocida como herbolaria, tiene gran arraigo entre las poblaciones. Sin embargo, el consumo de especies medicinales silvestres no está controlado, lo cual puede provocar severos daños a las poblaciones naturales hasta causar su extinción. Por tanto, es necesario desarrollar técnicas sustentables como el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), una herramienta de la Biotecnología Vegetal que puede hacer posible la producción planificada, controlada y manipulada de compuestos activos. *Buddleja cordata* es una especie empleada en la medicina tradicional de México para tratar diversas enfermedades. Compuestos del tipo fenilpropanoide (linarina, verbascósido y los ácidos hidroxicinámicos: caféico, ferúlico, p-coumárico y sinápico) han sido asociados a la propiedad curativa de la planta. En este trabajo cultivos de tejido de *B. cordata* fueron establecidos con la finalidad de producir dichos fenilpropanoides. La inducción de callo más alta (76.4 - 84.3%) fue obtenida en cinco tratamientos conteniendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D: 0.45 - 9.05  $\mu\text{M}$ ) con cinetina (KIN: 2.32, 4.65  $\mu\text{M}$ ), mientras que para raíz la inducción más alta (79.6%) correspondió al tratamiento de ácido  $\alpha$ -naftalenacético (9.05  $\mu\text{M}$ ) con KIN (2.32 $\mu\text{M}$ ). El verbascósido fue el principal fenilpropanoide producido en los cultivos *in vitro* (raíz, callo verde y blanco) (66.24 - 86.26  $\text{mg g}^{-1}$  peso seco [PS]), mientras que la producción de linarina y los ácidos hidroxicinámicos fue baja (0.95 - 3.01  $\text{mg g}^{-1}$  PS). La línea de callo blanco, la cual presentó mayor acumulación de fenilpropanoides que la de callo verde y raíz, fue establecida como sistema en suspensión. La producción de verbascósido y linarina fueron mejoradas en cultivos de células en suspensión (116  $\text{mg g}^{-1}$  PS y 8.12  $\text{mg g}^{-1}$  PS, respectivamente).

## ABSTRACT

Nowadays the harmful effects of anthropogenic activities are considerably noticed around the world, thus plants have become as symbol of more natural and healthy lifestyle. Many products derived from plants such as insecticides, cosmetics, foods, and active principle for elaborating drugs, are frequently consumed by human beings. In Mexico, the use of medicinal plants as therapeutic practice has a great prevalence between the folk. However, it is known that plant consume is not controlled, provoking severe damages to its natural populations and sometimes causing its extinction. Thus, it is necessary to develop sustainable techniques as Plant Tissue Culture (PTC). It is a tool of Plant Biotechnology that can make possible a planned, controlled and manipulated production of active compounds. *Buddleja cordata* is a species employed in folk medicine for treating several illnesses. Phenylpropanoid compounds (linarin, verbascoside and hydroxycinnamic acids: caffeic, ferulic, p-coumaric and sinapic) have been attributed to therapeutic properties. In this work tissue cultures of *Buddleja cordata* were established in order to produce those phenylpropanoids (verbascoside, linarin and hydroxycinnamic acids). Highest callus induction (76.4 - 84.3%) was obtained in five treatments containing 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D: 0.45 - 9.05  $\mu\text{M}$ ) with Kinetin (KIN: 2.32, 4.65  $\mu\text{M}$ ), whereas highest root induction (79.6%) corresponded to the  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (9.05  $\mu\text{M}$ ) with KIN (2.32 $\mu\text{M}$ ) treatment. Verbascoside was the major phenylpropanoid produced in *in vitro* cultures (root, white and green callus) (66.24 - 86.26  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight [DW]), while linarin and hydroxycinnamic acids production was low (0.95 - 3.01  $\text{mg g}^{-1}$  DW). Verbascoside and linarin productions were improved in cell suspension culture (116  $\text{mg g}^{-1}$  DW and 8.12  $\text{mg g}^{-1}$  DW, respectively).

## 1. INTRODUCCION



Las plantas se han convertido en uno de los tótems de nuestro tiempo; en un mundo en el cual los efectos nocivos del tratamiento de los alimentos, el exceso de medicación y la agricultura industrial se hacen cada día más evidentes, las plantas han terminado por convertirse en símbolo de una forma de vida más natural y saludable. Hay sustitutos de la carne, fertilizantes orgánicos, insecticidas, combustibles como el biodiesel y principios activos obtenidos a partir de productos vegetales.

En este último rubro, las plantas medicinales y aromáticas se utilizan a gran escala en los dos últimos siglos para elaborar cosméticos, alimentos, bebidas, productos de uso doméstico, medicamentos (cerca del 25 % de las medicinas de patente contienen ingredientes activos derivados de plantas; Castleman, 1994) y hasta agentes curativos veterinarios (Mabey, 1988).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la popularidad e importancia a nivel mundial del uso de plantas medicinales con fines curativos, además de su incremento en consumo como medicina complementaria y alternativa en países sub y desarrollados (WHO, 2005). En México actualmente la herbolaria (práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales) continúa vigente y tiene gran arraigo en el país, constituyendo ésta el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana (Castleman, 1994; Seguí y Olivares, 2005). La importancia del uso etnobotánico de las plantas de México no ha sido ignorada, encontrándonos con la existencia de revisiones invaluable que documentan dichos usos (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). En el mismo sentido, debe evitarse que el consumo de especies vegetales silvestres se intensifique para no ocasionar su extinción, por lo que es inminente desarrollar técnicas sustentables como el Cultivo de Tejidos Vegetales, herramienta de la biotecnología vegetal que puede hacer posible la producción planificada, controlada y manipulada de compuestos bio-activos poseedores de propiedades curativas.

### **1.1 Explotación de plantas medicinales**

Las diversas condiciones fisiográficas y climáticas propician que en México exista una extraordinaria riqueza florística, contando con 22 000 especies vasculares de las cuales aproximadamente el 50% son endémicas (Villaseñor, 2004). Alrededor de 3 000 especies son usadas con fines medicinales (Bye y col., 1995), teniéndose como dato que una tercera parte es empleada para el tratamiento de una variedad de afecciones asociadas con el sistema gastrointestinal (Argueta y col., 1994), mientras que al menos 306 especies provenientes de 235 géneros y 93 familias son usadas como agentes hipoglucemiantes para el tratamiento de la diabetes mellitus (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

Dichos datos ubican al país en el cuarto lugar mundial en diversidad vegetal, por lo que cabe esperar nuevos y extraordinarios descubrimientos de sustancias que coadyuven a resolver las principales enfermedades que aquejan a la humanidad, particularmente las que se refieren al país (Estrada, 1985; Huerta, 1997). Durante la década de los '30 a los '70 se produjo una drástica disminución en el uso de sustancias naturales con propiedades medicinales, provocado por la producción a gran escala de productos sintéticos con características similares o aparentemente de mayor eficacia curativa. Sin embargo, la tendencia por lo natural y la creciente incidencia de nuevas enfermedades ha conducido a la recolecta inmoderada de plantas medicinales silvestres, propiciando una disminución de las poblaciones naturales en muchas áreas hasta encontrar a algunas especies amenazadas o extintas (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Estado actual y perspectiva de las plantas medicinales en México

Especies medicinales	No. de especies
Especies medicinales identificadas y registradas	4,000
Especies medicinales validadas farmacológica y clínicamente	250
Especies medicinales empleadas por la población mexicana	3,500 a 4,000
Especies medicinales utilizadas regularmente (sin procesar)	1,500
Especies medicinales usadas intensivamente (sin procesar, mezcladas o procesadas)	250
Especies medicinales silvestres que se colectan	3,600
Especies medicinales que se cultivan en el huerto familiar o en cultivos comerciales	370
Especies medicinales amenazadas o en peligro de extinción (NOM-059 ECOL-1994)	35

Huerta, 1997

El INEGI reporta para el año 2007 la prevalencia en México de enfermedades del corazón, del hígado, infecciones intestinales, diabetes mellitus, tumores malignos, influenza, neumonía, entre otras, como las causas principales de mortalidad a nivel nacional (INEGI: Estadísticas de Mortalidad, 2007). Ante la ocurrencia de las distintas enfermedades, el sector salud ha demostrado ser un sistema insuficiente

en términos de prestar el servicio y lograr la sanación o mejorar la calidad de vida de la totalidad de la población mexicana, por lo que se asocia el uso de diversas plantas medicinales en el país ante tal evento (cuadro 2), como una alternativa curativa. Existe una alta demanda de aproximadamente 350 especies medicinales (85% de recolección silvestre) que se comercializan en las principales ciudades y en algunas regiones del país ya sea de forma entera, fresca o seca, partes de ellas o en mezclas (cuadro 2). De dicha recolección, el 75% procede de comunidades indígenas y rurales de la región centro-sur, lugares donde no se cuenta con programas de manejo y control o seguimiento de las dependencias gubernamentales responsables (Hersch, 1996; Lozoya y col. 1987).

### **1.1.2 Biotecnología**

La biotecnología, entendida en su sentido más amplio como “*el empleo de organismos vivos y sus productos para obtener un bien o servicio útil para el hombre*”, ha formado parte de la vida cotidiana del hombre desde mucho antes que recibiera dicho nombre con el que se la conoce actualmente. Su historia se remonta a la preparación del vino, cerveza y pan, junto con muchos otros alimentos fermentados como el yogurt y el queso (biotecnología tradicional), que se basa en la capacidad fermentativa de ciertos microorganismos (Herdt, 2006; Argenbio, cuaderno edición no. 100). A medida que los conocimientos fueron aumentando los procesos comenzaron a perfeccionarse, empleándose más tarde (y se siguen usando) a los microorganismos y sus productos en otros procesos industriales, tales como la fabricación de detergentes, manufactura del papel y producción de antibióticos. Finalmente, en la década de los '80 se desarrollaron una serie de técnicas moleculares basadas en el ADN, denominadas en su conjunto como “ingeniería genética”, cuya finalidad se centra en modificar y transferir genes de un organismo a otro, dando éstas paso a la Biotecnología Moderna.

**Cuadro 2.** Plantas medicinales de uso extensivo en México

Nombre Común y Científico	Parte		Principales Usos Medicinales
	Usada	Manejo	
ACHIOTE <i>Bixa orellana</i> L.	H, T y FI	C	
AHUEHUETE <i>Taxodium mucronatum</i> Ten.	H, T y FI	S	
ÁRNICA <i>Heterotheca inuloides</i> Cass.	H, T y FI	S y C	
CANCERINA <i>Hippocratea excelsa</i> Kunth.	R y C	S	
CAÑA FISTULA <i>Cassia fistula</i> L.	Fr	S	Antiinflamatoria; cicatrizante
CUACHALALATE <i>Amphipterygium adstringens</i>	C	S	
ENCINO <i>Quercus</i> sp.	H y C	S	
HIERBA DEL GOLPE <i>Oenothera rosea</i> Ait.	H y T	S	
HIGUERILLA <i>Ricinus communis</i> L.	H	S y C	
COLA DE CABALLO <i>Equisetum robustum</i>	T	S	Infecciones de las vías
DORADILLA <i>Selaginella</i> sp.	Toda	S	urinarias y los riñones,
GOBERNADORA <i>Larrea tridentata</i> (D.C.)	H y T	S	Eliminación de cálculos de
PALO AZUL <i>Eysenhardtia polystachya</i>	T	S	riñones
PINGUICA <i>Arctostaphylos pungens</i>	FI, R y H	C	
GUAYABA <i>Psidium guajava</i> L.	H	C	
HOJA SANTA <i>Piper auritum</i> H.B.K.	H y T	C	Problemas digestivos
ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	H y T	C	
SANTA MARIA <i>Chrysanthemum parthenium</i>	H y T	S y C	
ACEITILLA <i>Bidens odorata</i> Cav.	H, FI y T	S	
EPAZOTE <i>Telexys ambrosioides</i> L.	H y T	C	Antihelmíntico y trastornos
EPAZOTE DE ZORRILLO <i>Telexys graveolens</i> L.	H y T	S y C	digestivos
ESTAFIATE <i>Artemisia mexicana</i> (Willd)	H y T	S	
TORONJIL MORADO <i>Agastache mexicana</i> (Kunth)	H y T	C	
CIRIÁL <i>Crescentia cujete</i> L.	Fr	S	Trastornos de vías respiratorias
ESPINOSILLA <i>Loeselia mexicana</i> (Lam.)	H y T	S	(sinusitis, asma ó tos)
GORDOLOBO <i>Gnaphalium</i> sp.	H, T y FI	S	
LENTEJILLA <i>Lepidium virginicum</i> L.	H y T	S	
FLOR DE TILA <i>Ternstroemia</i> sp.	FI	S	Transtornos del sistema nervioso
PASIONARIA <i>Passiflora</i> sp.	H, T y FI	C	
ZAPOTE BLANCO <i>Casimiroa edulis</i> Llave & Lex	H	S	
HIERBA DEL SAPO <i>Eryngium</i> sp.	H y T	S	Cálculos vesiculares; control de
ZOAPATLE <i>Montanoa tomentosa</i> Cerv.	H, T y FI	S y C	colesterol
MUICLE <i>Justicia spicigera</i> (Schl)	H y T	C	Regulador de la presión, para el
NOPAL <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	T	C	parto
TEPOZAN <i>Buddleia americana</i> L.	H y T	S	Purificador de la sangre;
TRONADORA <i>Tecoma stans</i> H.B.K.	H y T	S	antialérgico

Parte usada: H = Hojas, T = Tallo, FI = Flor, Fr = Fruto, C = Corteza ; Grado de manejo: S = Silvestre, C = Cultivada.

Huerta, 1997

La ingeniería genética también es hoy una herramienta fundamental para el mejoramiento de los cultivos vegetales. Por ejemplo, es posible transferir un gen proveniente de una bacteria a una planta, tal es el ejemplo del maíz Bt. En este caso, los bacilos del suelo fabrican una toxina que mata a la larva de un insecto (el barrenador del tallo) que normalmente destruye los cultivos de maíz. Al transferirle el gen correspondiente, ahora el maíz fabrica esta toxina y por lo tanto resulta refractaria al ataque del insecto. La obtención de plantas transgénicas, es entonces un punto muy relevante que atañe a la Biotecnología Vegetal, una de las ramas biotecnológicas de suma importancia ya que contribuye substancialmente para construir una economía sustentable, por ejemplo para proveer de fuentes renovables de alimento, fármacos, pesticidas, energía (bio-combustibles) y restauración del suelo (fitorremediación) (Inzé, 2005; Tengerdy y Szakács, 1998; Zechendorf, 1999). Para cumplir con su cometido, la Biotecnología Vegetal emplea como herramienta principal al Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) (Vasil, 2008)

#### **1.1.2.1 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)**

El CTV, también conocido como cultivo *in vitro* de plantas por realizarse en recipientes de vidrio aunque actualmente se utilizan otros materiales, consiste esencialmente en aislar asépticamente una porción de la planta (explante) para crecer protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos, embriones o plántulas mediante la provisión apropiada de medio nutricional adicionado de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) y condiciones ambientales (temperatura y luz) (Staba, 1980; Barba y col., 2001; Pierik, 1990). El crecimiento de las células bajo dichas condiciones, y por tanto el fundamento del CTV, se asocia a la capacidad totipotencial que poseen las células vegetales, la cual se refiere a que todas las células vivientes del cuerpo de una planta, independientemente de su nivel de ploidía y de su forma de especialización, pueden potencialmente desarrollar todo tipo de células hasta regenerar una planta completa (Bhojwani y Razdan, 1983). Durante dicho crecimiento pueden ser que las células del explante respondan y ocurra una dediferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células

indiferenciadas denominada callo, o bien tome lugar una respuesta morfogénica en la que se formen directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos, llamados así porque son estructuras similares a un embrión, pero que no se originaron por unión de gametos). No obstante, el callo bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar una respuesta morfogénica (Pierik, 1990).

#### **1.1.2.1.1 Establecimiento de CTV**

Durante el ciclo de vida, las plantas continuamente responden a señales o estímulos (externos e internos) que usan para alterar su fisiología, morfología y desarrollo. Dichos estímulos son: luz, nutrientes minerales, compuestos orgánicos, gravedad, estatus del agua, calidad del suelo, tensión mecánica, viento, calor, frío, congelación, reguladores de crecimiento vegetal (RCV), pH, gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), heridas y (micro) organismos (Buchanan et al., 2000). Por tanto el éxito sobre el establecimiento de CTV se asocia en gran medida a dichos estímulos, por lo que deben considerarse los siguientes factores cuando se desean establecer CTV: a) fuente de explantes, b) constituyentes nutricionales inorgánicos y orgánicos del medio de cultivo, c) RCV y d) temperatura, luz y pH (Bhojwani y Razdan, 1983; Pierik, 1990; Trigiano y Gray, 2000).

##### **1.1.2.1.1.1 Fuente de explantes**

La constitución genética de la planta es un factor decisivo en todos los momentos de la vida de la planta, por ejemplo, determina si es monocotiledónea o dicotiledónea, qué temperatura es la óptima para su crecimiento y floración, la forma y color de sus flores, etc., por tanto la expresión de la constitución genética y el consiguiente tipo de cultivo depende también de las condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro* (Pierik, 1990). Otra de las determinantes del éxito o grado de éste sobre el CTV puede ser el tejido u órgano usado como fuente de explantes. Es recomendable comparar el cultivo de varios órganos y tejidos como fuente de explante de una planta en particular antes de seleccionar cualquier de ellos. Esto se debe a que, aunque la totipotencialidad es una característica universal de las células vegetales, su expresión es limitada a cierto tipo de

células, identificadas como meristemáticas, las cuales son células que aparentemente responden a estímulos organogénicos como son los balances de auxinas y citocininas (RCV). Éstas se caracterizan por presentar un tamaño relativamente pequeño, citoplasma denso, forma isodiamétrica, pared celular delgada, mínima vacuolación, núcleo largo, y usualmente están en “clusters” (Staba, 1980). Sin embargo, células altamente diferenciadas y maduras retienen la habilidad para regresar a un estado meristemático siempre y cuando posean un sistema de membrana intacto y un núcleo viable (Bhojwani y Razdan, 1983). Por tanto, plantas juveniles o en crecimiento proveerán de un mayor número de explantes viables para establecer CTV. Otro punto relevante a considerar sobre la fuente de explantes se refiere a la estación del año, nutrición y estrés bajo la cual se halle la planta, los cuales pueden hacer la diferencia entre el éxito o el fracaso de un cultivo.

Es necesario eliminar siempre microorganismos del explante a ser cultivado (establecimiento del cultivo aséptico) ya que éstos pueden sobrepasar su velocidad de crecimiento y destruirlos, además la presencia de microorganismos cambia la composición del medio de cultivo pudiendo consumir los nutrientes o liberando productos de su metabolismo (Staba, 1980). Usualmente se usa etanol, hipoclorito de sodio, antibióticos y fungicidas como agentes desinfectantes de la superficie del explante. El tipo de desinfectante empleado, su concentración y tiempo de exposición dependen de la sensibilidad del tejido (Trigiano y Gray, 2000).

#### **1.1.2.1.1.2 Componentes nutricionales del medio de cultivo**

Los requerimientos nutricionales para el óptimo crecimiento de un tejido *in vitro* dependen de la especie a ser cultivada, inclusive puede ser diferente entre tejidos de distintas partes de una planta, por tanto un medio de cultivo específico no será completamente satisfactorio para el cultivo de todos los tipos de tejidos y órganos (Trigiano y Gray, 2000; Bhojwani y Razdan, 1983).

Existen diferentes tipos de medios de cultivo comúnmente empleados para el CTV, como el MS, B5, WPM, Nitsch y Nitsch, y White (anexo 1). Dichos medios consisten de distintas formulaciones proveedoras de los nutrientes esenciales

para el metabolismo, crecimiento y desarrollo de una planta: N, P, K, Ca, Mg, S, (macronutrientes o elementos que la planta requiere en mayor proporción) Fe, Co, Zn, B, Mn, Mo, I, y Cu (micronutrientes o elementos que la planta requiere en menor proporción) y vitaminas (tiamina ó B1, riboflavina ó B2, ácido nicotínico ó B3, piridoxina ó B6, biotina ó H, alfatocoferol ó E, ácido fólico, entre otras). La adición a dichas formulaciones de una fuente orgánica de carbono, es absolutamente necesaria ya que muy pocas células de los cultivos *in vitro* son autótrofas, debido a que son incapaces de fotosintetizar ya sea por una insuficiente organización celular y desarrollo de tejidos, pérdida de clorofila, limitada concentración de CO<sub>2</sub>, y baja intensidad de luz. La fuente comúnmente empleada es la sacarosa en concentraciones del 2 al 6 % (Trigiano y Gray, 2000; Bhojwani y Razdan, 1983; Pierik, 1990).

Se debe prestar gran atención a la calidad del agua ya que ésta constituye el 95% del medio nutritivo, recomendándose que para trabajos de investigación ésta sea mínimo destilada. Además cuando no se conocen las necesidades nutricionales y de RCV de una especie particular con la finalidad de enriquecer los medios de cultivo y favorecer el crecimiento, se pueden adicionar mezclas de sustancias no definidas como el extracto de levadura o extractos vegetales. Se usan también materiales inertes como soporte, siendo los más comunes el agar, la agarosa, otros polisacáridos (alginatos; phytigel, Sigma Co; Gelrite, Merck & Co, Inc, Kelco Division; Gel-Gro, ICA biochemicals), papel filtro, arena, etc (Pierik, 1990; Gamborg y Phillips, 1995).

#### **1.1.2.1.1.3 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)**

En organismos complejos multicelulares, como lo son las plantas, los procesos fisiológicos como el crecimiento, la diferenciación y desarrollo de varios órganos son influenciados y controlados por la emisión de sustancias señal. En animales, dichas sustancias son las hormonas, las cuales actúan como mensajeros cuya síntesis y secreción ocurre en células glandulares, son transportadas hasta llegar al tejido blanco donde tiene acción. Dicha acción-control responde de manera logarítmica a su concentración, de ahí que tenga efecto en bajas concentraciones (Davies, 1995; Heldt, 2005). En plantas, algunas veces son referidas como fitohormonas, aunque la síntesis de dichas moléculas señal puede ser localizada,

pero además puede ocurrir en un amplio rango de tejidos o células de un tejido; pueden ser transportadas y tener acción a distancia (no es siempre el caso); pueden actuar en el tejido en el que fueron sintetizadas, por lo que el término “transporte” no es una propiedad esencial de las hormonas de plantas, y su acción (la cual puede regular diferentes procesos y al mismo tiempo distintas hormonas pueden regular el mismo proceso) depende de la concentración hormonal (0.001 a 10  $\mu$ M; Trigiano y Gray, 2000), la sensibilidad del tejido (capacidad de responder al estímulo) y su interacción con factores ambientales. Por tal razón, se re-emplaza el término “hormona” por *Regulador de crecimiento vegetal*.

Se han identificado diversos RCV que regulan el metabolismo en plantas, unos asociados a promover el crecimiento y desarrollo (auxinas, citocininas, giberelinas, brasinoesteroides y poliaminas), otros que lo inhiben (ácido abscísico, etileno) y otros que regulan el metabolismo secundario (ácido jasmónico, ácido salicílico) (Fig. 1) (Davies, 1995; Buchanan, y col. 2000; Wareing y Phillips, 1981). Cada RCV tiene sus propiedades particulares, por lo que las rutas regulando su producción y degradación, así como su percepción y transmisión son diversas. Aunque pocos progresos se han llevado a cabo sobre sus mecanismos de acción, parece ser que la transducción de éstas ocurre en un sistema complejo de red donde los RCV no actúan solos sino en conjunto o en antagonismo generando un balance “hormonal” total (Davies, 1995), cuyo inicio ocurre en la mayoría de las veces a través de la activación de proteínas receptoras (Fig. 2). Componentes de las rutas de transducción en células animales se han identificado en células vegetales, como son las GTPasas, nucleótidos cíclicos, calcio citosólico ( $Ca^{2+}$ ) y proteínas del tipo cinasas que interactúan con fosfatasa (Buchanan, y col. 2000; Heldt, 2005). Las rutas de traducción para etileno y auxinas involucran cascadas de cinasas, factores de transcripción se han asociado a la ruta de giberelinas, y  $Ca^{2+}$  y cinasas para la de ABA (Buchanan y col. 2000).

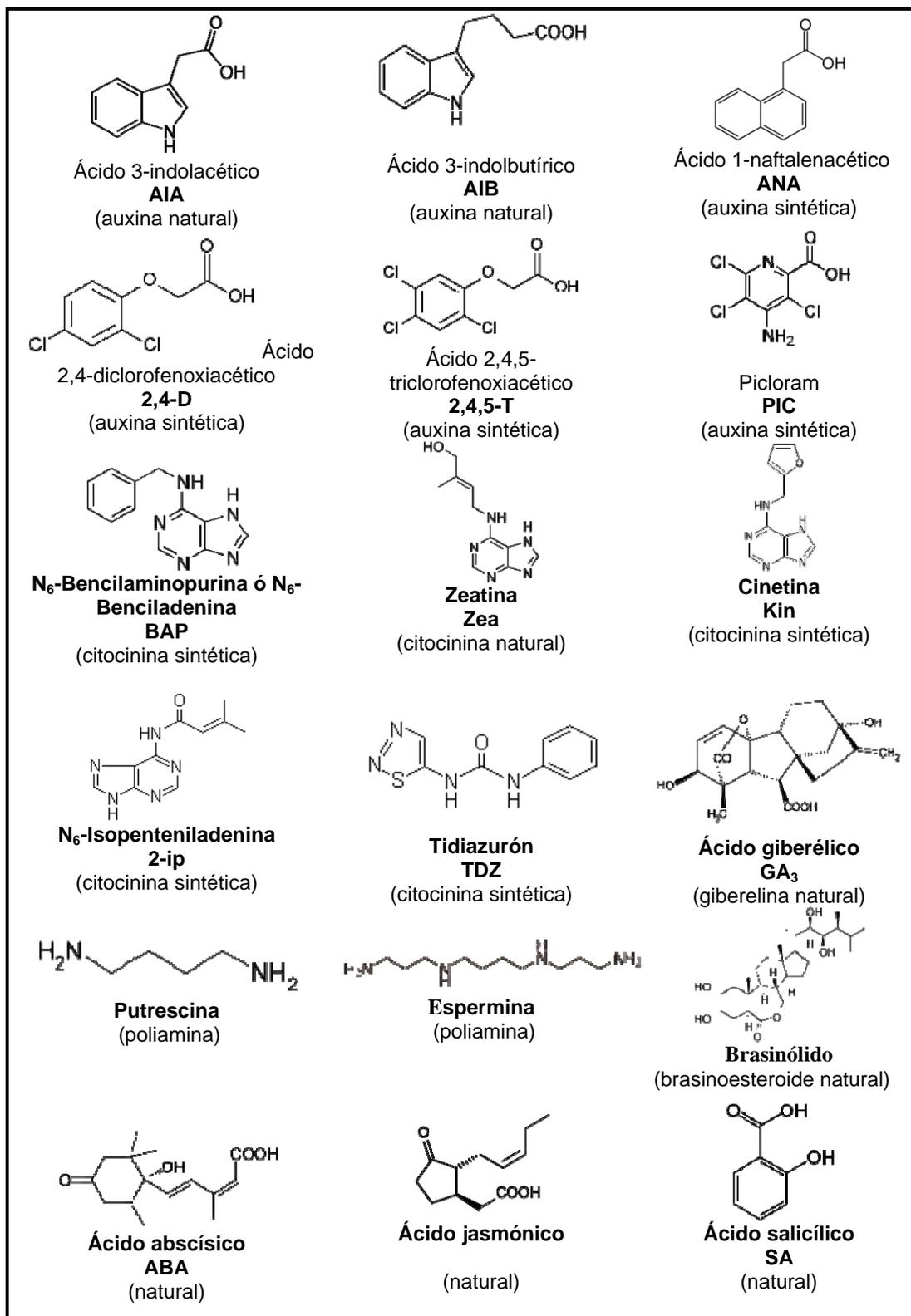
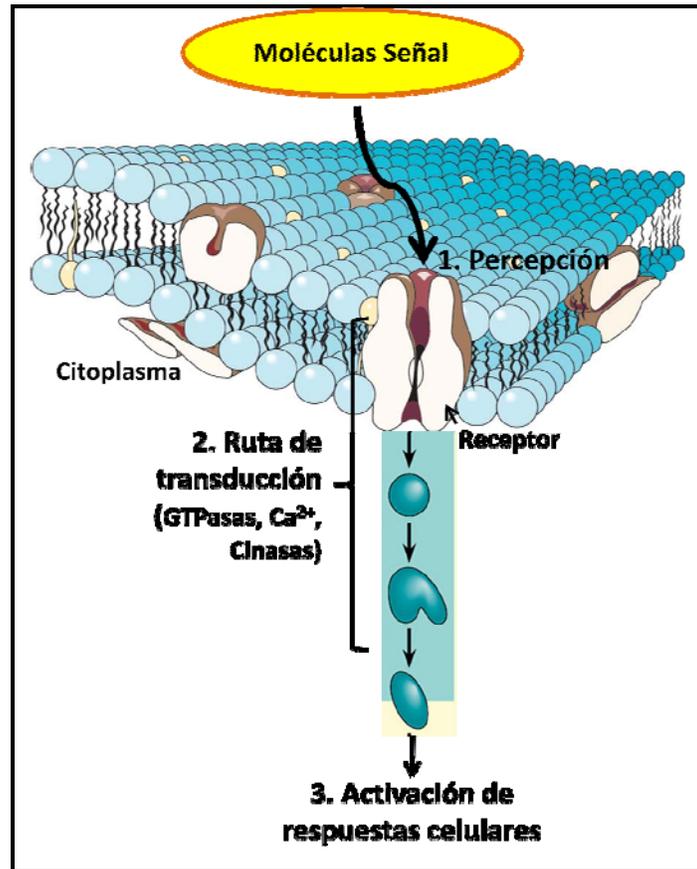


Fig. 1 Fórmulas estructurales de los RCV comúnmente empleados en CTV (tomado de wikipedia y kegg pathway database)



**Fig. 2** Algunas de las interacciones involucradas en la red de transducción de señales en células de plantas (imagen modificada de: Benjamin Cummings, copyright Pearson Education; [www.towardsoneworld.eu/images/theMembrane.jpg](http://www.towardsoneworld.eu/images/theMembrane.jpg))

#### 1.1.2.1.1.3.1 Auxinas y Citocininas

Las auxinas son probablemente el RCV más investigado, lo cual ha permitido que se conozca su involucramiento virtual en cada aspecto del crecimiento y desarrollo de la planta, estando involucrada en la elongación de tallos e internodos, el aumento o crecimiento de tejidos, dominancia apical, inducción de raíces en tallos y el desarrollo de ramificaciones de raíces, embriogénesis somática, tropismo, abscisión, etc. (Davies, 1995; Benjamins y Scheres, 2008). Las auxinas son encontradas en su mayoría en su forma conjugada con aminoácidos y azúcares, ó en su forma libre/activa (aproximadamente el 1% del total de auxina en la planta) (Benjamins y Scheres, 2008), siendo el ácido indol-3-

acético (AIA) la principal auxina ocurriendo de manera natural en la mayoría de las plantas.

En CTV los RCV deben ser provistos en el medio de cultivo ( $0.1 - 100 \mu\text{M} \sim 0.001 - 10 \text{ mg l}^{-1}$ ) para soportar un buen crecimiento y desarrollo de tejidos y órganos *in vitro*, empleándose comúnmente compuestos sintéticos que actúan de manera similar a los RCV naturales debido a que éstos son más estables metabólicamente y ambientalmente.

Las auxinas son una de las clases de RCV usados más importantes, principalmente cuando la inducción de la división celular, la expansión celular y de la formación de raíces es requerida. Las auxinas comúnmente usadas en CTV son AIB, ANA, 2,4-D, AIA entre otras (Fig. 1), las dos primeras ampliamente empleadas para rizogénesis, mientras que las restantes cuando interactúan con las citocininas son empleadas para callogénesis o proliferación de brotes (McCourt 1999; Trigiano y Gray, 2000; Gamborg y Phillips, 1995; Bhojwani y Razdan, 1983; Pierik, 1990; Staba, 1980; Davies, 1995).

Las citocininas son otra de las clases de RCV usados más importantes en el CTV debido a que éstas estimulan la división celular, modifican la dominancia apical, promueven la diferenciación de brotes (McCourt 1999; Trigiano y Gray, 2000; Bhojwani y Razdan, 1983; Davies, 1995). Su aplicación *in vitro* ocurre cuando se requiere inducir y crecer brotes, regenerar plantas y cuando se requiere promover la división celular ésta se combinada con las auxinas, siendo Kin, BAP, 2-ip y TDZ las citocininas usadas comúnmente en CTV (Fig. 1) (Trigiano y Gray, 2000; Gamborg y Phillips, 1995; Pierik, 1990; Davies, 1995).

#### **1.1.2.1.1.3.2 Giberelinas (GAs), poliaminas, brasinoesteroides (BRs), ácido abscísico (ABA) y etileno**

Comparada con las auxinas y citocininas, las giberelinas, poliaminas y brasinoesteroides son rara vez empleados en CTV ya que en la mayoría de los casos son sustancias no esenciales pero se usan cuando se desea potenciar el crecimiento o la regeneración de plantas (Herman, 2000). En general las giberelinas inducen en algunas especies la elongación de brotes, el crecimiento de los meristemas o yemas, rompe la dormición de embriones aislados *in vitro*,

siendo GA<sub>3</sub> (Fig. 1) la más usada para dichos fines, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor (se pierde el 90% de su actividad biológica después del autoclaveado) (Pierik, 1990; Trigiano y Gray, 2000; Davies, 1995). Se ha demostrado que las poliaminas (putrescina y espermina; Fig. 1) están relacionadas con la diferenciación celular y el desarrollo durante la embriogénesis, reportándose que su adición al medio de cultivo puede mejorar la productividad en sistemas de embriogénesis somática (Pierik, 1990; Herman, 2000). Se sabe que los brasinoesteroides promueven la elongación de brotes, inhiben el crecimiento y desarrollo de la raíz, y promueven la síntesis de etileno (Davies, 1995), y su uso en CTV se refiere a análogos sintéticos (DAA-6 ó Briobras-6; DAA-9, Biobras 16, MH-5, CR-44, RP-5, MH-E y DI-34) reportados como sustitutos de auxinas y citocininas en procesos de callogénesis, embriogénesis somática y multiplicación de brotes para micropropagación (Herman, 2000).

El ABA (Fig. 1) no es considerado normalmente un importante RCV en CTV, excepto cuando se está llevando a cabo la embriogénesis somática ya que en bajas concentraciones puede promover la maduración y germinación de embriones somáticos de algunas especies debido a que éste contrarresta el efecto de la giberelina sobre la síntesis de la  $\alpha$ -amilasa en el proceso de germinación (Trigiano y Gray, 2000; Gamborg y Phillips, 1995; Davies, 1995). Su empleo en altas concentraciones suprime el crecimiento y promueve la dormancia (Gamborg y Phillips, 1995). Por otro lado, se sabe que los cultivos de callos y órganos son capaces de producir etileno y debido a que los contenedores son sellados, éste RCV puede acumularse llegando a reprimir el crecimiento y acelerando la senescencia en algunos cultivos, por lo que algunas veces se emplea nitrato de plata para inhibir su síntesis (Trigiano y Gray, 2000; Gamborg y Phillips, 1995). Sin embargo, parece ser que el efecto del etileno sobre la diferenciación *in vitro*, particularmente para la rizogénesis, depende de la etapa en la que ésta se encuentra, siendo efectivo cuando es aplicado después del inicio del tratamiento de rizogénesis (Herman, 2000).

### **1.1.2.1.1.3.3 Jasmonatos (JA) y ácido salicílico (SA)**

Los jasmonatos son representados por ácido jasmónico (Fig. 1) y su metil éster, cuyo efecto es la inhibición del crecimiento, la promoción de la senescencia, abscisión, formación de pigmentos, desarrollo de polen y semillas, defensa contra heridas, ozono, insectos, plagas o herbívoros y patógenos microbianos (Davies, 1995; Kunkel y Brooks, 2002). El ácido salicílico (Fig. 1) inhibe la síntesis de etileno, y la germinación de semillas, bloquea la respuesta a heridas (antagonista de JA) y revierte los efectos del ABA. Ambos RCV parecen jugar un rol importante en los mecanismos de defensa de la planta; SA juega un rol importante en la defensa contra patógenos. La aplicación exógena de SA y JA resulta en una incrementada resistencia a un amplio rango de patógenos e insectos, respectivamente (Davies, 1995; Howe y Jander, 2008). Parece ser que existe una red compleja de señalización para JA y SA implicadas como rutas de defensa a patógenos (Kunkel y Brooks, 2002). En CTV éstos son empleados en procedimientos de elicitación para la producción de metabolitos secundarios.

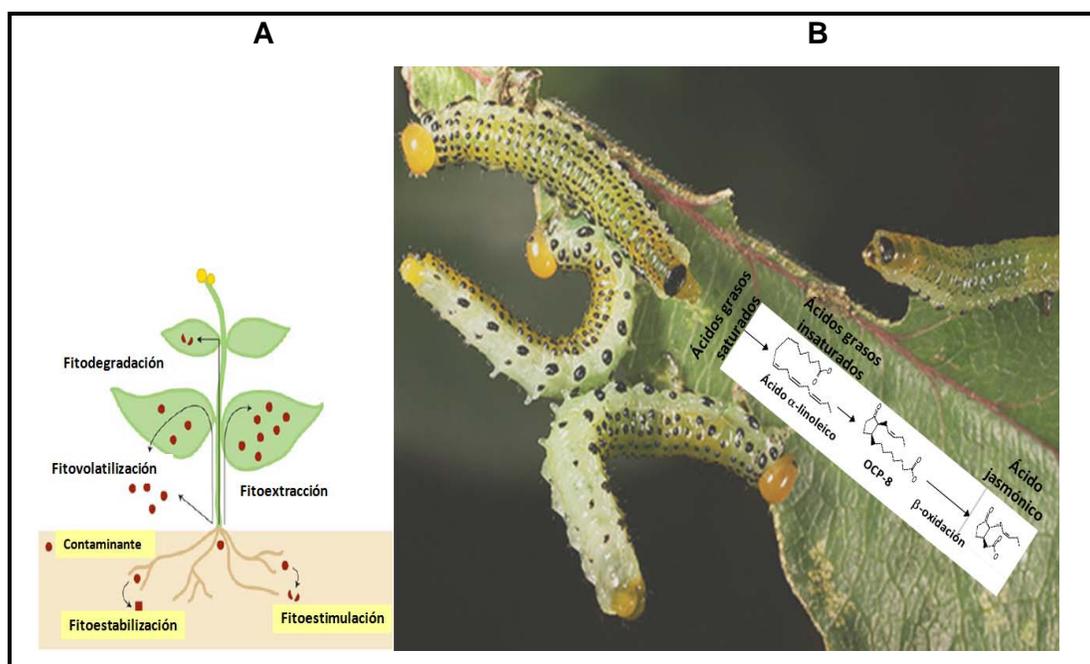
### **1.1.2.1.1.4 Temperatura, luz y pH**

Se emplea usualmente una temperatura de 25-27°C para cultivos *in vitro*, sin embargo la óptima temperatura puede ser investigada individualmente para cada especie. Mientras tanto, el pH del medio de cultivo debe ser usualmente ajustado de 5.0 a 6.5 previo a la adición del agar y el autoclaveado, ya que si se manejan extremos en dichos valores la biodisponibilidad de algunos nutrientes será afectada y consecuentemente afectará el crecimiento del cultivo (Staba, 1980; Pierik, 1990). De la misma manera, se sabe que la luz afecta el desarrollo de las plantas, por tanto afecta el crecimiento los cultivos *in vitro*. La luz roja o azul, provistas por lámparas blancas, es necesaria para inducir respuestas morfogénicas, crecimiento o producción de metabolitos primarios o secundarios (Staba, 1980). También para el crecimiento es necesaria una irradiancia de 40 – 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperíodo de 14-16 h luz (aunque algunas veces se incuban los cultivos en la oscuridad) (Pierik, 1990)

### 1.1.2.1.2 Aplicaciones del CTV

#### 1.1.2.1.2.1 El CTV como modelo para estudios de genética, bioquímica y fisiología de plantas

Una de las aplicaciones más importantes del CTV es la producción de plantas libres de virus, hongos y bacterias, permitiendo una mayor confiabilidad en los resultados sobre estudios genéticos, bioquímicos y fisiológicos para entender el crecimiento, desarrollo ó estrés de las plantas y así posibilitar su mejoramiento (Pierik, 1990; Vasil, 1991; Buchanan y col., 2000). Así por ejemplo, el CTV ha permitido elucidar algunos de los mecanismos detoxificantes en plantas que tienen la capacidad de tolerar, degradar o acumular contaminantes orgánicos o inorgánicos, esto es, la fitorremediación (Fig. 3A) (Doran, 2009; Pilon-Smits, 2005; Clemens y col., 2002). En fitopatología, el cultivo *in vitro* contribuye de manera significativa a generar eficazmente conocimientos referentes a la interacción planta-patógeno (Fig. 3B) (Pierik, 1990), los cuales serán un componente esencial de beneficio a la agricultura moderna sobre el control de enfermedades y la reducción de costos con respecto al uso de agroquímicos (Pierik, 1990; Lawton y col., 1992; Buchanan y col., 2000).



**Fig. 3** Algunos mecanismos fisiológicos y bioquímicos elucidados por CTV. **A** Procesos implicados en la fitorremediación (Pilon-Smits, 2005), **B** Síntesis de ácido jasmónico debida al estrés por herida

#### **1.1.2.1.2.2 Micropropagación o propagación clonal por cultivo *in vitro***

La micropropagación constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se la usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales. Consiste en cultivar *in vitro* células, tejidos, órganos, semillas, embriones en un medio específico para obtener en forma rápida el desarrollo y la producción de individuos completos selectos (de interés comercial o plantas en peligro de extinción principalmente) (Fig. 4A) (Barba y col., 2001; Hurtado, 2001; Pierik, 1990; Trigiano y Gray, 2000; Torres, 1989). Consiste de 5 etapas básicas: I) selección de la planta donadora y su preparación, II) establecimiento del cultivo aséptico, III) proliferación de brotes axilares (potenciada con RCV, principalmente citocininas), IV) Formación de raíz (inducida con auxinas), y V) aclimatización o transferencia a condiciones ambientales naturales (Fig. 4A). Cuatro métodos básicos son usados para propagar las plantas *in vitro* (etapa II), lo cual depende de la especie y las condiciones de cultivo (Trigiano and Gray, 2000): II.1) proliferación potenciada de brotes axilares (cultivo de meristemas apicales), II.2) cultivo de nodos (estimulación del crecimiento de brotes axilares), II.3) formación de novo de brotes adventicios mediante organogénesis de brotes (directa o indirecta), y II.4) embriogénesis somática o no-cigótica para el desarrollo de plantas completas o semillas artificiales (Barba y col., 2001; Hurtado, 2001; Pierik, 1990; Trigiano y Gray, 2000).

#### **1.1.2.1.2.3 Producción de metabolitos secundarios**

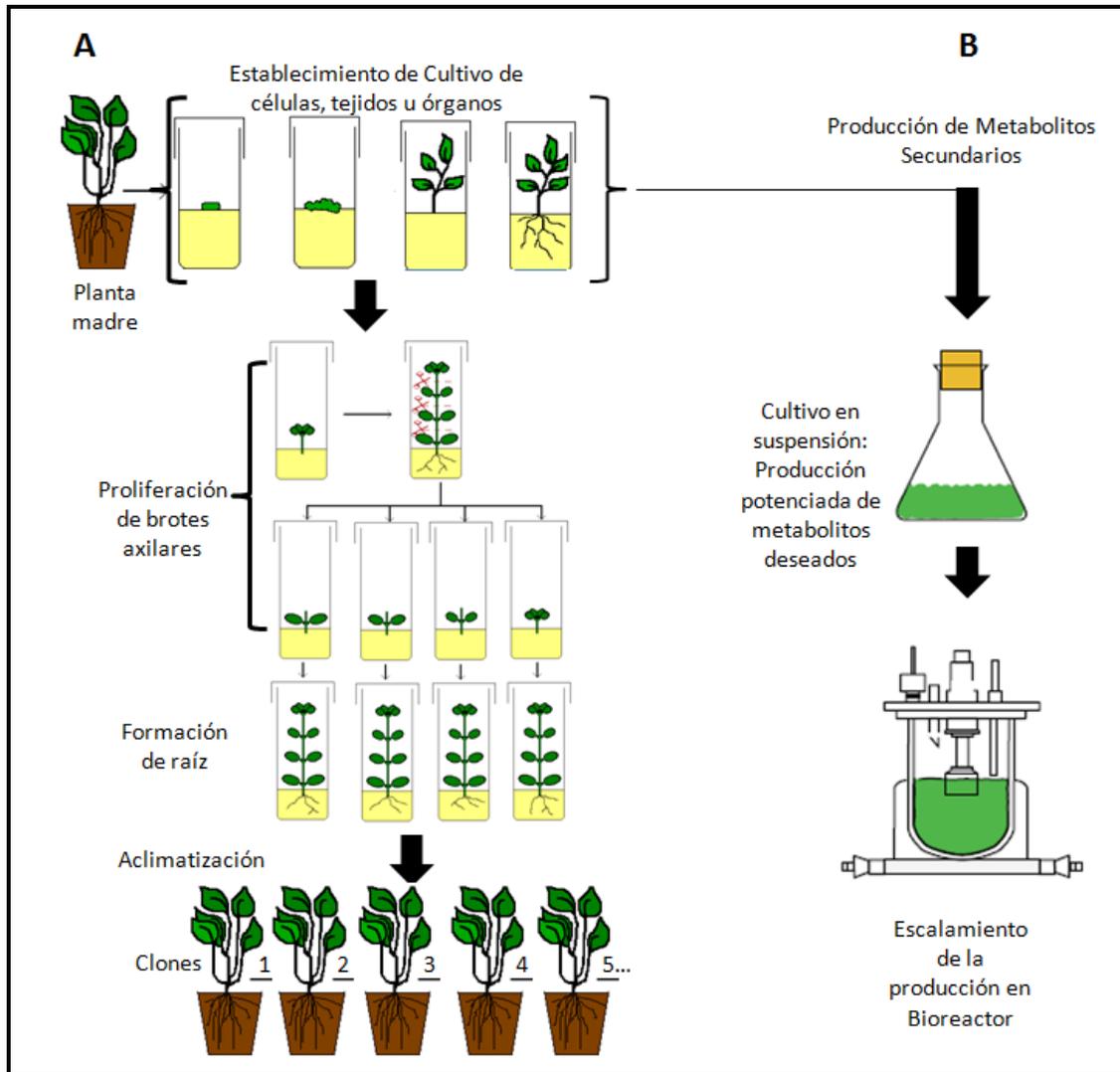
Las plantas producen compuestos bio-activos de bajo peso molecular, los cuales en su mayoría no parecen participar directamente en su crecimiento y desarrollo, sino más bien juegan importantes roles en su interacción con el medio ambiente. Dichos compuestos son conocidos como “metabolitos secundarios”, cuya producción es con frecuencia baja (< al 1% en peso seco), constitutiva o inducible (fitoalexina: se sintetiza después de una infección microbiana), y dependiente del estado fisiológico de desarrollo de la planta (Oksman-Caldentey e Inze, 2005; Zhang y col., 2002). Su distribución es diferencial entre grupos taxonómicos dentro del reino de las plantas, y se han clasificado en 3 grupos principales de

acuerdo a la ruta de biosíntesis: fenilpropanoides, alcaloides y terpenoides (Cuadro 3) (Buchanan y col., 2000). Metabolitos secundarios de interés industrial como los son pigmentos, esencias, sabores, compuestos bio-activos de uso farmacéutico, entre otros pueden ser producidos por CTV (Cuadro 3) (Fig. 4B) (Hurtado, 2001; Trigiano y Gray, 2000; Staba, 1980; Zhang y col., 2002). En este rubro, el cultivo de células en suspensión es el sistema adecuado ya que pueden ser obtenidas velocidades de crecimiento altas. Puede ocurrir que éste tipo de cultivo no tenga la capacidad de biosintetizarlos debido a que su producción esté asociada a una compartimentalización subcelular, celular, tejidos y órganos (Bourgaud y col. 2001; Sarin, 2005; Zhang y col., 2002; Ziegler y Facchini, 2008; Kirby y Keasling, 2009). El estudio de la producción de metabolitos secundarios y la búsqueda del incremento en rendimiento ha dado lugar a varios avances biotecnológicos como lo es la optimización de condiciones de cultivo, la selección de líneas altamente productoras, agregado de precursores, elicitación (biótica y abiótica), ingeniería metabólica, transformación de raíces, cultivos en biorreactor, entre otras (Fig. 4B) (Bourgaud y col. 2001; Sarin, 2005; Zhong, 2001). Existen ejemplos exitosos referentes a la producción de metabolitos bio-activos en CTV, donde ésta ha sido superior cuando las condiciones nutritivas y ambientales fueron optimizadas comparadas con la obtenida en plantas, en algunos casos llegando a la producción a nivel comercial (Cuadro 3).

**Cuadro 3** Clasificación de los metabolitos secundarios y su producción por CTV

<p><b>Alcaloide:</b> Compuestos heterocíclicos sintetizados a partir de aminoácidos, los cuales contienen 1 o más átomos de nitrógeno. Son producidos en respuesta de defensa a herbívoros y patógenos.</p> <p><b>Usos:</b> Medicinal, estimulante, narcótico, venenos.</p> <p><b>Clasificación:</b> I. Pirrolidina: 1) pirrolidona simples, 2) Tropano; II. Piperidina y piridina; III. Pirrolizidina; IV. Quinolizidina; V. Isoquinolina; VI. Indol; VII. Esteroidales</p> <p><b>Ejemplos de MS producidos por CTV:</b> <u>Vincristina y vinblastina:</u> indol alcaloide con actividad antitumoral extraído de cultivos celulares de <i>Catharanthus roseus</i> <u>Berberina:</u> benzil-isoquinolina alcaloide con actividad antimicrobiana extraído de cultivos celulares de <i>Coptis japonica</i> (Proceso industrial: Mitsui Petrochemical Ind.)</p>
<p><b>Fenilpropanoide:</b> Compuestos que contienen un anillo fenil (formados a partir de fenilalanina y tirosina por la ruta del shikimato) con una cadena C<sub>3</sub>, cuyas funciones son de defensa contra patógenos y herbívoros, atrayentes de polinizadores, absorbentes de rayos UV, alelopático.</p> <p><b>Usos:</b> Medicinal (antibióticos, fungicidas, antioxidantes, quelantes)</p> <p><b>Clasificación:</b> I. Fenólico simples (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>); II. Derivados de ácido benzoico (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>); III Estilbenos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>); IV. Coumarinas (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>); V. Lignina (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub>; VI. Flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>); VII Antocianinas (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>); VIII Taninos: 1) hidrolizables (ésteres de ácido gálico [C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>]), 2) condensados (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub></p> <p><b>Ejemplos de MS producidos por CTV:</b> <u>Ácido rosmarínico:</u> éster de ácido caféico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético con actividad antibacterial, antiviral, antiinflamatorio, extraído de cultivos celulares y de raíz de <i>Coleus blumei</i> y <i>Salvia officinalis</i> <u>Shikonina:</u> fenólico-terpenoide con actividad antiinflamatoria, pigmento extraído de cultivos celulares de <i>Lithospermum erythrorhizon</i> (Proceso industrial: Mitsui Petrochemical Ind.) <u>Vainillina:</u> derivado de ácido benzoico, saborizante extraído de cultivos celulares de <i>Vanilla planifolia</i> (Proceso industrial: Kanedo Co.)</p>
<p><b>Terpenoide (isoprenoide):</b> Compuestos formados por la polimerización de isopreno (C<sub>5</sub>), cuyas funciones se asocian al metabolismo primario (esteroles, carotenoides y hormonas) y secundario de las plantas.</p> <p><b>Usos:</b> Medicinal, fragancias (aceites esenciales), insecticidas</p> <p><b>Clasificación:</b> I. Hemiterpenos (C<sub>5</sub>); II. Monoterpenos (C<sub>10</sub>); III. Sesquiterpenos (C<sub>15</sub>); IV. Diterpenos (C<sub>20</sub>); V. Triterpenos (C<sub>30</sub>); VI. Tetraterpenos (C<sub>40</sub>)</p> <p><b>Ejemplos de MS producidos por CTV</b> <u>Taxol:</u> diterpeno con actividad antitumoral extraído de cultivos celulares de <i>Taxus brevifolia</i> (Proceso industrial: Phyton USA) <u>Ginsenósidos:</u> saponinas con actividad estimulante del sistema nervioso extraídos de cultivos de raíces de <i>Panax ginseng</i> (Proceso industrial: Nitto Denko Co)</p>

Buchanan y col., 2000; Heldt y Heldt, 2005; Mulabagal y Tsay, 2004; Oksman-Caldentey e Inze 2005; Sarin, 2005; Bourgaud y col., 2001; Ziegler y Facchini, 2008; Kirby y Keasling, 2009; Cowan, 1999; Rao y Ravishankar, 2000; kegg pathway database



**Fig. 4** Esquema sobre aplicaciones del CTV. **A** Proceso de micropropagación plantas, **B** Producción de metabolitos secundarios (Imagen modificada de argenbio, cuaderno edición no. 35)

## 2. ANTECEDENTES



### 2.1 *Buddleja cordata* “tepozán”

#### 2.1.1 Sinonimia

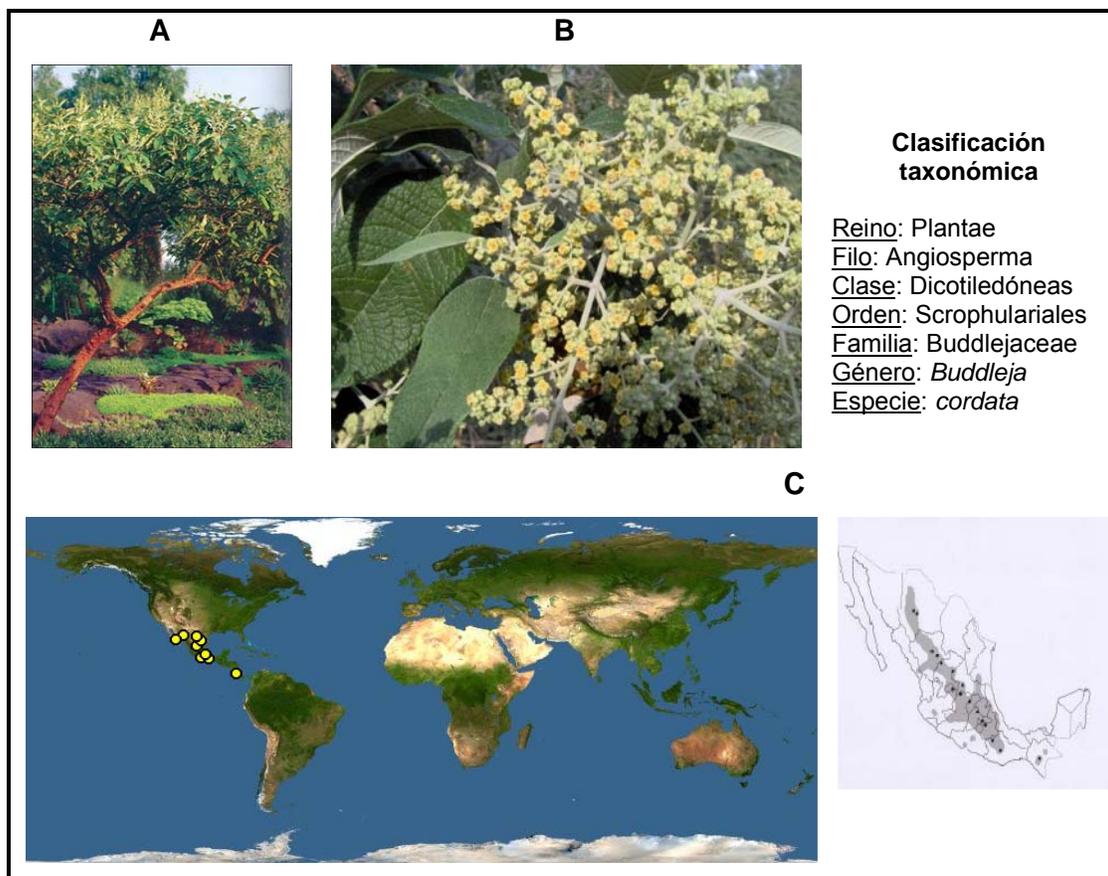
*Buddleja humboldtiana* Roem et Schult (Sánchez, 1980) y *Buddleia macrophylla* Kunth para la *Buddleia cordata* H.B.K., ssp *cordata* (Rzedowski y Calderón, 1985). Mientras que para la sinonimia popular se incluye: Batowí (purépecha), Matowí (purépecha), Salvia silvestre, Tepoza, comúnmente conocida como Tepozán o Tepozán blanco en México central (Sánchez, 1980; Rzedowski y Calderón, 1985).

### **2.1.2 Descripción botánica y distribución geográfica**

*Buddleja cordata* Humb. Bonpl. & Kunth (Buddlejaceae), comúnmente conocida como “tepozán” es una especie dioica que va de arbusto a árbol, midiendo de 1 a 20 m de altura (Fig. 5A); sus hojas son de 10 a 15 cm de largo, pecioladas, de base ancha generalmente redondeada o subcordada, borde entero o aserrado, angostamente lancioladas o aovadas en la punta, haz color verde claro y envés pubescente (Fig. 5B); flores pequeñas amarillas y aromáticas agrupadas en amplias panículas terminales, corola amarillenta, generalmente con un toque anaranjado en la garganta (Fig. 5B) (Aguilar-Rodríguez y col., 2006; Martínez, 1979; Sánchez, 1980; Gallardo, 1994). Se distribuye ampliamente en México desde los estados del norte de Sinaloa, Chihuahua y Durango hasta los estados del sur de Oaxaca y Chiapas (Fig. 5C). Crece en un amplio rango de hábitats como bosques nubosos de abeto y pino-roble, valles de alta elevación, matorrales desérticos con cactus y mezquite ó con juníferos. *B. cordata* coloniza con facilidad lugares altamente perturbados y abiertos gracias a que sus semillas son fácilmente dispersadas por el viento, arribando a lugares tan heterogéneos como grietas, huecos entre las rocas, superficies planas, áreas de cultivo, entre otros muchos puntos incluyendo zonas urbanas (Aguilar-Rodríguez y col. 2006; Sánchez, 1980; Rzedowski y Calderón, 1985; Mendoza, 2003).

### **2.1.3 Usos, interacción biológica, farmacología y fitoquímica**

Dentro de los principales usos del tepozán se encuentra el medicinal; las hojas (infusión oral) son empleadas para tratar la diarrea, dolor de cabeza, reumatismo, dolor de cintura, calambres musculares, enfermedades de la piel e inflamaciones, hemorragias nasales e infecciones intestinales (Gallardo, 1994; Rodríguez-Zaragoza, 1999); la decocción de raíces y corteza son usadas como diurético y para tratar afecciones de riñón (Martínez, 1989). Como pesticida, siendo el extracto acuoso de la planta repelente del gusano cogollero; contra algunas enfermedades de animales; forraje complementario de ganado ovino, caprino y vacuno; en la sucesión y la restauración ecológica ya que modifica el microambiente circundante (produce una gran cantidad de materia orgánica) (Mendoza, 2003).

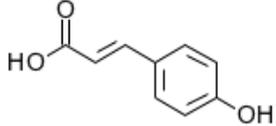
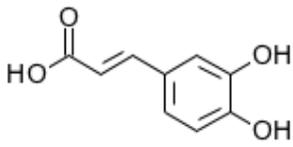
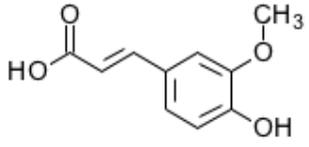
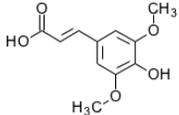
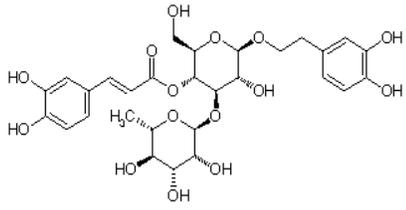
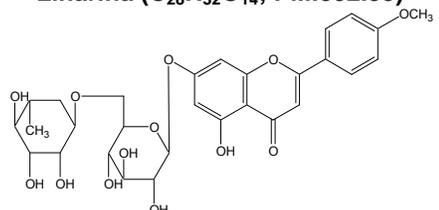


**Fig. 5** Descripción botánica de *B. cordata* y su distribución geográfica. **A** árbol, **B** hojas y flores, **C** distribución geográfica (Aguilar-Rodríguez y col., 2006; [www.jornada.unam.mx/2003/09/29/Images/eco-h2.jpg](http://www.jornada.unam.mx/2003/09/29/Images/eco-h2.jpg); [es.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Portada](http://es.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Portada); [www.discoverlife.org/mp/20m?kind=buddleja+cordata](http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=buddleja+cordata))

Entre los componentes aislados de *B. cordata*, parte de la defensa química de la planta contra los patógenos o su interacción con el medio ambiente (Lira, 1987) se hallan los metabolitos secundarios del tipo fenilpropanoide aislados de partes aéreas (Cuadro 4) principalmente como los ácidos hidroxicinámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sináptico (Harborne, 1990), un fenilpropanoide conjugado, conocido como verbáscosido (Arciniegas y col., 1997; Ávila y col., 1999), o acteósido (Andary, 1982; Petit, 1990) y el flavonoide linarina (Houghton, 1984; Rodríguez-Zaragoza, 1999; Martínez-Vázquez, 1996 y 1998). Las propiedades terapéuticas de la planta se han asociado principalmente con los compuestos del tipo fenilpropanoide (Houghton y Mensah, 1999), por presentar una o varias de las siguientes actividades: parasiticida, antimicrobiana, analgésica, antiviral,

antiproliferativa o citotóxica, antihipertensiva, antioxidante, antipirética y antiinflamatoria (Cuadro 4). También se han identificado metabolitos del tipo terpenoide como el sesquiterpeno buddledina A con actividad pesticida y antifúngica (Houghton, 2003; Houghton y Mensah, 1999; Yoshida y col., 1978; Devivar y col., 1995), y el iridoide aucubina con actividad antibacterial y antioxidante (Houghton, 2003; Houghton y Mensah, 1999; Recio y col. 1994).

**Cuadro 4.** Principales metabolitos asociados a la propiedad curativa de *B. cordata* y sus respectivas actividades (Dr. Duke's, phytochemical and ethnobotanical database)

Fenilpropanoide	Actividades
<p><b>Ácido <i>p</i>-coumárico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>; PM: 164.16)</b></p> 	<p>Inhibidor de aldosa reductasa: 4 µg/ml (débil actividad)                      Antileucémico; IC50=25-56 µg/ml;                      Antioxidante; 1/3 BHA; IC24=30 ppm                      Otras: Alelopático, Antimicrobiano                      Antihepatotóxico, Antitumoral, Pesticida</p>
<p><b>Ácido cafeico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>; PM: 180.16)</b></p> 	<p>Inhibidor de aldosa reductasa: 4 µg/ml (débil actividad)                      AntiHIV: EC50=200 µg/ml                      Antioxidante: 1/2 BHA; 1/3 quercetina; 30 mM;                      50 µM; IC57=30 ppm                      Antitumoral (piel): 200 ppm (dieta)                      Citotóxico: TC50=200 µg/ml                      Fungicida: MIC=0.4 mg/ml;                      Protector solar: IC50=2.5 mg/l; IC91=5 mg/l;                      IC98=25 mg/l                      Otras :Analgésico, Antibacterial, Quelante,                      Antihepatotóxico, Antiinflamatorio, Diurético</p>
<p><b>Ácido ferúlico (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>; PM: 194.19)</b></p> 	<p>Antileucémico; IC50=25-56 µg/ml                      Antioxidante: 1/2 BHA; 1/3 quercetin; 3,000 µM;                      EC50=9-15 µg/ml; IC51=200 ppm                      Uterosedativo: 30-100 mg/kg en ratas                      Otras: Alelopático, Analgésico, Antimicrobiano,                      Anticancerígeno (colon, estómago, hígado, piel),                      Antiinflamatorio, Antiviral, Herbicida,                      Quelante, Pesticida, Protector solar</p>
<p><b>Ácido sinápico (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>; PM: 224.21)</b></p> 	<p>Antioxidante: IC27=30 ppm                      Otras: Antibacterial, Antihepatotóxico,                      Preventivo de cáncer, Fungicida, Pesticida</p>
<p><b>Verbascósido (C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>15</sub>; PM: 624.21)</b></p> 	<p>Inhibidor de aldosa reductasa: IC50=0.39-15.1 µM; Antileucémico: ED50=2.6 µg/ml                      Antioxidante: ED50=1 µM                      Citotóxico: ED50=2.6 µg/ml                      Fungicida: MIC=0.4 mg/ml                      Protector solar: SPF 24 (Ávila y col., 2005)                      Otras: Analgésico, Antibacterial, Antihepatotóxico, Antihipertensivo, Antiinflamatorio, Antiviral (Nezbedová y col., 1999), Protector del DNA (Zhao y col., 2005), Neuroprotector (Guo-Qing y col., 2002), Parasitocida (Díaz y col., 2000), Inhibidor de la Proteína Cinasasa C, Pesticida, Fitoalexina</p>
<p><b>Linarina (C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>; PM: 592.55)</b></p> 	<p>Inhibidor de aldosa reductasa: IC20=10 µM                      Protector solar: SPF 9 (Ávila y col., 2005)                      Otras: Analgésico (Martínez-Vázquez y col., 1996), Antipirético (Martínez-Vázquez y col., 1996), Antiinflamatorio (Martínez-Vázquez y col., 1998), Amebicidal (Rodríguez-Zaragoza y col., 1999), Sedativo y potenciador de sueño (Fernandez y col., 2004)</p>

#### **2.1.4 CTV en especies asociadas a *B. cordata***

La producción del metabolito verbascósido ha sido observada en plantas intactas de especies pertenecientes a familias relacionadas con Buddlejaceae (pertenecientes todas al orden Scrophulariales), como son: Acanthaceae, Bignoniaceae, Labiatae, Myoporaceae, Oleaceae, Orobanchaceae, Scrophulariaceae y Verbenaceae. Sin embargo, los resultados encontrados han mostrado que generalmente las plantas nativas producen verbascósido en bajas concentraciones. Dichas especies generalmente son usadas con fines terapéuticos, por lo que el establecimiento de CTV ha sido evaluado mayoritariamente con la finalidad de producir los metabolitos secundarios o en menor número para micropropagar las especies. En lo referente a la producción de metabolitos secundarios, el verbascósido ha sido encontrado como el principal compuesto producido en cultivos de callo, células en suspensión y raíces transformadas de especies de: *Aphelandra*, *Campsis*, *Catalpa*, *Cistanche*, *Clerodendron*, *Digitalis*, *Eremophila*, *Hygrophilia*, *Leucosceptum*, *Osmanthus*, *Paulownia*, *Penstemon*, *Rehmannia*, *Syringa*, *Tecoma*. En algunos casos, se reportó la manipulación de las condiciones de cultivo, como la composición del medio, los RCV, la concentración de sacarosa, elicitación, entre otros, cuyo resultado fue el incremento en la producción de verbascósido (Shoyama y col., 1986; Inagaki y col., 1991; Pletsch y col., 1993; Nezbedová y col., 1999; Yamamoto y col., 1998; Skrzypek y Wysokińska, 1999; Wysokińska y Rozga 1998; Lu y Mei, 2003; Wysokińska y col., 2001; Dhakulkar y col. 2005). Mientras tanto, los trabajos que se han llevado a cabo con la finalidad de micropropagar reportan la multiplicación *in vitro* de *Adhatoda beddomei* C.B. Clarke (Acanthaceae; Sudha y Seeni, 1994), *Jasminum officinale* L. (Oleaceae; Bhattacharya y Bhattacharya, 1997) y *Antirrhinum majus* L. (Scrophulariaceae; Hoshino y Mii, 1998). Sin embargo, no existen reportes sobre CTV con respecto a *B. cordata*.

### 3. JUSTIFICACION



Ante la inminente problemática del consumo intensificado de especies medicinales y la necesidad de resolver los principales problemas en el Sector Salud de México, el cultivo de tejido de *B. cordata* puede representar una fuente sustentable, continua, eficaz, rápida y controlable productora de principios activos. Por lo que el presente proyecto plantea el desarrollo de diversos experimentos encaminados a establecer cultivos celulares de *B. cordata* productores de ácidos hidroxicinámicos, linarina y verbáscosido.

## 4. OBJETIVOS



### 4.1 Objetivo General

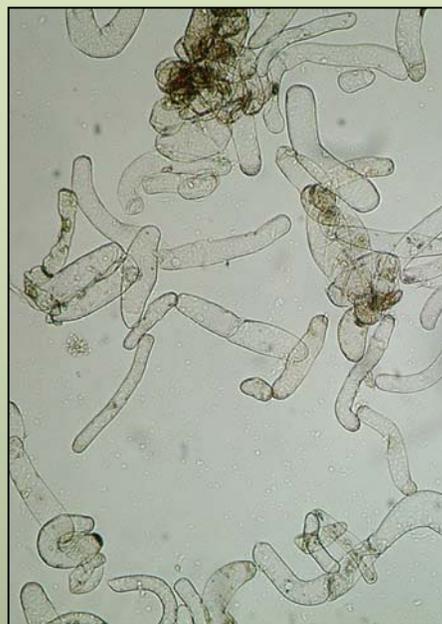
- Establecer cultivos de tejido de *B. cordata* (tepozán) productores de fenilpropanoides

### 4.1.1 Objetivos Particulares

- Establecer cultivos asépticos de *B. cordata* a partir de explantes foliares inmaduros
- Evaluar el efecto de distintas combinaciones de citocinina y auxina sobre la inducción de callo o respuestas morfogénicas en explantes foliares inmaduros

- Seleccionar los mejores tratamientos para la obtención de líneas celulares
  
- Establecer líneas celulares
  
- Evaluar la producción de fenilpropanoides (linarina, verbascósido y los ácidos hidrocínámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico) en las líneas celulares por HPLC
  
- Seleccionar la línea celular que produzca el mayor contenido de fenilpropanoides (linarina, verbascósido y los ácidos hidrocínámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico)
  
- Establecer cultivo en suspensión de línea celular seleccionada
  
- Caracterizar el crecimiento y la producción de fenilpropanoides (linarina, verbascósido y los ácidos hidrocínámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico por HPLC) de los cultivos en suspensión mediante la realización de cinéticas de crecimiento

## 5. HIPOTESIS



La aplicación exógena de auxinas y citocininas a explantes inmaduros de *B. cordata* posibilitará, a través de la totipotencia celular, el desarrollo de cultivos *in vitro* capaces de sintetizar compuestos bioactivos

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS



Colecta e identificación de la planta



Establecimiento del cultivo aséptico



Inducción de cultivos *in vitro*  
mediante RCV



Establecimiento de líneas celulares



Análisis de la producción de  
fenilpropanoides por TLC y HPLC



Selección de la línea celular más  
productora



Establecimiento de cultivos en  
suspensión y la caracterización de su  
crecimiento y producción

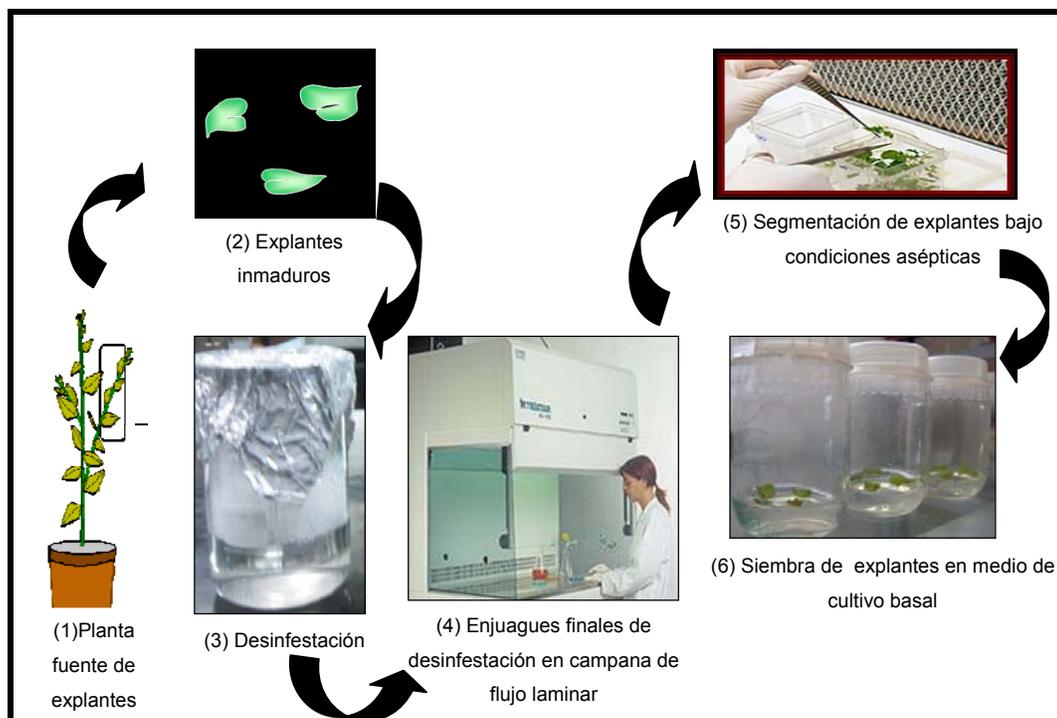
Diagrama general de la metodología  
seguida en el desarrollo experimental

### **6.1 Colecta y determinación taxonómica del material vegetal**

Plantas de aproximadamente 2 años de edad fueron colectadas en julio del 2005, en la comunidad de Santa María Apaxco, Estado de México. Las plantas fueron fertilizadas y acondicionadas en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Una muestra fue depositada en el Herbario de la UAM-I, la cual fue identificada como *Buddleja cordata* Kunth (Buddlejaceae) y registrada con el número 61170. Una vez transcurridos 3 meses, la planta mejor adaptada (más saludable) fue seleccionada como fuente de explantes, de la que se removieron hojas inmaduras de 3-5 cm de longitud.

### **6.2 Material vegetal y establecimiento del cultivo aséptico**

Los explantes removidos fueron colocados en una solución jabonosa durante 10 min y enjuagados con agua, posteriormente éstos fueron sumergidos durante 30 s en una solución etanólica al 70% (v/v) y lavados con agua destilada. Los explantes fueron sumergidos durante a) 10 ó b) 15 min en una solución de hipoclorito de sodio al 0.6% + Tween-20 0.2% (v/v). En todas las soluciones se llevó a cabo una agitación moderada. Finalmente 3 enjuagues con agua bidestilada estéril fueron efectuados bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Posteriormente, una solución antioxidante estéril (100 mg de ácido cítrico + 150 mg de ácido ascórbico/l de solución) fue probada para evitar oxidación de los explantes: i) inmersión con dicha solución durante 10 min y segmentación de los explantes en proporciones de 5x5 mm en cajas petri conteniendo dicha solución (vs control: agua destilada estéril) y, ii) adición de dicha solución en el medio de cultivo basal (vs control: medio basal; formulación en el siguiente apartado). Una vez obtenidos los segmentos, éstos fueron colocados (parte abaxial) sobre el medio de cultivo. Los explantes provenientes de una hoja fueron empleados para evaluar un tratamiento consistente de 6 frascos, cada uno conteniendo 3 segmentos (n=18) (Fig. 6).



**Fig. 6** Metodología para el establecimiento de cultivos asépticos

### 6.3 Medio de inducción y condiciones de incubación

El medio de cultivo basal consistió de  $\frac{1}{2}$  MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa al 3% (w/v). Phytigel al 0.2% (w/v) fue usado para solidificar del medio de cultivo. Los tratamientos de inducción de callo o de respuesta morfogénica consistieron en la adición de diferentes combinaciones de la citocinina KIN y las auxinas AIA, ANA y 2,4-D a la formulación del medio basal, empleándose un diseño factorial de  $3 \times 5 \times 3$  (cuadro 5) (ver anexo 2 para la preparación del medio de cultivo). 20 ml de medio de cultivo fueron agregados por frasco (100 ml). Los cultivos fueron incubados a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  bajo un fotoperíodo de 16 h luz ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; luz fluorescente blanca). Para el establecimiento del cultivo aséptico, los explantes se inocularon en medio de cultivo basal e incubaron durante 2 semanas, siendo éstos observados cada tercer día para detectar el crecimiento de posibles microorganismos. Los explantes inoculados en el medio de cultivo para inducción se incubaron durante 4 semanas, siendo monitoreados cada 5 días a través del registro de las características fenotípicas inducidas por cada unidad experimental. Al final del tiempo de incubación, cuando la respuesta

de contaminación ocurrió ó cuando los tratamientos indujeron callo o una respuesta morfogénica, éstas fueron expresadas como un porcentaje con respecto al total de explantes empleados por tratamiento.

**Cuadro 5.** Concentraciones de auxinas y citocininas usadas para la inducción de callo o respuestas morfogénicas de *B. cordata*

<b>KIN</b> <b>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>AIA (<math>\mu</math>M)</b>				
	<b>0.00</b>	<b>0.45</b>	<b>2.26</b>	<b>4.52</b>	<b>9.05</b>
<b>0.00</b>	K <sub>0</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>0</sub> AIA <sub>1</sub>	K <sub>0</sub> AIA <sub>2</sub>	K <sub>0</sub> AIA <sub>3</sub>	K <sub>0</sub> AIA <sub>4</sub>
<b>2.32</b>	K <sub>1</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>1</sub> AIA <sub>1</sub>	K <sub>1</sub> AIA <sub>2</sub>	K <sub>1</sub> AIA <sub>3</sub>	K <sub>1</sub> AIA <sub>4</sub>
<b>4.65</b>	K <sub>2</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>2</sub> AIA <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> AIA <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> AIA <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> AIA <sub>4</sub>
<b>ANA (<math>\mu</math>M)</b>					
	<b>0.00</b>	<b>0.45</b>	<b>2.26</b>	<b>4.52</b>	<b>9.05</b>
<b>0.00</b>	K <sub>0</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>0</sub> 2,4D <sub>1</sub>	K <sub>0</sub> 2,4D <sub>2</sub>	K <sub>0</sub> 2,4D <sub>3</sub>	K <sub>0</sub> 2,4D <sub>4</sub>
<b>2.32</b>	K <sub>1</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>1</sub> 2,4D <sub>1</sub>	K <sub>1</sub> 2,4D <sub>2</sub>	K <sub>1</sub> 2,4D <sub>3</sub>	K <sub>1</sub> 2,4D <sub>4</sub>
<b>4.65</b>	K <sub>2</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>2</sub> 2,4D <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> 2,4D <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> 2,4D <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> 2,4D <sub>4</sub>
<b>2,4-D (<math>\mu</math>M)</b>					
	<b>0.00</b>	<b>0.45</b>	<b>2.26</b>	<b>4.52</b>	<b>9.05</b>
<b>0.00</b>	K <sub>0</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>0</sub> ANA <sub>1</sub>	K <sub>0</sub> ANA <sub>2</sub>	K <sub>0</sub> ANA <sub>3</sub>	K <sub>0</sub> ANA <sub>4</sub>
<b>2.32</b>	K <sub>1</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>1</sub> ANA <sub>1</sub>	K <sub>1</sub> ANA <sub>2</sub>	K <sub>1</sub> ANA <sub>3</sub>	K <sub>1</sub> ANA <sub>4</sub>
<b>4.65</b>	K <sub>2</sub> Aux <sub>0</sub>	K <sub>2</sub> ANA <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> ANA <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> ANA <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> NAA <sub>4</sub>

#### 6.4 Mantenimiento y estabilidad de los cultivos

Los tratamientos que indujeron los más altos porcentajes de callo blanco friable (KIN 2.32  $\mu$ M + 2,4-D 0.45  $\mu$ M) o callo blanco rizogénico (KIN 2.32  $\mu$ M + NAA 9.05  $\mu$ M) fueron seleccionados con la finalidad de establecer líneas celulares, transfiriéndose la biomasa a medio nuevo (de inducción) mensualmente para su propagación (etapa de mantenimiento). Las características fenotípicas de las líneas celulares, como el color, la friabilidad y la proliferación, fueron monitoreadas durante la etapa de mantenimiento. Cuando dichas características fueron diferentes, se hizo una separación: el callo nuevo (callo verde formando

agregados desarrollado del callo blanco rizogénico) fue crecido en el mismo medio de cultivo (KIN 2.32  $\mu$ M + NAA 9.05  $\mu$ M), mientras que el callo blanco rizogénico fue crecido en medio de cultivo libre de RCV. Una vez que varios ciclos de subcultivo transcurrieron, cuando las diferencias en el fenotipo no fueron observables en las 3 líneas celulares desarrolladas (callo blanco friable, callo verde formando agregados y raíces), su estabilidad fue inferida mediante la estimación de los parámetros de crecimiento: tiempo de duplicación (td), velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) e índice de crecimiento (IC) durante 3 ciclos de subcultivo continuos (Bourgaud y col., 2001). La determinación de dichos parámetros consistió en la ejecución de cinéticas de crecimiento para cada línea establecida. Se cuantificó el peso fresco y seco (PF y PS, respectivamente) en 15 intervalos distribuidos a lo largo de 40 días de cultivo. td y  $\mu$  fueron estimados de las mediciones efectuadas durante la etapa de crecimiento exponencial, de acuerdo a Quintero (1993; anexo 3), mientras que IC (Ec. 1) fue calculado gravimétricamente cuando se alcanzó la biomasa máxima (BM). Las mediciones efectuadas en cada intervalo fueron obtenidas de 3 frascos (n=3), cada uno inoculado con 2 g de biomasa fresca. Una vez estimados los parámetros de crecimiento por cada línea se corroboró que éstos no presentaran diferencias significativas (por ANOVA) entre los 3 valores calculados por línea celular durante los 3 subcultivos. Finalmente, se efectuó el análisis sobre la producción de fenilpropanoides.

$$IC = \frac{(PS \text{ de BM}) - (PS_{\text{inicial}})}{PS_{\text{inicial}}} \dots\dots (Ec. 1)$$

### **6.5 Extracción de fenilpropanoides**

Biomasa fresca proveniente de cada línea celular establecida (callo blanco friable o verde formando agregados, y raíz; provenientes de la etapa estacionaria de crecimiento) y hojas de la planta (fuente de explantes) fueron liofilizados, y extraídos (100 mg en peso seco) con MeOH (50 ml) en ebullición durante 1 h. Posteriormente los extractos obtenidos fueron filtrados y concentrados (volumen final de 10 ml) bajo presión reducida. La biomasa empleada para obtener los

extractos metanólicos provino de un frasco u hoja, siendo 3 de ellos usados para cada medición (n=3).

## **6.6 Determinación de fenilpropanoides por TLC y HPLC**

### **6.6.1. TLC**

Con la finalidad de evaluar la producción cualitativa de los fenilpropanoides (linarina, verbascósido y los ácidos hidrocínámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sináptico) los extractos metanólicos concentrados correspondientes a los cultivos *in vitro* de *B. cordata* y estándares fueron colocados en cromatoplasmas de sílica gel F<sub>254</sub>. Se empleó una mezcla de Diclorometano:MeOH (9:1) como fase móvil (corridas por 5 veces). Las cromatoplasmas se revelaron con luz UV a longitudes de onda de 254 y 356 nm. Los valores del factor de retención (R<sub>f</sub>, Ec. 2) estimados para cada estándar fueron empleados para identificar los fenilpropanoides en las muestras analizadas. Cada cromatoplasma fue corrida por triplicado (n=3)

$$R_f = \frac{\text{Distancia de migración de la sustancia}}{\text{Distancia de migración de la fase móvil}} \dots\dots (Ec. 2)$$

### **6.6.2 Preparación de estándares y condiciones de trabajo para HPLC**

Con la finalidad de evaluar la producción cuantitativa de los fenilpropanoides (linarina, verbascósido y los ácidos hidrocínámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sináptico) y así poder seleccionar la línea celular más productora, los estándares y extractos metanólicos concentrados correspondientes a los cultivos *in vitro* y hojas (provenientes de la planta proveedora de explantes) de *B. cordata* fueron manejados como se describe a continuación. Soluciones stock de los estándares (0.2 mg ml<sup>-1</sup>) de verbascósido, linarina (Extrasynthese, Francia) y los ácidos hidroxicinámicos: caféico, p-coumárico, ferúlico y sinápico (Sigma Chem. Co. EUA) fueron preparados en MeOH. Cada solución stock fue diluida para obtener concentraciones de 40, 80, 120 y 160 µg ml<sup>-1</sup>, las cuales fueron utilizadas para obtener una curva de calibración, donde el tiempo de retención y el área del pico fueron datos empleados para detectar, identificar y cuantificar cada fenilpropanoide en las muestras analizadas. El equipo de HPLC empleado para el análisis cuantitativo de fenilpropanoides consistió de un Cromatógrafo de líquidos

Agilent Technologies serie 1100 con bomba cuaternaria (G1311A; Alltech Co. USA), equipado con una columna Platinum EPS-C<sub>18</sub> (7 mm x 53 mm, 3 $\mu$ ; Alltech Co. USA) y un detector de arreglo de fotodiodos (DAD, G1315B; Alltech Co. USA). Cada muestra de extracto metanólico concentrado y soluciones estándar, fueron filtradas (0.45  $\mu$ m, filtro de nylon) antes de ser inyectadas en el equipo de HPLC. Las condiciones de trabajo fueron efectuadas de acuerdo al procedimiento realizado por Li y col. (2005), con algunas modificaciones. La fase móvil consistió de una solución al 2% (v/v) de ácido acético (A) y acetonitrilo (B), un volumen de inyección de 5  $\mu$ l, un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> y una longitud de onda de 334 nm para DAD. El sistema fue corrido con un programa en gradiente para la fase móvil como sigue: de 100% a 75% de A durante 20 min, de 75% a 0% de A durante 5 min y finalmente de 0% a 100% de A durante 5 min. Los extractos metanólicos concentrados de las muestras y soluciones de cada estándar fueron corridos en la misma manera. El software cromatográfico CHEMSTATION (Rev. A.08.03; Agilent Technologies) fue utilizado para la adquisición de datos del detector. Cada muestra fue inyectada tres veces (n=3)

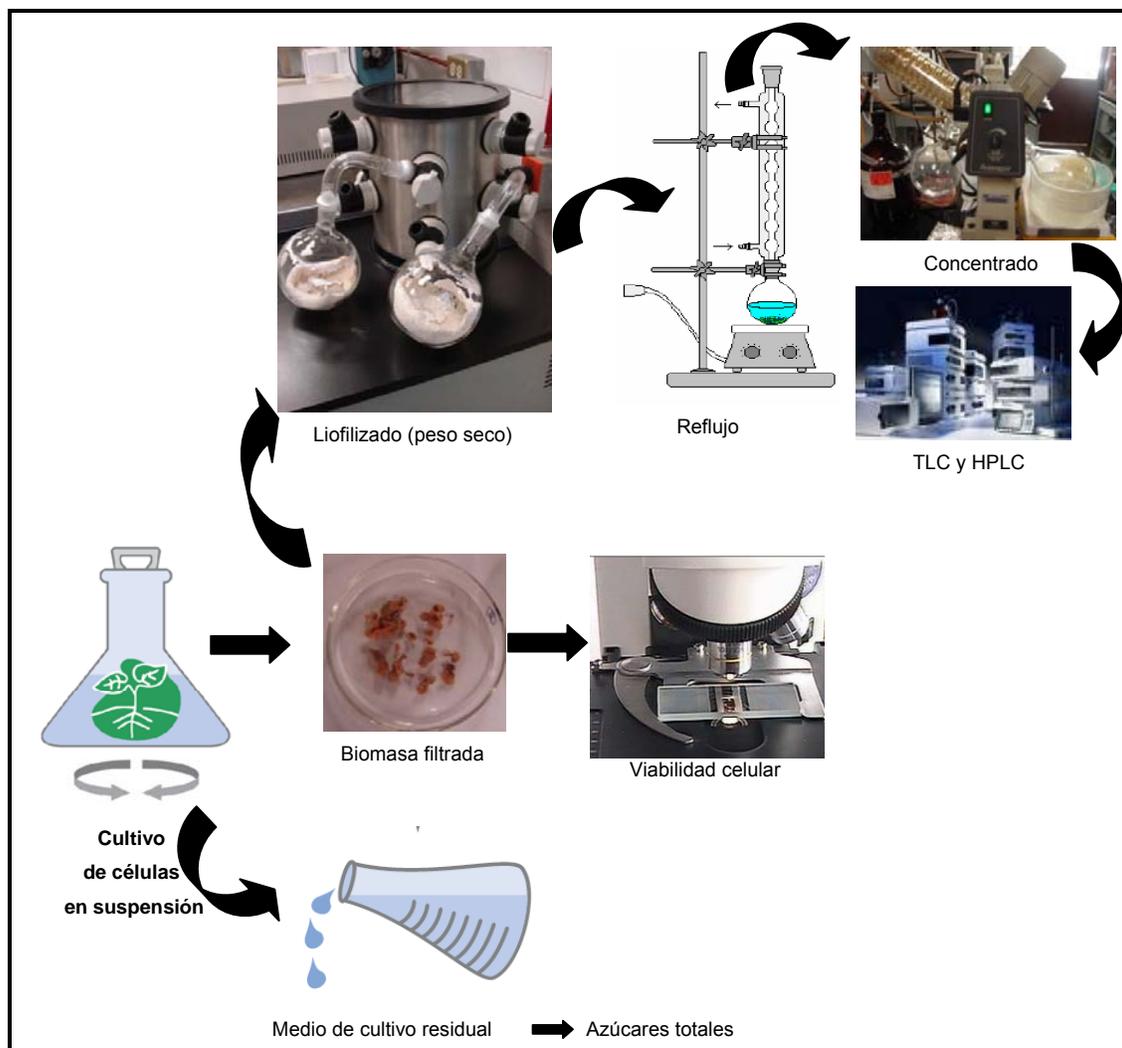
### **6.7 Establecimiento de cultivos de células en suspensión**

Se seleccionó la línea celular que presentó la mayor producción de linarina, verbascósido y los ácidos hidrocínámicos: p-cumárico, caféico, ferúlico y sináptico (callo blanco friable) para establecer cultivos de células en suspensión. Callo blanco friable (3 g peso fresco) fue transferido a matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo líquido (medio basal suplementado con KIN 2.32  $\mu$ M + 2,4-D 0.45  $\mu$ M, sin phytigel). Los matraces fueron puestos en un agitador orbital a 110 rpm e incubados a 26 $\pm$  2°C bajo un fotoperíodo de 16 h luz (30  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Una vez que se logró obtener un cultivo visualmente homogéneo, la biomasa fue propagada mediante la cosecha al día 18 de cultivo de 6 g de biomasa fresca (filtrada con disociador celular), la cual fue inoculada en matraces Erlenmeyer de 500 ml (conteniendo 100 ml del mismo medio de cultivo). Varios ciclos de subcultivo fueron llevados a cabo cada 18-20 d con la finalidad de proliferar la biomasa para poder caracterizar el crecimiento celular y la producción de fenilpropanoides mediante cinéticas (Fig. 7).

### 6.7.1. Cinéticas de crecimiento

Se establecieron cultivos en lote para la realización de las cinéticas (corridas bajo las mismas condiciones de cultivo mencionadas en el apartado anterior), donde, mediante la medición de viabilidad celular, peso fresco y seco, y azúcares totales se determinaron los parámetros de crecimiento (en la fase de crecimiento exponencial):  $\mu$ , td, IC, BM, rendimiento de biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{X/S}$ ) y mediante la cuantificación de fenilpropanoides se determinó el parámetro de la velocidad específica de producción de fenilpropanoides ( $q_p$ ; en la fase de crecimiento exponencial) (Fig. 7). El tiempo del cultivo en lote fue de 30 d, el cual se dividió en 12 intervalos en los que las mediciones fueron efectuadas. Para cada punto de medición un matraz Erlenmeyer de 250 ml fue inoculado con 3 g de células filtradas con un disociador celular (provenientes de matraces de 500 ml cultivados por 18 días), siendo éste procedimiento hecho por triplicado ( $n=3$ ). La metodología seguida para cada punto de medición consistió en: obtención del peso fresco mediante la filtración al vacío de los cultivos de células en suspensión. El peso seco fue obtenido una vez que las células filtradas fueron liofilizadas. Por otro lado, una muestra de células filtradas (200 mg) fue diluida en 1 ml de agua y mezclada en proporción 1:1 con el reactivo Azul de Evans (solución al 0.25% w/v). Las células vivas y muertas (teñidas con el reactivo) fueron contadas en una cámara de Neubauer con la finalidad de estimar el porcentaje de viabilidad celular (% VC, Ec. 3). Al medio de cultivo residual del filtrado se le determinó el contenido de azúcares totales mediante el método fenol-sulfúrico (Dubois y col. 1956; ver anexo 3). Finalmente, células liofilizadas (100 mg) fueron empleadas para la cuantificación de fenilpropanoides de acuerdo a la metodología descrita en los puntos 5.5 y 5.6.2. Los parámetros  $\mu$  y  $q_p$  fueron calculados como lo indica Quintero (1993) (anexo 4).

$$\% VC = \frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totales}} \dots\dots (Ec. 3)$$



**Fig. 7** Metodología para la caracterización del crecimiento y producción de fenilpropanoides de los cultivos de células en suspensión

### 6.8 Estadística

El software NCSS fue empleado para el análisis estadístico de los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de inducción de callo y raíz, los parámetros de crecimiento y la concentración de fenilpropanoides. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba Tukey-Kramer de comparación múltiple de medias. Un valor de  $p$  menor a 0.05 fue asumido para diferencias significativas. Todos los experimentos y mediciones fueron hechos por triplicado.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION



### 7.1 Establecimiento de cultivos asépticos

Debido a que no se encontraron reportes en la literatura sobre el CTV de *B. cordata*, la etapa de establecimiento de cultivos asépticos consistió en evaluar el tiempo de acción de la solución de hipoclorito de sodio (0.6%, v/v) en explantes inmaduros foliares, tallos y semillas. Para el caso de las hojas se encontró que una inmersión de 15 minutos fue el mejor tratamiento ya que presentó una baja contaminación (menor al 1%).

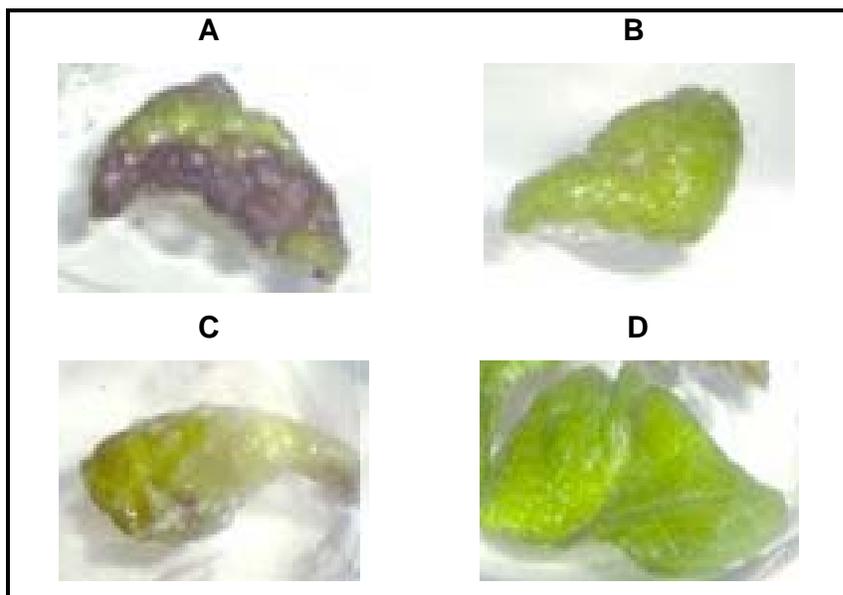
Para los tallos bajo dichas condiciones, se observó una alta contaminación, mientras que para las semillas la asepsia fue obtenida pero no se observó su germinación (datos no presentados). Por lo tanto, los explantes de hoja inmaduros fueron el material vegetal fuente de explantes para posteriores experimentos.

Los explantes presentaron problemas de oxidación debidos al estrés de corte al que se sometieron las hojas cuando fueron incubados. La oxidación se agudizó al transcurrir el tiempo de incubación, encontrándose que al día 14 de incubación más del 90% de los explantes presentaban severos daños (Fig. 8A), mismos que provocaron su muerte en los días siguientes de cultivo (Tabla 1). Con el fin de eliminar la oxidación de explantes se evaluó la adición de una solución antioxidante conteniendo ácido cítrico y ascórbico (100 y 150 mg l<sup>-1</sup>, respectivamente) en i) la inmersión en solución antioxidante por 10 min y su adición al momento de segmentar y/o ii) adición en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que la inmersión y segmentación en solución antioxidante es en gran medida un paso clave en la obtención de segmentos viables ya que bajo dicha condición se obtuvo el porcentaje más alto (90.8 - 96.2; Tabla 1) (Fig. 8A-D) al día 20 de incubación. Cuando la solución antioxidante estuvo contenida únicamente en el medio de cultivo, el porcentaje de explantes viables fue del 58.3% (Tabla 1), los cuales presentaron problemas de oxidación de leves a moderados (Fig. 8C). No obstante, la combinación de la adición de antioxidantes durante la inmersión, segmentación y en el medio de cultivo no sólo produjo el porcentaje más alto de explantes viables (96.2), sino también produjo la elongación de los explantes (Fig. 8D), característica que no fue visible en aquellos explantes probados para el resto de los tratamientos (Fig. 8A - C). Posiblemente los procesos de inmersión y segmentación con la solución antioxidante eliminaron los compuestos tóxicos producidos por estrés de corte, como lo son los polifenoles (característicos de las plantas leñosas) (Buchanan y col., 2000).

**Tabla 1.** Efecto de la adición de la solución antioxidante durante el proceso de segmentación y/o en el medio de cultivo sobre el porcentaje de explantes viables evaluados después de 20 días de incubación

TRATAMIENTOS	% de Explantes viables		
	Antioxidante en inmersión y segmentación		
		<u>Sin adición</u>	<u>Con adición</u>
Antioxidante en medio de cultivo	<u>Sin adición</u>	6.7 ± 1.2 <sup>c</sup>	90.8 ± 2.3 <sup>a</sup>
	<u>Con adición</u>	58.3 ± 3.4 <sup>b</sup>	96.2 ± 3.5 <sup>a</sup>

Las medias (± DS) del % de explantes viables indicadas con la misma letra muestran que ellas no son significativamente diferentes a un nivel de significancia del 5%



**Fig. 8 A-D** Características de los explantes cultivados 20 días después de ser tratados con solución antioxidante durante el proceso de inmersión y segmentación (AIS) y/o en el medio de cultivo (AMC). **A** Control: sin AIS & sin AMC, **B** con AIS & sin AMC, **C** sin AIS & con AMC, **D** con AIS & AMC

## 7.2 Inducción de callo y raíz en explantes foliares inmaduros

Los tratamientos conteniendo únicamente citocinina ( $K_1Aux_0$ ,  $K_2Aux_0$ ) y el control ( $K_0Aux_0$ ) no indujeron ninguna respuesta (callo o morfogénica) en los explantes foliares inmaduros (Tabla 2) (Fig. 9A). Sin embargo, se observó que el tipo de

auxina y su combinación con la citocinina, además de la concentración, indujeron las respuestas de callo y raíz vía organogénesis directa e indirecta sobre los explantes (Fig. 9B - F) (Tabla 2).

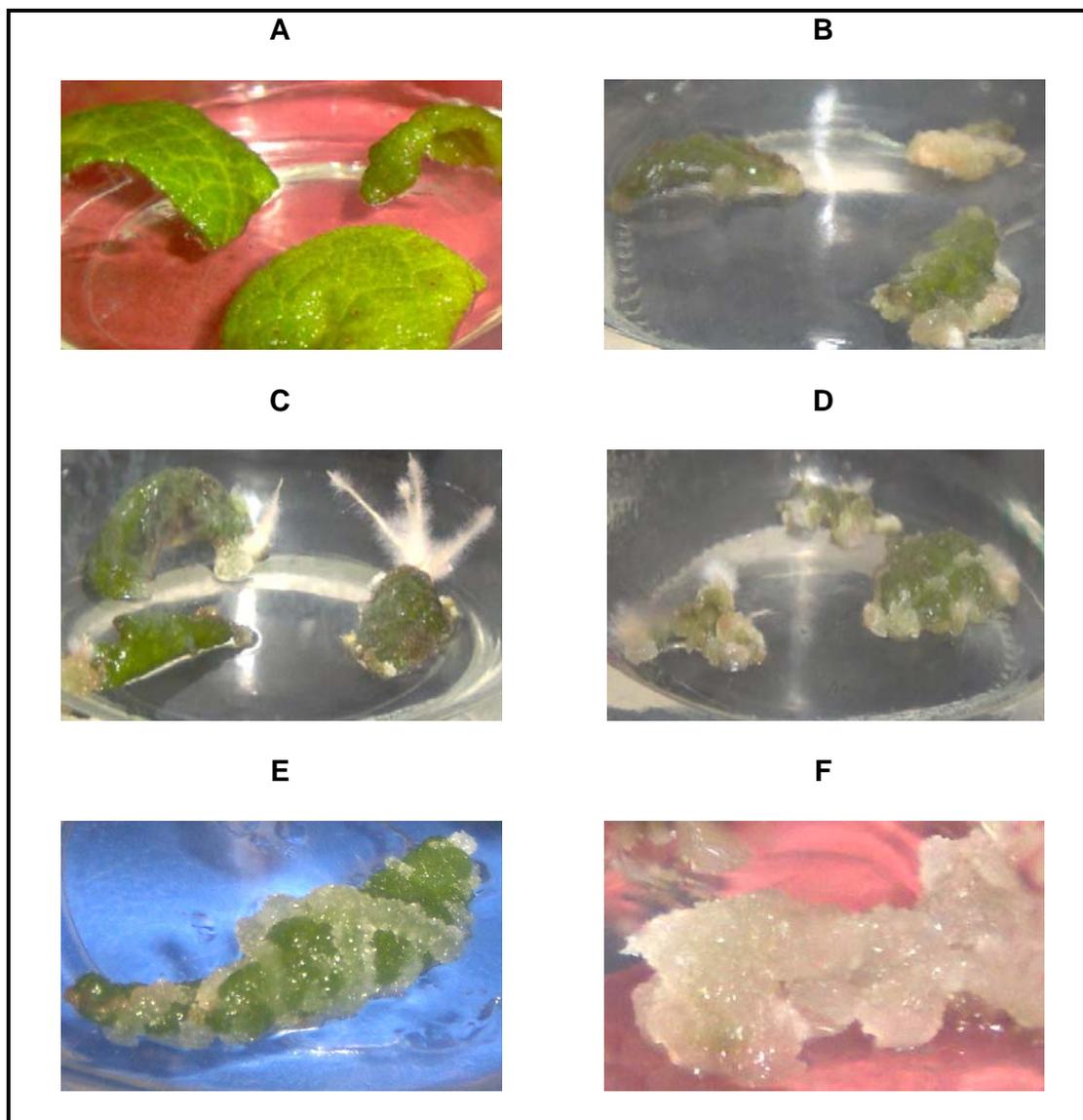
Las características fenotípicas de callo y raíz para dichos tratamientos fueron: callo de apariencia blanca y friable con rápida proliferación (Fig. 9B), mientras que la raíz fue pilosa y blanca, siendo más larga cuando ésta fue inducida vía organogénica directa (Fig. 9C y D, respectivamente). La inducción de ambas respuestas inició generalmente en las partes del explante donde ocurrió el corte (Fig. 9B - D) y gradualmente el callo se extendió por el sistema vascular de los explantes (Fig. 9E) hasta cubrir todo el explante (Fig. 9F). La inducción fue visible después de 3 semanas de cultivo para los tratamientos conteniendo KIN+ANA ( $K_xANA_y$ ), mientras que una semana más tarde, algunos tratamientos de KIN+ANA que indujeron callo desarrollaron raíz ( $K_1ANA_4$   $K_2ANA_4$ ), mismo tiempo en el que la inducción inició en los tratamientos conteniendo KIN+AIA ( $K_xAIA_y$ ) y KIN+2,4-D ( $K_x2,4D_y$ ) (Tabla 2).

Las auxinas sintéticas ANA y 2,4-D indujeron porcentajes de respuesta de callo y raíz mayores a los obtenidos con la auxina natural AIA (Tabla 2), respuesta que incrementó significativamente cuando KIN fue adicionada. Se determinó que los porcentajes más altos de inducción ocurrieron para: A) callo (76.4 - 84.3) con los tratamientos  $K_12,4D_1$ ,  $K_12,4D_2$ ,  $K_12,4D_3$ ,  $K_12,4D_4$  y  $K_22,4D_4$ , y B) raíz con el tratamiento  $K_1ANA_3$  (29.8 %) vía organogénesis directa y  $K_1ANA_4$  vía organogénesis indirecta (79.6 %) (Tabla 2). Los resultados pueden ser atribuidos al hecho de que las auxinas sintéticas son más estables bajo condiciones físicas y enzimáticas degradantes que la auxina natural AIA (Pierik, 1990).

**Tabla 2.** Porcentaje de callo y raíz inducidos en explantes de hoja inmadura bajo distintos niveles de auxina con citocinina después de 30 días de cultivo

Código del tratamiento	RCV ( $\mu\text{M}$ )	% de la respuesta inducida		
		Callo	Raíz	
			Directa	Indirecta
<b>KIN</b>				
K <sub>0</sub> Aux <sub>0</sub>	0.00	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> Aux <sub>0</sub>	2.32	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> Aux <sub>0</sub>	4.65	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>KIN AIA</b>				
K <sub>0</sub> AIA <sub>1</sub>	0.00	0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> AIA <sub>2</sub>	0.00	2.26	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> AIA <sub>3</sub>	0.00	4.52	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> AIA <sub>4</sub>	0.00	9.05	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.4 <sup>c</sup>
K <sub>1</sub> AIA <sub>1</sub>	2.32	0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> AIA <sub>2</sub>	2.32	2.26	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> AIA <sub>3</sub>	2.32	4.52	13.7 ± 1.6 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> AIA <sub>4</sub>	2.32	9.05	7.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	7.6 ± 2.0 <sup>b</sup>
K <sub>2</sub> AIA <sub>1</sub>	4.65	0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> AIA <sub>2</sub>	4.65	2.26	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> AIA <sub>3</sub>	4.65	4.52	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> AIA <sub>4</sub>	4.65	9.05	9.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>KIN 2,4-D</b>				
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>1</sub>	0.00	0.45	7.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>2</sub>	0.00	2.26	11.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>3</sub>	0.00	4.52	17.8 ± 1.1 <sup>c</sup>	7.0 ± 1.5 <sup>b</sup>
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>4</sub>	0.00	9.05	20.4 ± 1.9 <sup>c</sup>	11.1 ± 0.0 <sup>c</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>1</sub>	2.32	0.45	76.4 ± 2.1 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>2</sub>	2.32	2.26	81.5 ± 1.9 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>3</sub>	2.32	4.52	83.8 ± 2.8 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>4</sub>	2.32	9.05	84.3 ± 2.4 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>1</sub>	4.65	0.45	47.2 ± 2.8 <sup>e</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>2</sub>	4.65	2.26	65.7 ± 3.3 <sup>f</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>3</sub>	4.65	4.52	74.1 ± 2.0 <sup>f</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>4</sub>	4.65	9.05	79.6 ± 1.9 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
<b>KIN ANA</b>				
K <sub>0</sub> ANA <sub>1</sub>	0.00	0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> ANA <sub>2</sub>	0.00	2.26	10.2 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> ANA <sub>3</sub>	0.00	4.52	22.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	11.1 ± 0.0 <sup>c</sup>
K <sub>0</sub> ANA <sub>4</sub>	0.00	9.05	31.9 ± 1.4 <sup>d</sup>	22.2 ± 2.1 <sup>d</sup>
K <sub>1</sub> ANA <sub>1</sub>	2.32	0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	7.4 ± 1.9 <sup>b</sup>
K <sub>1</sub> ANA <sub>2</sub>	2.32	2.26	9.3 ± 3.2 <sup>b</sup>	8.3 ± 2.1 <sup>b</sup>
K <sub>1</sub> ANA <sub>3</sub>	2.32	4.52	47.3 ± 3.5 <sup>e</sup>	29.8 ± 2.2 <sup>e</sup>
K <sub>1</sub> ANA <sub>4</sub>	2.32	9.05	6.9 ± 3.7 <sup>b</sup>	8.3 ± 1.6 <sup>b</sup>
K <sub>2</sub> ANA <sub>1</sub>	4.65	0.45	24.1 ± 3.2 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> ANA <sub>2</sub>	4.65	2.26	33.7 ± 2.9 <sup>d</sup>	15.9 ± 0.7 <sup>c</sup>
K <sub>2</sub> ANA <sub>3</sub>	4.65	4.52	50.5 ± 0.5 <sup>e</sup>	11.1 ± 0.0 <sup>c</sup>
K <sub>2</sub> NAA <sub>4</sub>	4.65	9.05	57.9 ± 2.5 <sup>e</sup>	7.9 ± 1.2 <sup>b</sup>

En una columna, las medias ( $\pm$  DS) indicadas con la misma letra no son estadísticamente diferentes a un nivel de significancia del 5%



**Fig. 9 A-F** Callo y raíz inducidos en explantes de hoja inmadura de *B. cordata* bajo la adición de AIA, ANA y 2,4-D con KIN. **A** Control y explantes bajo KIN, **B** Inicio de la inducción de callo blanco y friable, **C** Inducción de raíz blanca y pilosa por organogénesis directa e **D** indirecta después de 3 semanas de incubación, **E** Extensión de callo en el sistema vascular y, **F** callo desarrollado en todo el explante

Los resultados para *B. cordata* mostraron que 2,4-D fue más efectivo que ANA para inducir callo, respuesta que fue similar a la reportada para *Rehmania glutinosa* (Scrophulariaceae; Shoyama y col., 1986) y *Aphelandra* sp. (Acanthaceae; Nezbedova y col., 1999), especies pertenecientes al orden de las Scrophulariales, orden al que pertenece la familia Buddlejaceae. Sin embargo no

hay reportes referentes a la influencia de ANA sobre la inducción de raíz para especies asociadas taxonómicamente, ni tampoco para los porcentajes de inducción de callo. Tal vez los explantes foliares inmaduros de *B. cordata* tienen una alta afinidad con las proteínas transportadoras o receptoras de auxinas, la cual pudo afectar la ruta de transducción y consecuentemente los porcentajes de respuesta de raíz inducida (Kepinski, 2006). Los resultados mostrados en este trabajo muestran la importancia de explorar diversos RCV cuando el propósito es la inducción de callo o respuestas morfogénicas ya que la capacidad de inducción de un explante depende de sus características genéticas, bioquímicas, fisiológicas y totipotenciales (Pierik, 1990).

### **7.3 Mantenimiento y estabilidad de las líneas celulares**

Dos líneas celulares derivadas de los tratamientos que indujeron los porcentajes más altos de inducción: callo blanco ( $K_{1,2,4D_1}$ ) y callo desarrollando raíz ( $K_1ANA_4$ ) fueron seleccionadas para su mantenimiento y posteriores experimentos. Para el caso del callo blanco, el tratamiento  $K_{1,2,4D_1}$  fue seleccionado como línea debido a que ninguna diferencia fenotípica fue observada entre los 5 tratamientos que produjeron el porcentaje más alto de callo blanco ( $K_{1,2,4D_1}$ ,  $K_{1,2,4D_2}$ ,  $K_{1,2,4D_3}$ ,  $K_{1,2,4D_4}$  y  $K_{2,2,4D_4}$ ). Después de 9 subcultivos en ambas líneas, se observó que el callo blanco rizogénico cambió fenotípicamente, formando agregados de callo verde, siendo éste crecido en el medio de cultivo  $K_1ANA_4$ , mientras que las raíces fueron aisladas y crecidas en medio de cultivo libre de RCV. Se mantuvieron las 3 líneas celulares (callo blanco friable, callo verde formando agregados y raíces) durante 9 subcultivos, tiempo en el que ningún cambio fenotípico fue observado, por lo que se procedió a efectuar cinéticas de crecimiento durante 3 subcultivos continuos con la finalidad de determinar los parámetros de crecimiento:  $\mu$ , td, IC. Los resultados obtenidos mostraron que se logró establecer tres líneas celulares durante el periodo de mantenimiento ya que no se encontraron diferencias entre los valores estimados para  $\mu$ , td, IC durante los 3 subcultivos analizados (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros de crecimiento determinados en tres subcultivos de las líneas celulares de *B. cordata*

Subcultivo	Parámetro de crecimiento	Líneas celulares		
		Callo blanco	Callo verde	Raíz
1ro.	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0.158±0.014	0.098±0.008	0.060± 0.011
	td (d)	4.395±0.396	7.100±0.552	11.541±0.756
	IC	5.941±0.522	4.311±0.379	3.901±0.261
2do.	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0.153±0.015	0.100±0.007	0.0614±0.016
	td (d)	4.525±0.452	6.918±0.463	11.2919±1.054
	IC	5.824±0.757	4.361±0.567	4.0990±0.455
3ro.	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0.161 ±0.013	0.095±0.008	0.0582±0.015
	td (d)	4.319±0.337	7.266±0.617	11.9151±1.058
	IC	6.071±0.345	4.255±0.242	3.9979±0.324
Media	$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0.157±0.004 <sup>c</sup>	0.098±0.002 <sup>b</sup>	0.0599±0.002 <sup>a</sup>
	td (d)	4.413±0.104 <sup>a</sup>	7.094±0.174 <sup>b</sup>	11.5827±0.173 <sup>c</sup>
	IC	5.945±0.124 <sup>c</sup>	4.309±0.053 <sup>b</sup>	3.9994±0.099 <sup>a</sup>

Dentro de una fila, las medias (± DS) de los parámetros de crecimiento de los cultivos *in vitro* indicadas con la misma letra muestran que ellas no son significativamente diferentes a un nivel de significancia del 5%

Con la finalidad de determinar diferencias en el crecimiento de las líneas celulares, se calculó la media de los 3 valores evaluados para  $\mu$ , td e IC correspondientes a su respectiva línea celular (Tabla 3). El análisis estadístico de dichos datos mostró que la línea celular de callo blanco fue la que presentó el crecimiento más rápido ( $\mu = 0.157$  d<sup>-1</sup>, td = 4.413 d) y el mayor incremento de biomasa (IC = 5.945) (ver filas en Tabla 3), mientras que la línea de callo rizogénico fue la que presentó el crecimiento más lento ( $\mu = 0.0599$  d<sup>-1</sup>, td = 11.5827 d) y el menor incremento de biomasa (IC = 3.9994). Los parámetros observados para el callo blanco friable de *B. cordata* fueron mejores a aquellos valores reportados para el callo de *Tecoma sambucifolium* ( $\mu = 0.126$  d<sup>-1</sup>, td = 5.5 d) (Pletsch y col., 1993), una especie relacionada cercanamente a la Familia Buddlejaceae. En términos generales, el cultivo *in vitro* puede ser muy estresante para las células vegetales desde el establecimiento del explante hasta la

reprogramación genética (inducción de callo o respuestas morfogénicas), por lo que es posiblemente que cambios a nivel genético ocurran (variación somaclonal) (Pierik, 1990). Al mismo tiempo, la ocurrencia de la variación somaclonal en callo puede afectar la producción de metabolitos secundarios (Bourgaud y col., 2001). En este sentido, la determinación de la variación somaclonal sería el procedimiento a efectuar para tener mayor confiabilidad sobre el análisis de la producción de metabolitos secundarios. Por otro lado, Bourgaud y col. (2001) recomienda evaluar la estabilidad de una línea celular mediante la determinación de los parámetros de crecimiento y de esta manera fue evaluada la estabilidad de las líneas generadas, ya que la determinación de la variación somaclonal requiere de marcadores fenotípicos, bioquímicos y moleculares, lo que esta fuera del alcance de este estudio. Las diferencias observadas en los valores de  $\mu$ , td e IC, así como en la apariencia del callo verde y blanco derivados ambos del tratamiento K<sub>1</sub>ANA<sub>4</sub> pudieran atribuirse a que ocurrió variación somaclonal. Skrzypek y Wysokińska (1997) reportaron que las características fenotípicas en callo rojo de *Penstemon serrulatus*, tales como el color, la velocidad de crecimiento y el patrón de producción de fenólicos pudieron ser empleadas como indicadores de estabilidad genética de dicha línea celular.

#### **7.4 Producción de fenilpropanoides en cultivos *in vitro* de *B. cordata***

Una vez verificada la estabilidad de las líneas celulares generadas, se procedió a evaluar cualitativamente la producción de los fenilpropanoides: verbascósido, linarina y ácidos hidroxicinámicos (caféico, ferúlico, p-coumárico y sinápico). Los resultados del análisis por TLC de los extractos metanólicos obtenidos para las 3 líneas celulares mostraron que, de acuerdo a los valores de R<sub>f</sub> obtenidos, aparentemente todos los fenilpropanoides fueron producidos (Tabla 4), esta observación debido a que los valores de R<sub>f</sub> determinados para los ácidos ferúlico y sinápico no fueron estadísticamente diferentes. Luego entonces la incertidumbre tomó lugar: ambos compuestos o solamente uno de ellos fue producido en las muestras analizadas. Otro resultado interesante, fue identificar al verbascósido como el compuesto producido en mayor proporción en los cultivos *in vitro* de *B. cordata* ya que la banda, correspondiente a dicho compuesto, presentó una

intensidad mayor a la observada para el resto de los fenilpropanoides. Con la finalidad de evaluar cuantitativamente la producción de fenilpropanoides y así poder seleccionar la línea más productora, se procedió a efectuar el análisis por HPLC.

**Tabla 4.** Valores de Rf obtenidos para los fenilpropanoides producidos en los cultivos *in vitro* de *B. cordata*

Compuesto	Valores de Rf			
	Estándar	Muestra		
		Callo blanco	Callo verde	Callo rizogénico
Linarina	30±0.5 <sup>b</sup>	30±1.0	31±0.8	32±1.3
Ac cafeico	45±0.8 <sup>c</sup>	46±0.9	46±0.4	47±1.6
Ac ferulico	93±0.9 <sup>e</sup>	92±1.2	92±1.8	93±1.4
Ac sinápico	91±1.3 <sup>e</sup>	92±1.2	92±1.8	93±1.4
Ac p-coumárico	73±0.6 <sup>d</sup>	74±0.8	74±0.9	74±1.1
Verbascósido	10±1.6 <sup>a</sup>	12±0.7	13±2.0	10±0.2

Dentro de la columna en la que se muestran los valores de Rf para los estándares, las medias ( $\pm$  DS) indicadas con la misma letra muestran que ellas no son significativamente diferentes a un nivel de significancia del 5%

### 7.5 Contenido de fenilpropanoides en líneas celulares y planta silvestre

De acuerdo a los tiempos de retención, se verificó que todos los cultivos *in vitro* (callo blanco friable, callo verde formando agregados y callo rizogénico) de *B. cordata* produjeron linarina y verbascósido mientras que no todos los ácidos hidroxicinámicos fueron detectados en dichos cultivos (Tabla 5). Se determinó que una producción alta de verbascósido ocurrió en los cultivos *in vitro* (66.24 - 86.26 mg g<sup>-1</sup> peso seco), mientras que para linarina y ácidos hidroxicinámicos la producción fue baja (2.12 - 3.01 y 0.95 - 2.57 mg g<sup>-1</sup> peso seco, respectivamente) (Tabla 5). Probablemente, el hecho de que algunos ácidos hidroxicinámicos no fueron detectados se debió a que estos son precursores en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides (Buchanan y col., 2000).

El contenido de fenilpropanoides en hojas de *B. cordata* fue comparado con el obtenido para los cultivos *in vitro* con la finalidad de evaluar la producción en dichos sistemas ya que se sabe que las hojas de tepozán son la parte de la planta empleada en la medicina tradicional para propósitos curativos. En términos generales, se encontró que los cultivos *in vitro* produjeron concentraciones más altas de fenilpropanoides que las hojas de *B. cordata* (Tabla 5). Por consiguiente, los cultivos *in vitro* representan una fuente potencial para la producción de fenilpropanoides en lugar de emplear plantas silvestres. Debido a que no sólo la producción más alta de verbascósido fue determinada en los cultivos de callo blanco, sino también el crecimiento más rápido e incremento de biomasa (Tabla 3), dicha línea fue seleccionada para su establecimiento en suspensión y posterior caracterización.

**Tabla 5.** Contenido de fenilpropanoides en extractos metanólicos de cultivos *in vitro* y hojas de *B. cordata*

Fenilpropanoide	Tr (min)	Contenido de fenilpropanoides de muestras de <i>B. cordata</i> (mg g <sup>-1</sup> peso seco)			
		Cultivos <i>in vitro</i>			
		Hojas	Callo blanco	Callo verde	Raíz
Ácido caféico	9.85	1.67±0.19 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	2.57±0.09 <sup>c</sup>
Ácido p-coumárico	12.74	1.88±0.02 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	1.13±0.05 <sup>b</sup>	2.31±0.38 <sup>c</sup>
Ácido ferúlico	14.5	5.55±0.20 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
Ácido sinápico	15.61	1.04±0.08 <sup>a</sup>	1.00±0.02 <sup>a</sup>	0.95±0.03 <sup>a</sup>	1.79±0.03 <sup>b</sup>
Verbascósido	15.98	10.10±1.48 <sup>a</sup>	86.26±1.97 <sup>c</sup>	66.24±1.17 <sup>b</sup>	68.29±10.06 <sup>b</sup>
Linarina	22.89	41.81±5.21 <sup>b</sup>	2.12±0.21 <sup>a</sup>	2.34±0.13 <sup>a</sup>	3.01±0.50 <sup>a</sup>

Dentro de una fila, las medias (± DS) indicadas con la misma letra muestran que ellas no son significativamente diferentes a un nivel de significancia del 5%. Tr = Tiempo de retención

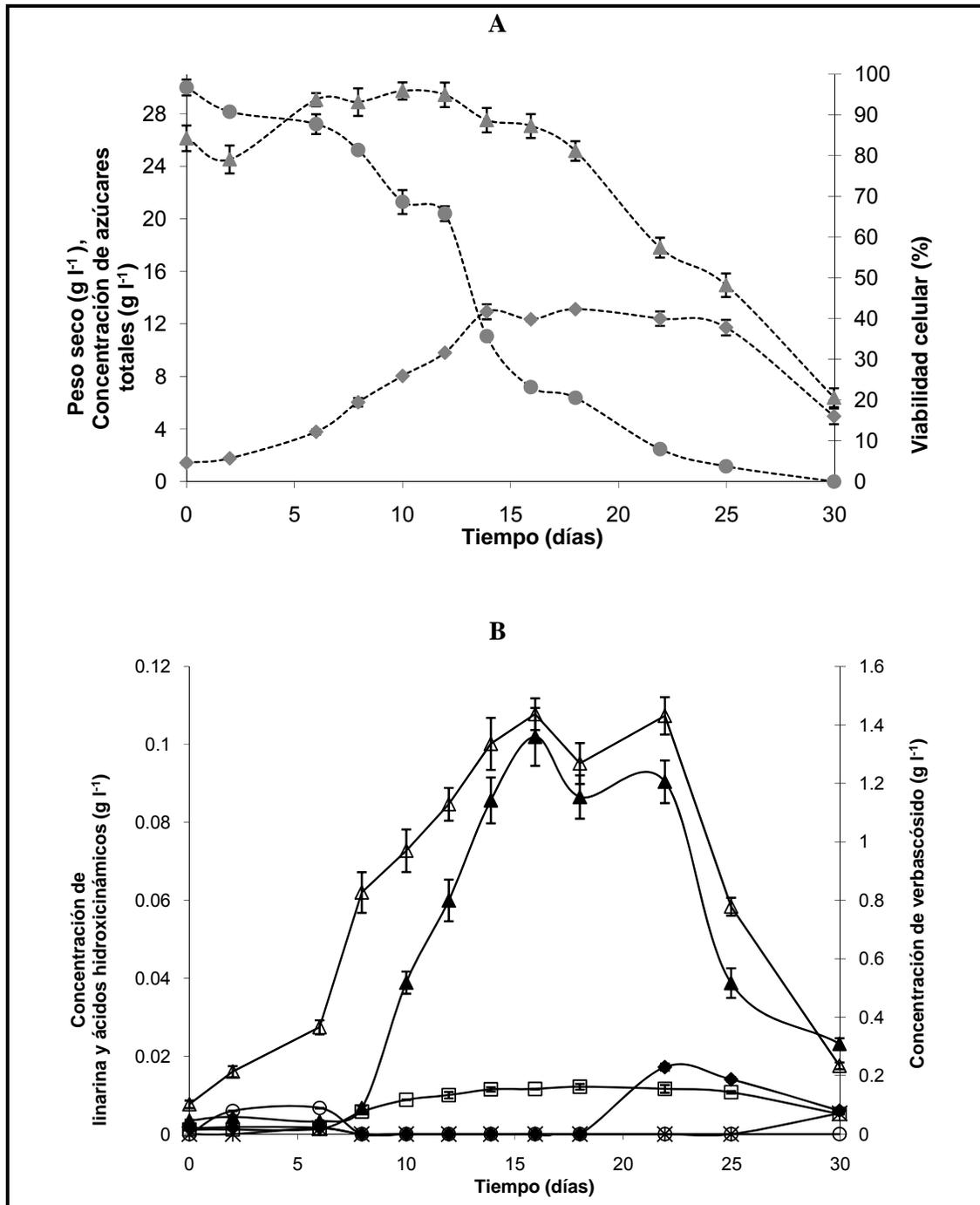
### 7.6 Establecimiento de cultivos de células en suspensión

Los cultivos en suspensión fueron mantenidos y propagados mediante la ejecución de 10 ciclos de subcultivo, tiempo en el que se procedió a caracterizar su crecimiento y patrón de producción de fenilpropanoides. En términos generales, se observó un típico patrón de crecimiento (Fig. 10 A). Durante la fase de crecimiento exponencial (días 4 a 14 de cultivo, Fig. 10 A) se obtuvo una

máxima concentración de biomasa (BM) de 12.93 g peso seco l<sup>-1</sup> después de 14 días de cultivo (Fig. 10 A), cuyo valor de rendimiento de biomasa con respecto al sustrato ( $Y_{X/S}$ ) fue de 0.68 g g<sup>-1</sup>, mientras que el índice de crecimiento (IC) fue de 8.14 y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) alcanzada fue de 0.1945 d<sup>-1</sup> (correspondiente a un valor de  $t_d = 3.65$  d).

Se observó que la producción de linarina y verbascósido estuvieron asociadas al crecimiento (Fig. 10 A,B) debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los valores observados para las velocidades específicas de producción ( $qp_v = 0.2135 \pm 0.0275$  d<sup>-1</sup> y  $qp_L = 0.1823 \pm 0.0266$  d<sup>-1</sup>, respectivamente) y el valor estimado para la velocidad específica de crecimiento ( $\mu = 0.1945 \pm 0.0096$  d<sup>-1</sup>). La producción de dichos metabolitos alcanzó los niveles máximos de producción (116.36 mg g<sup>-1</sup> peso seco, equivalente a 1.44 g l<sup>-1</sup> para verbascósido; y 8.26 mg g<sup>-1</sup> peso seco, equivalente a 0.10 g l<sup>-1</sup> para linarina) durante los días 16 - 22 de cultivo (Fig. 10 B). Por otro lado se encontró que la producción de ácidos hidroxicinámicos no estuvo asociada al crecimiento (Fig. 10 A,B) debido quizás a que éstos son precursores de la linarina y el verbascósido. Este hecho puede ser establecido mediante la observación de cambios en los patrones de producción de los fenilpropanoides en puntos de tiempo específicos durante el cultivo (fig. 10 A,B).

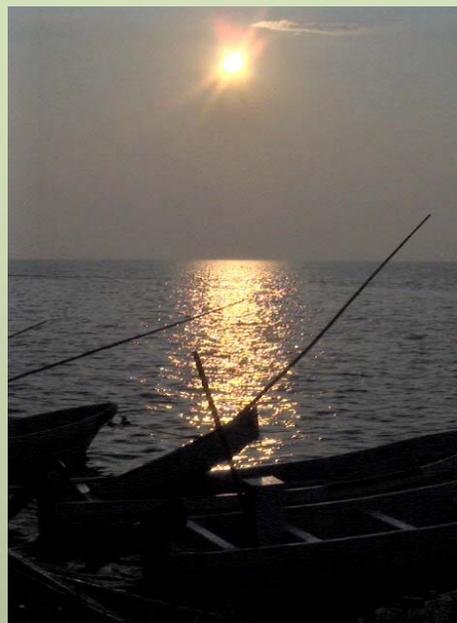
La concentración de verbascósido en los cultivos en suspensión de *B. cordata* fue similar a aquellas reportadas para otros cultivos de células en suspensión (Ellis, 1983; Inagaki y col. 1991; Skrzypek y Wysokińska 1999; Nezbedova y col. 1999), así que dicha producción observada en este trabajo puede ser considerada eficiente. En dichos reportes no evaluaron la viabilidad celular y el parámetro  $Y_{X/S}$ . Es recomendado calcular  $Y_{X/S}$  cuando se diseñan experimentos, ya que este valor depende del tipo de célula cultivada y de las condiciones de crecimiento (Quintero, 1993). El valor observado de 0.68 g g<sup>-1</sup> para  $Y_{X/S}$  para los cultivos celulares establecidos en este trabajo estuvo cerca a los límites más altos reportados para los cultivos celulares de plantas, como por ejemplo el de 0.78 g g<sup>-1</sup> reportado para *Catharanthus roseus* (Pareilleux y Vinas, 1983).



**Fig. 10** Crecimiento y producción de fenilpropanoides en cultivos de células en suspensión de *B. cordata*. **A** Crecimiento: (—◆—) peso seco, (—●—) azúcares totales y (—▲—) viabilidad celular, **B** Producción de fenilpropanoides: (—△—) verbascósido, (—▲—) linarina, (—□—) ácido sinápico, (—◆—) ácido cafeico, (—\*—) ácido p-coumárico y (—○—) ácido ferúlico. Los datos mostrados son el promedio (± DS) de las mediciones efectuadas por triplicado

Se sabe que la producción de verbascósido es con frecuencia potenciada por condiciones de estrés biótico y abiótico (elicitación, incremento en las concentraciones de sacarosa, variaciones en las concentraciones de RCV o nutrientes minerales) (Oksman-Caldentey e Inze, 2004; Nezbedova y col., 1999; Skrzypek y Wysokińska, 1999; Pletsch y col., 1993; Dell y col., 1989), por lo que puede asumirse que la producción de verbascósido por cultivos *in vitro* de *B. cordata* podrá ser mejorada significativamente al implementar dichas condiciones de estrés. Otras condiciones experimentales que pueden ser prometedoras para incrementar la producción de verbascósido son la intensidad de luz, la temperatura y el uso de agentes químicos que alteran la permeabilidad de la membrana, condiciones conocidas y empleadas en cultivos *in vitro* con la finalidad de incrementar la producción de metabolitos secundarios (Orozco-Sánchez y Rodríguez-Monroy, 2007). Ninguna de dichas condiciones fue empleada en este trabajo ya que la evaluación de éstas no fue parte del objetivo de este trabajo. Sin embargo futura investigación puede ser llevada a cabo en ese sentido, además de la transformación de los cultivos rizogénicos de *B. cordata* ya que dicho proceso podría no sólo mejorar la  $\mu$ , sino también incrementar el crecimiento y la producción de verbascósido (Wysokińska y Rozga, 1998). Además la investigación en cultivos de raíz de *B. cordata* puede ser extendida a la producción de compuestos bioactivos del tipo terpenoide ya que éstos han sido aislados de raíces de plantas de tepozán silvestres (Houghton y col., 2003)

## 8. CONCLUSIONES



Altos porcentajes de callo (76.4 – 84.3) y raíz (79.6) fueron observados como respuestas inducidas en explantes foliares inmaduros de *B. cordata*.

La inducción de callo fue obtenida al aplicar 2,4-D 0.45 $\mu$ M con KIN 2.32  $\mu$ M, mientras que ANA 9.05  $\mu$ M con KIN 2.32  $\mu$ M indujeron la formación de raíz.

Tres líneas celulares de cultivo *in vitro* fueron establecidas: callo blanco friable, callo verde formando agregados y raíz.

Todas las líneas celulares tuvieron la capacidad de producir verbascósido, linarina y algunos ácidos hidroxicinámicos.

El metabolito verbascósido fue detectado como el principal fenilpropanoide acumulado en dichos cultivos *in vitro*, siendo la concentración de 86.26 mg g<sup>-1</sup> el valor más alto evaluado en el cultivo de callo blanco friable.

Las concentraciones de linarina y ácidos hidroxicinámicos fueron relativamente bajas (2.12 - 3.01, y 0.95 - 2.57 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) en comparación a la observada para verbascósido.

Cultivos de células en suspensión fueron establecidos a partir de callo blanco friable, cuyos patrones de crecimiento y producción de fenilpropanoides fueron caracterizados.

La producción de verbascósido y linarina fue asociada al crecimiento ( $q_p = 0.2135$  y  $0.1823$  d<sup>-1</sup>, respectivamente;  $\mu = 0.1945$  d<sup>-1</sup>), alcanzando su producción más alta (116.36 y 8.26 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente) cuando el cultivo se encontraba en la etapa estacionaria de crecimiento.

Los cultivos de callo y raíz representan sistemas apropiados para la producción de verbascósido dado que éstos produjeron concentraciones significativamente más altas en comparación a aquellas encontradas en la planta silvestre de *B. cordata* (10.10 mg g<sup>-1</sup>).

## 9. PERSPECTIVAS



El establecimiento exitoso de cultivos de líneas celulares de callo y raíz representa el inicio de futuras investigaciones biotecnológicas de cultivos de tejido de *B. cordata* encaminadas a la producción de metabolitos secundarios.

Las altas concentraciones evaluadas para la producción de verbascósido podrían ser potenciadas no sólo mediante la evaluación de factores estresantes, sino también por el empleo de la ingeniería genética mediante el conocimiento y control de la ruta de biosíntesis, lo cual podría encaminarse también al incremento de la producción de linarina.

La técnica de transformación de raíces puede representar un sistema adecuado para la producción de fenilpropanoides y probablemente también para los metabolitos tipo terpenoide.

Además la aplicación de dichas metodologías en bioreactores posibilitará el inicio de una producción comercial de esos valiosos metabolitos.

No menos importante es el hecho de que un protocolo de micropropagación puede ser llevado a cabo, el cual contribuiría de manera significativa a disminuir la sobreexplotación de las poblaciones naturales de *B. cordata*, y garantizaría la disponibilidad de esta planta como fuente segura de usarse con propósitos medicinales.

## 10. REFERENCIAS



Aguilar-Rodríguez S, Terrazas T, López-Mata L (2006). Anatomical wood variation of *Buddleja cordata* (Buddlejaceae) along its natural range in Mexico. *Trees* 20:253-261

Andary C, Wylde R, Laffite G (1982). Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Pedicularis condensate*. *Phytochemistry* 10: 2401-2402

- Andrade-Cetto A, Heinrich M (2005). Mexican plants with hypoglycaemic affect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99:325-348
- Arciniegas, A., Avendaño, A., Pérez-Castorena, A.L., and Romo de Vivar, A., 1997. Flavonoids from *Buddleia parviflora*. *Biochemical Systematics and Ecology* 25 (2): 185-186
- Argenio, Cuaderno edición no. 100: Biotecnología, una historia...  
[http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec\\_100.asp?cuaderno=100](http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_100.asp?cuaderno=100)
- Argenio, Cuaderno edición no. 35: Cultivo *in vitro* de plantas y su relación con la Biotecnología  
[http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec\\_35.asp?cuaderno=35](http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_35.asp?cuaderno=35)
- Argueta A, Cano LM, Rodarte ME (1994). Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, vol. 1–3, Instituto Nacional Indigenista, México
- Avila G, Liverant J, Martínez A, Martínez G, Muñoz JL, Arciniegas A, Romo de Vivar A (1999). Mode of action of *Buddeja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 75-78
- Avila JG, Castañeda CMC, Benitez FJC, Durán DA, Barroso VR, Martínez CG, Muñoz L JL, Martínez CA, Romo de Vivar A (2005). Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* 76:301-309
- Barba A, Luna B, Romero J (2001). Micropropagación de plantas. Trillas, México, D.F.
- Benjamins R, Scheres B (2008). Auxin: The looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 59:443-465
- Bhattacharya S, Bhattacharya S (1997). Rapid multiplication of *Jasminum officinale* L. by in vitro culture of nodal explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 51:57-60

- Bhojwani SS, Razdan MK (1983). Plant tissue culture: theory and practice. Elsevier Science Publishers, New York, U.S.A.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161:839-851
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plants Physiologists, Maryland USA
- Bye R, Linares E, Estrada E (1995). Biological diversity of medicinal plants in Mexico. En: Arnason JT, Mata R, Romeo JT, editores, *Phytochemistry of Medicinal Plants (Recent Advances in Phytochemistry, vol. 29)*, Plenum Press, New York, pp. 65-82
- Castleman M (1994). Hierbas curativas: la guía más moderna de las medicinas naturales y su poder curativo. Diana, México
- Clemens S, Palmgren, MG. Krämer U (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* 7:309-315
- Cowan MJ (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582
- Davies PJ (1995). Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic publishers, Netherlands
- Dell B, Elsegood C, Ghisalberti E (1989). Production of verbascoside in callus tissue of *Eremophila* spp. *Phytochemistry* 28:1871-1872
- Devivar A, Nieto D, Gavino R, Perez A (1995). Isocapnell-9-en-8-one and 6 $\alpha$ -hydrocysocapnell-9-en-one, sesquiterpenes from *Buddleia* species. *Phytochemistry* 42: 167-170

- Dhakulkar S, Ganapathi TR, Bhargava S, Bapat VA (2005). Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Science* 169:812-818
- Díaz BR, Jiménez-Estrada M, Auró A (2000). Evaluación del efecto parasitida de los extractos acuoso y metanólico de *Buddleia cordata* HBK (Tepozán) sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis* sp). *Veterinaria Mexicana* 31:189-194
- Doran PM (2009). Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and Limitations. *Biotechnology and Bioengineering* 103:60-76
- Dr. Duke's, phytochemical and ethnobotanical database: <http://www.ars-grin.gov/duke>
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356
- Ellis BE (1983). Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry* 22:1941-1943
- Estrada E (1985). Jardín botánico de plantas medicinales. Universidad Autónoma de Chapingo, México
- Fernandez S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M (2004). Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 77:399-404
- Gallardo-Vázquez AC (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, vol. 3, Instituto Indigenista, México, D.F.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158

- Gamborg OL, Phillips GC (1995). Plant cell, tissue and organ culture, fundamental methods. Springer-Verlag, Alemania
- Guo-Qing S, Jin-Rong Z, Xiao-Ping P, Jian M, Chang-Ling L (2002). Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *European Journal of Pharmacology* 451:119-124
- Harborne JB (1990). Ethnopharmacology. Chapman and May Publisher, London (UK)
- Heldt HW, Heldt F (2005). Plant biochemistry. Elsevier Academic Press, United States of America
- Herdt RW (2006). Biotechnology in agriculture. *Annual Review of Environment and Resources* 31:265-295
- Herman EB (2000). Recent advances in plant tissue culture, vol 6, regeneration and micropropagation: techniques, systems and media 1997-1999. Agritech Consultants, Inc., United States of America
- Hersch P (1996). Destino común: los recolectores y su flora medicinal. 1ª edición, Instituto Nacional de Artes y Humanidades, México, D.F.
- Hoshino Y, Mii M (1998). Bialaphos stimulates shoot regeneration from hairy roots of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 17:256-261
- Houghton P (1984). Ethnopharmacology of some *Buddleia* species. *Journal of Ethnopharmacology* 11: 293-308
- Houghton P, Mensah A, (1999). Biologically-active compounds from *Buddleia* species. En: Romeo JT, editor, Phytochemicals Human Health Protection, Nutrition and

- Plant Defense (Recent Advances in Phytochemistry, vol. 33), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, United States of America, pp. 343-368
- Houghton P, Mensah A, Iles N, Hong L (2003). Terpenoids in *Buddleia*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry* 64: 385-393
- Howe GA, Jander G (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59:41-66
- Huerta C (1997). La herbolaria: mito o realidad. *Biodiversitas boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad* 12:1-7
- Hurtado D, Merino M (2001). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México, D.F.
- Inagaki N, Nishimura H, Okada M, Mitsuhashi H (1991). Verbascoside production by plant cell cultures. *Plant Cell Reports* 9:484-487
- INEGI (2007). Estadísticas de mortalidad: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/rutinas/ept.asp?t=mpob107&c=14742>
- Inzé D (2005). Plant biotechnology helps to build a sustainable economy. *Current Opinion in Biotechnology* 16:109-111
- Kegg pathway database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
- Kepinski S (2006). Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 9:28-34
- Kirby J, Keasling JD (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annual Review of Plant Biology* 60:335–55

- Kunkel BN, Brooks DM (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* 5:325-331
- Lawton K, Uknes S, Ward E, Ryals J (1992). Plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Biotechnology* 3:171-175
- Li L, Tsao R, Liu Z, Liu S, Yang R, Young JC, Zhu H, Deng Z, Xie M, Fu Z (2005). Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1063:161-169
- Lira-Rocha A, Díaz R (1987). Iridoids and a phenylpropanoid glycoside from *Penstemon rosseus*. *Journal of Natural Products* 50: 331-33
- Lozoya X, Aguilar A, Camacho JR (1987). Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 25:283-291
- Lu CT, Mei XG (2003). Improvement of phenylethanoid glycosides production by a fungal elicitor in cell suspension culture of *Cistanche deserticola*. *Biotechnology Letters* 25:1437-1439
- Mabey R (1988). La nueva era de las hierbas. 2ª edición, Everest, España
- Martínez M (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México
- Martínez M (1989). Las plantas medicinales de México. 6ª edición, Botas, México, D.F.

- Martínez-Vázquez M, Ramírez TO, Aguilar H, Bye R (1996). Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *Buddleia cordata*. *Planta Medica* 62:137-140
- Martínez-Vázquez M, Ramírez TO, Lastra AL, Bye R (1998). A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Medica* 64:134-137
- McCourt P (1999). Genetic analysis of hormone signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:219-243
- Mendoza PE (2003). El tepozán del herbario. *Ciencias* 70: 32-33
- Mulabagal V, Tsay HS (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(1): 29-48
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497
- Nezbedova L, Hesse M, Dusek J, Werner C (1999). Chemical potential of *Aphelandra* sp. cell cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58:133-140
- Nitsch JP, Nitsch C (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87
- Oksman-Caldentey KM, Inze D (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9:433-440

- Orozco-Sánchez F, Rodríguez-Monroy M (2007). Cell suspension culture of *Azadirachta indica* for production of a bioinsecticide. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 6:251-258
- Pareilleux A, Vinas R (1983). Influence of the aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Carharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of Fermentation Technology* 61:429-433
- Petit GR, Numata A, Takemura T (1990). Antineoplastic agents 107. Isolation of acteoside an isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. *Journal of Natural Products* 53: 456-458
- Pilon-Smits E (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15-39
- Pierik RLM (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi-Prensa, España
- Pletsch M, Piacente S, Pizza C, Charlwood B (1993). The accumulation of phenylpropanoid glycosides in tissue cultures of *Tecoma sambucifolium*. *Phytochemistry* 34:161-165
- Quintero R (1993). Ingeniería bioquímica. Alhambra Mexicana S.A. de C.V., México
- Rao SR, Ravishankar GA (2000). Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:289-304
- Recio M, Giner R, Máñez S, Rios J (1994). Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Medica* 60: 232-234
- Rodríguez-Zaragoza S, Ordaz C, Avila G, Muñoz JL, Arciniegas A, Romo de Vivar A (1999). *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Buddleia cordata* (Loganiaceae, H.B.K.) on several strains of *Acanthamoeba*. *Journal of Ethnopharmacology* 66: 327-334

- Rzedowski J, Calderón de Rzedowski G (1985). Flora fanerogámica del Valle de México. vol. 2, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Sánchez O (1980). La flora del Valle de México. 6ª edición, La Prensa, México
- Sarin R (2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology* 4:79-93
- Secretaría de Salud. SUIVE Dirección General de Epidemiología (2007). [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx) (4 de septiembre de 2007)
- Seguí P, Olivares H (2005). Plantas medicinales: posible riesgo perioperatorio. *Anales médicos* 50:80-84
- Shoyama Y, Matsumoto M, Nishioka I (1986). Four caffeoyl glycosides from callus tissue of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry* 25:1633-1636
- Skrzypek Z, Wysokińska H (1997). Phenolics from cell suspension cultures of *Penstemon serrulatus*; relation to plant organs. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 52:426-432
- Skrzypek Z, Wysokińska H (1999). Accumulation of phenylethanoids in suspension cultures of *Penstemon serrulatus* Menz. *Biotechnology Letters* 21:691-693
- Staba EJ (1980). Plant tissue culture as a source of biochemicals. vol. 1, Plant tissue culture, vol. 2, Plant products, CRC Press, Florida, United States of America
- Sudha CG, Seeni S (1994). In vitro multiplication and field establishment of *Adhatoda beddomei* C.B. Clarke, a rare medicinal plant. *Plant Cell Reports* 13:203-207
- Tengerdy RP, Szakács G (1998). Perspectives in agrobiotechnology. *Journal of Biotechnology* 66: 91-99

- Torres K (1989). Tissue culture techniques for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold, United States of America
- Trigiano RN, Gray DJ (2000). Plant tissue culture concepts and laboratory exercises. 2<sup>a</sup> edición, CRC Press. United States of America
- Vasil IK (1991). Plant tissue culture and molecular biology as tools in understanding plant development and in plant improvement. *Current Opinion in Biotechnology* 2:158-163
- Vasil IK (2008). A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27:1423-1440
- Villaseñor JL (2004). Los géneros de las plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75:105-135
- Wareing PF, Phillips IDJ (1981). Growth and differentiation in plants. 3<sup>a</sup> edición, Pergamon Press, Great Britain
- WHO (2005). National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines, Report of a WHO global survey. Geneva, World Health Organization
- Wikipedia: <http://es.wikipedia.org/wiki/Wikipedia:Portada>
- White PR (1963). The cultivation of plant and animal cells. 2<sup>a</sup> edición, Ronald Press, New York
- Wysokińska H, Rozga M (1998). Establishment of transformed root cultures of *Paulownia tomentosa* for verbascoside production. *Journal of Plant Physiology* 152:78-83

- Wysokińska H, Lisowska K, Floryanowicz-Czekalska K (2001). Transformation of *Catalpa ovata* by *Agrobacterium rhizogenes* and phenylethanoid glycosides production in transformed root cultures. *Zeitschrift für Naturforschung C - A Journal of Biosciences* 56:375-381
- Yamamoto H, Yoshida K, Kondo Y, Inoue K (1998). Production of cornoside in *Abeliophyllum distichum* cell suspension cultures. *Phytochemistry* 48:273-277
- Yoshida T, Nobuhara J, Okuda T (1978). Studies on the constituents of *Buddleia* species. I. Structures of Buddledin A and B, two new toxic sesquiterpenes from *Buddleia davidii* Franch. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 26: 2535-2542
- Zechendorf B (1999). Sustainable development: how can biotechnology contribute?. *Trends in Biotechnology* 17: 219-225
- Zhang W, Curtin C, Franco C (2002). Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* 30:688–696
- Zhao C, Dodin G, Yuan C, Chen H, Zheng R, Jia Z, Fan BT (2005) “In vitro” protection of DNA from Fenton reaction by plant polyphenol verbascoside. *Biochimica et Biophysica Acta* 1723:114-123
- Zhong J (2001). Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 72:1-26
- Ziegler J, Facchini PJ (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology* 59:735–69

## 11. ANEXOS



### ANEXO 1

Composición de los cinco medios de cultivo comúnmente usados en CTV

### ANEXO 2

Preparación del medio de cultivo MS

### ANEXO 3

Determinación de azúcares totales por el método Fenol-Sulfúrico

### ANEXO 4

Determinación de los parámetros cinéticos  $\mu$  y  $q_p$

### ANEXO 5

Curvas patrón para los estándares de fenilpropanoides

### ANEXO 6

Cromatogramas

### ANEXO 7

Artículo

**ANEXO 1**

**Composición de los cinco medios de cultivo comúnmente usados en CTV**

Componente	MS	B5	WPM	Nitsch y Nitsch	White
<b>Macronutrientes en mg l<sup>-1</sup> (mM)</b>					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 (20.6)	----	400 (5.0)	----	----
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	----	134 (1.0)	----	----	----
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	332.2 (2.3)	150 (1.0)	96 (0.7)	166 (1.1)	----
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	----	----	556 (2.4)	----	288 (1.2)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370 (1.5)	250 (1.0)	370 (1.5)	185 (0.75)	737 (3.0)
KCl	----	----	----	----	65 (0.9)
KNO <sub>3</sub>	1900 (18.8)	2500 (24.8)	----	950 (9.4)	80 (0.8)
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	----	----	990	----	----
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 (1.3)	----	170 (1.3)	68 (0.5)	----
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	----	130.5 (0.9)	----	----	16.5 (0.12)
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	----	----	----	----	200 (1.4)
<b>Micronutrientes en mg l<sup>-1</sup> (mM)</b>					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 (100)	3.0 (49)	6.2 (100)	10 (162)	1.5 (25)
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)	----	----	----
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)	0.25 (1)	0.025 (0.1)	0.01 (0.04)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3 (100)	37.3 (100)	37.3 (100)	37.3 (100)	----
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	----	----	----	----	2.5 (6.2)
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8 (100)	27.8 (100)	27.8 (100)	27.8 (100)	----
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9 (100)	10.0 (59)	22.3 (132)	18.9 (112)	5.04 (30)
KI	0.83 (5)	0.75 (5)	----	----	0.75 (5)
NaMoO <sub>3</sub>	----	----	----	----	0.001 (0.001)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 (1)	0.25 (1)	0.25 (1)	0.25 (1)	----
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6 (30)	2.0 (7.0)	8.6 (30)	10 (35)	2.67 (9)
<b>Orgánicos en mg l<sup>-1</sup> (mM)</b>					
Mio-inositol	100 (550)	100 (550)	100 (550)	100 (550)	----
Glicina	2.0 (26.6)	----	2.0 (26.6)	2.0 (26.6)	3.0 (40)
Ácido nicotínico	0.5 (4.1)	1.0 (8.2)	0.5 (4.1)	5 (40.6)	0.5 (4.1)
Piridoxina HCl	0.5 (2.4)	0.1 (0.45)	0.5 (2.4)	0.5 (2.4)	0.1 (0.45)
Tiamina HCl	0.1 (0.3)	10 (30)	0.1 (0.3)	0.5 (1.5)	0.1 (0.3)
Biotina	----	----	----	0.2 (0.05)	----

## ANEXO 2

### Preparación del medio de cultivo MS

#### 1. Soluciones stock concentradas

1.1 Se prepararon las soluciones stock concentradas (X) de los componentes del medio de cultivo MS al 100%, formuladas de la siguiente manera:

Componente	Composición en el medio MS (1X)	Stock: Concentración
<b>Macronutrientes (mg l<sup>-1</sup>)</b>		
		<b>10X en mg (g)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	1650	16500 (16.5)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	332.2	3322 (3.322)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	3700 (3.7)
KNO <sub>3</sub>	1900	19000 (19)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1700 (1.7)
<b>Volumen de aforo</b>		<b>1000 ml</b>
<b>Fe-EDTA (mg l<sup>-1</sup>)</b>		
		<b>20X en mg (g)</b>
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	556 (0.556)
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	746 (0.746)
<b>Volumen de aforo</b>		<b>100 ml</b>
<b>Micronutrientes (mg l<sup>-1</sup>)</b>		
		<b>100X en mg (g)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	620 (0.62)
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	2.5 (0.0025)
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	2.5 (0.0025)
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9	1690 (1.69)
KI	0.83	83 (0.083)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	25 (0.025)
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	860 (0.860)
<b>Volumen de aforo</b>		<b>100 ml</b>
<b>Orgánicos (mg l<sup>-1</sup>)</b>		
		<b>100X en mg (g)</b>
Mio-inositol	100	10000 (10)
Glicina	2.0	200 (0.2)
Ácido nicotínico	0.5	50 (0.05)
Piridoxina HCl	0.5	50 (0.05)
Tiamina HCl	0.1	10 (0.01)
<b>Volumen de aforo</b>		<b>100 ml</b>

1.2 Se prepararon las soluciones stock concentradas ( $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) de los RCV: AIA, ANA, 2-4-D y KIN. Se pesaron 10 mg de cada RCV, se disolvieron con 1 ml de solución NaOH 1 N (AIA, ANA y KIN) ó EtOH (2,4-D), finalmente se adicionó agua para obtener 100 ml de solución.

1.3 Se preparó la solución stock concentrada de antioxidantes (100 ml/20X) pesando 3 g de ácido ascórbico y 2 g de ácido cítrico. Se disolvieron ambos ácidos en agua, y el volumen final de aforo fue de 100 ml.

## 2. Medio basal

2.1 Por cada litro de medio de cultivo MS a preparar al 50% se adicionaron los siguientes volúmenes de las soluciones stock previamente preparadas:

Solución stock	Vol. requerido de la solución stock para preparar 1 l de medio MS al 100%	Vol. requerido de la solución stock para preparar 1 l de medio MS al 50%
<b>Stock Macronutrientes 1000ml/10X</b>	100 ml/1X	50 ml
<b>Stock Micronutrientes 100ml/100X</b>	1 ml/1X	0.5 ml
<b>Stock Fe-EDTA 100ml/20X</b>	5 ml/1X	2.5 ml
<b>Stock Orgánicos 100ml/100X</b>	1 ml/1X	0.5 ml

2.2 Se agregaron 30 g de sacarosa hasta su disolución

2.3 Se agregaron 5 ml de solución stock de antioxidantes

2.4 Se aforó a un volumen final de 1 l

2.5 Se ajustó el valor de pH del medio de cultivo a 5.7-5.8 mediante la adición de alícuotas pequeñas de las soluciones NaOH 1N ó HCl 1N

2.6 Se adicionaron 2 g de phytigel para obtener medio de cultivo sólido, dejándose hervir por 1 min.

2.7 Se vertieron 20 ml de medio de cultivo en frascos gerber, mismos que fueron tapados una vez enfriado el medio de cultivo

2.8 Se esterilizaron frascos (ver punto 5)

### 3. Medios de inducción

3.1 Se adicionaron a los componentes del medio basal (puntos 2.1 y 2.2) los volúmenes correspondientes de las soluciones stock de RCV para obtener los tratamientos de inducción (1 l de medio de cultivo):

RCV (g/mol)	KIN (μM)	Vol stock (ml)	AIA (μM)	Vol stock (ml)	ANA (μM)	Vol stock (ml)	2,4-D (μM)	Vol stock (ml)
KIN (215.2)	<b>2.32</b>	4.99	<b>0.45</b>	0.79	<b>0.45</b>	0.84	<b>0.45</b>	1
AIA (175.2)	<b>4.65</b>	10	<b>2.26</b>	3.96	<b>2.26</b>	4.21	<b>2.26</b>	5.02
ANA (186.2)			<b>4.52</b>	7.92	<b>4.52</b>	8.42	<b>4.52</b>	10.04
2,4-D (221)			<b>9.05</b>	15.86	<b>9.05</b>	16.86	<b>9.05</b>	20.10

3.2 Una vez adicionados las respectivas alícuotas de RCV, se continuó el procedimiento descrito desde el punto 2.4

### 4. Medios líquidos

Para la obtención de medios líquidos, de los puntos indicados previamente (2 y 3) se omitió la adición de phytigel y se procedió a vaciar en matraces Erlenmeyer de 250 o 500 ml, mismos que fueron cubiertos con tapas de aluminio.

### 5. Esterilización

El material conteniendo el medio de cultivo (sólido o líquido) fue esterilizado por 18 min a 121 °C y 15 psi

## ANEXO 3

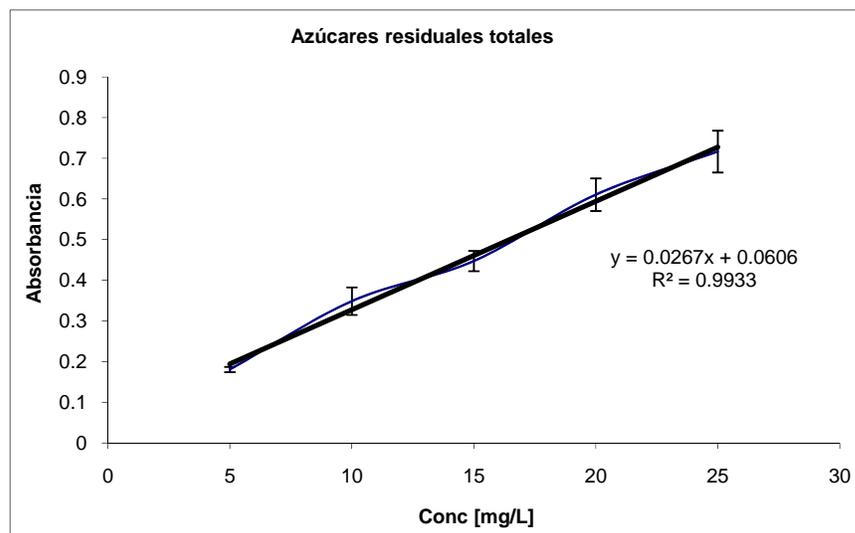
### Determinación de azúcares totales por el método Fenol-Sulfúrico

#### 1. Diluciones y procesamiento de las muestras

- 1.1 Las muestras del medio residual fueron diluidas en agua bidestilada (300 veces: 50  $\mu\text{l}$  muestra + 14950  $\mu\text{l}$  agua destilada).
- 1.2 En un tubo previamente enjuagado se adicionaron 2 ml de muestra diluida, más 1 ml de solución de fenol al 5% (w/v) y se mezclaron. Cuidadosamente se adicionaron 5 ml de ácido sulfúrico por la pared del tubo, se mezcló y dejó reposar por 10 min. Se colocaron los tubos en un baño María a 30°C e incubaron por 20 min. Una vez transcurrido dicho tiempo, se midió la absorbancia a 480 nm.

#### 2. Curva patrón

Una solución stock (30 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) fue preparada y diluida para generar concentraciones finales de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg  $\text{l}^{-1}$ . Cuando las diluciones fueron tratadas como las muestras (descrito en el punto anterior), se obtuvo el siguiente gráfico:

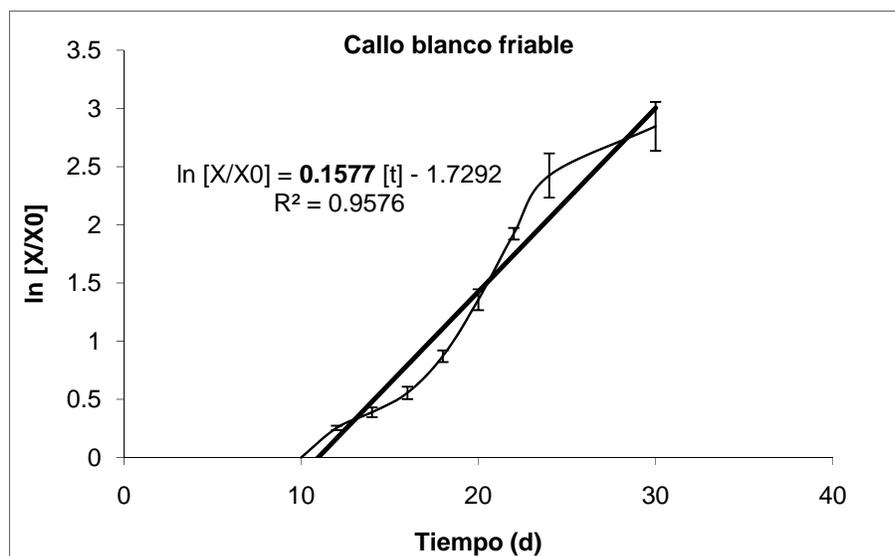


## ANEXO 4

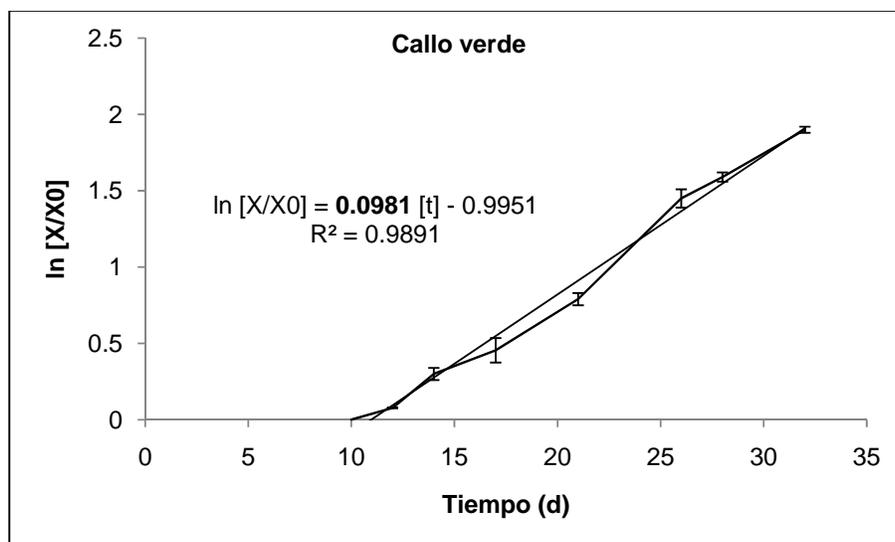
### Determinación de los parámetros cinéticos $\mu$ y $q_p$

Se evaluaron los parámetros de  $\mu$  y  $q_p$  con los valores obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento para biomasa (peso seco) y concentraciones de linarina y verbascósido de acuerdo a la fórmula:  $\ln (X/X_0) = \mu t$ , mientras que una vez determinado el valor de  $\mu$  (pendiente), se evaluó el parámetro  $t_d$  de acuerdo a la fórmula:  $t_d = \ln(2)/\mu$

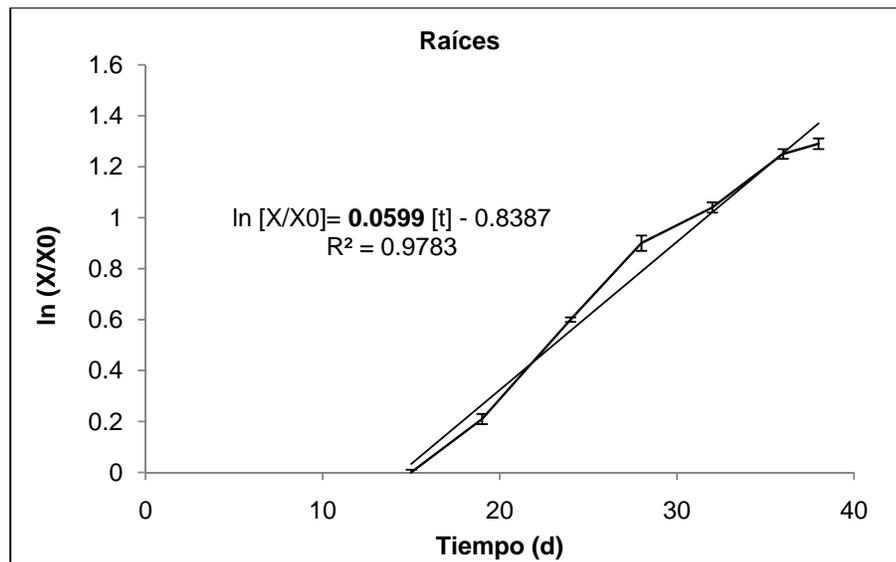
#### 1. Cultivos sólidos



$$t_d = \ln(2)/0.1577 \text{ d}^{-1} \rightarrow t_d = 4.413 \text{ d}$$

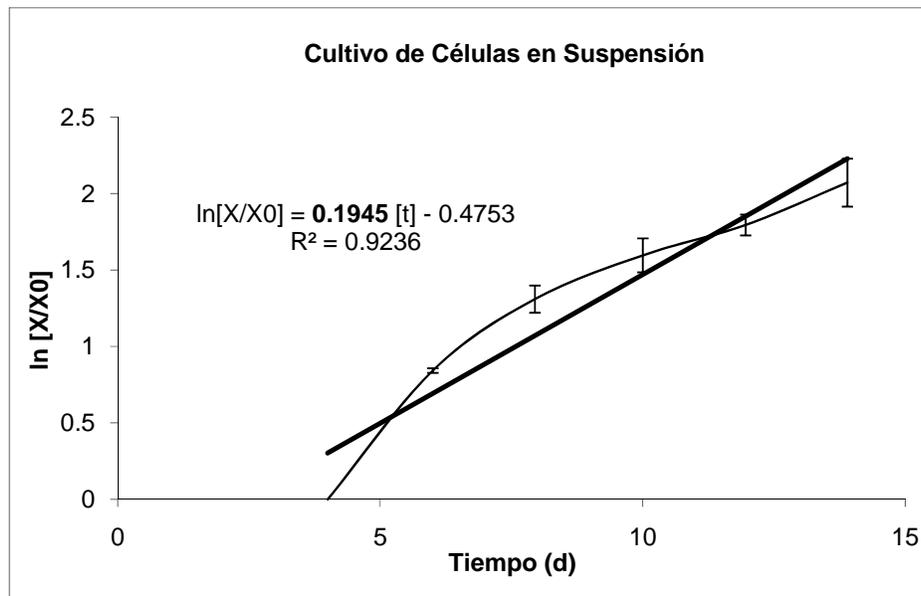


$$t_d = \ln(2)/0.0981 \text{ d}^{-1} \rightarrow t_d = 7.094 \text{ d}$$

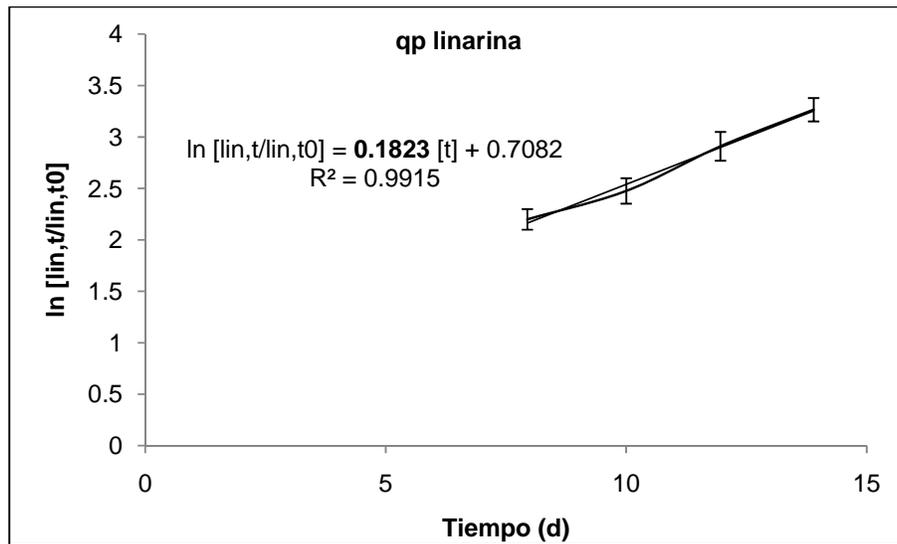
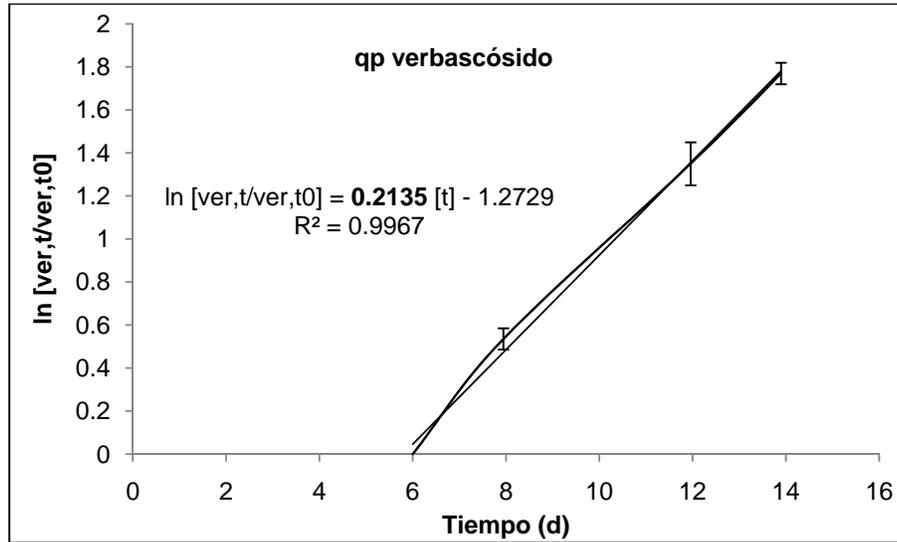


$td = \ln(2)/0.0599 \text{ d}^{-1} \rightarrow td = 11.5827 \text{ d}$

## 2. Cultivo líquido

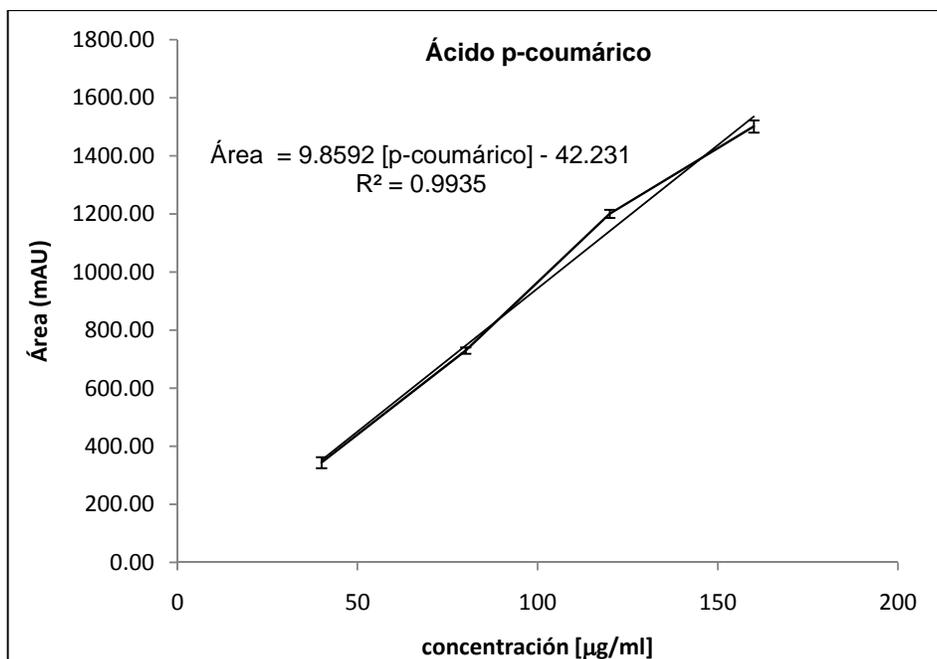
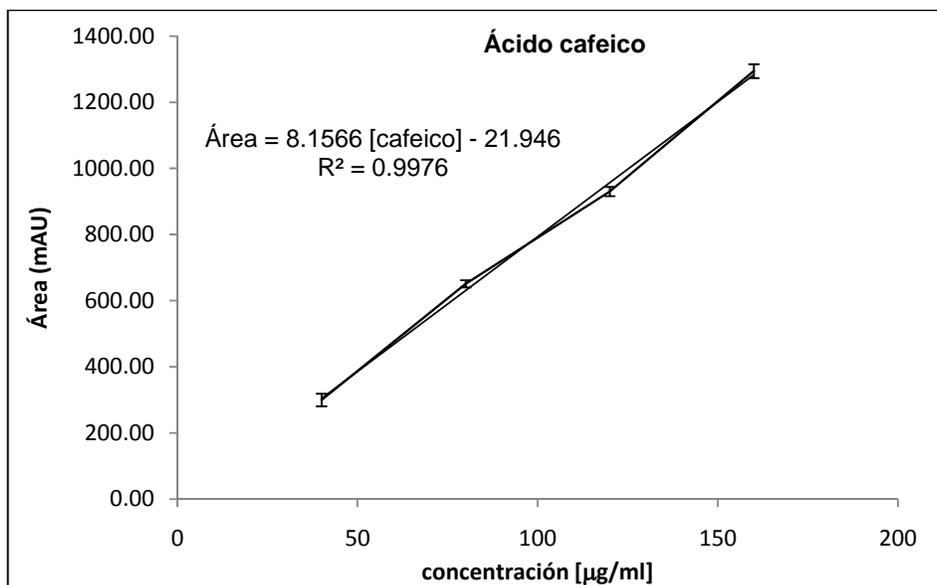


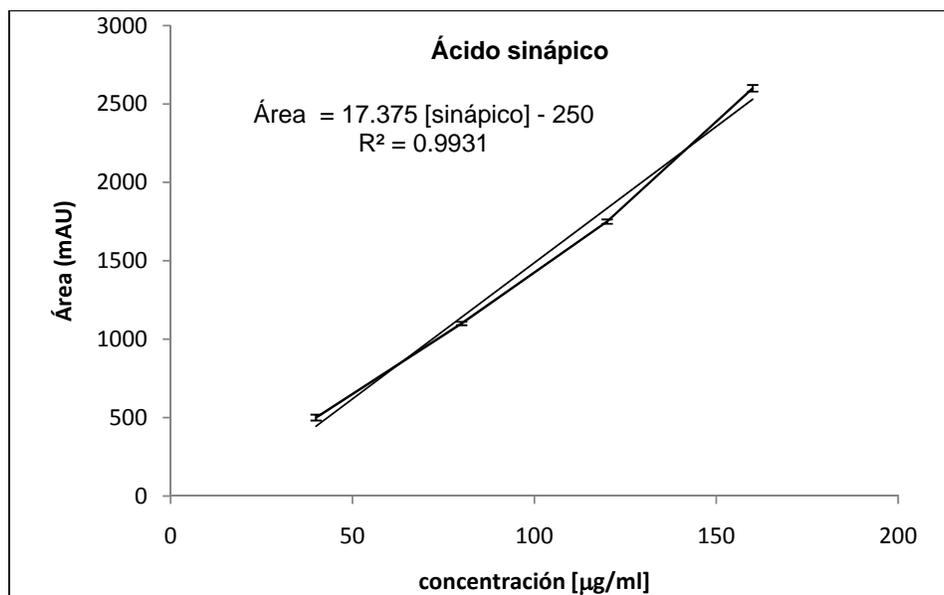
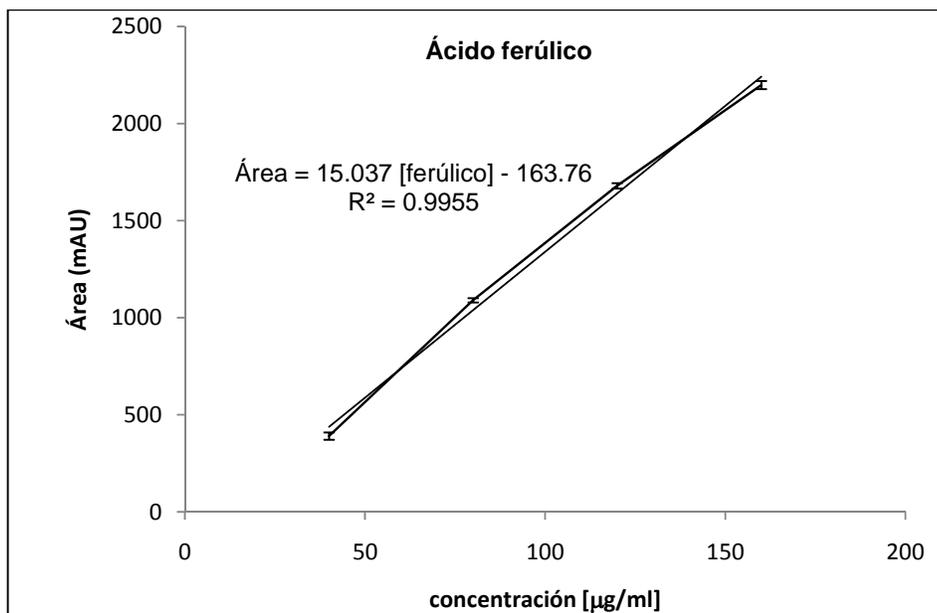
$td = \ln(2)/0.1945 \text{ d}^{-1} \rightarrow td = 3.65 \text{ d}$

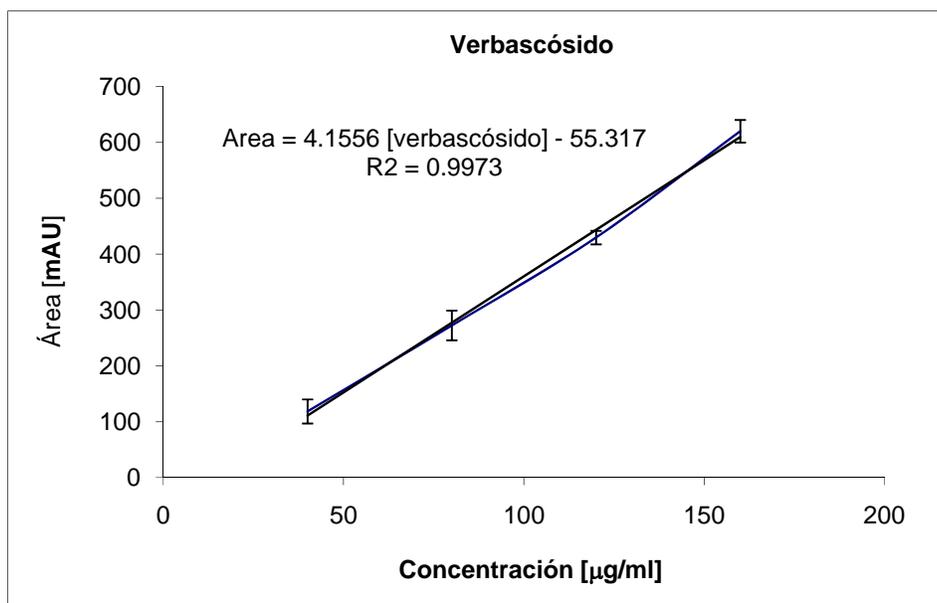
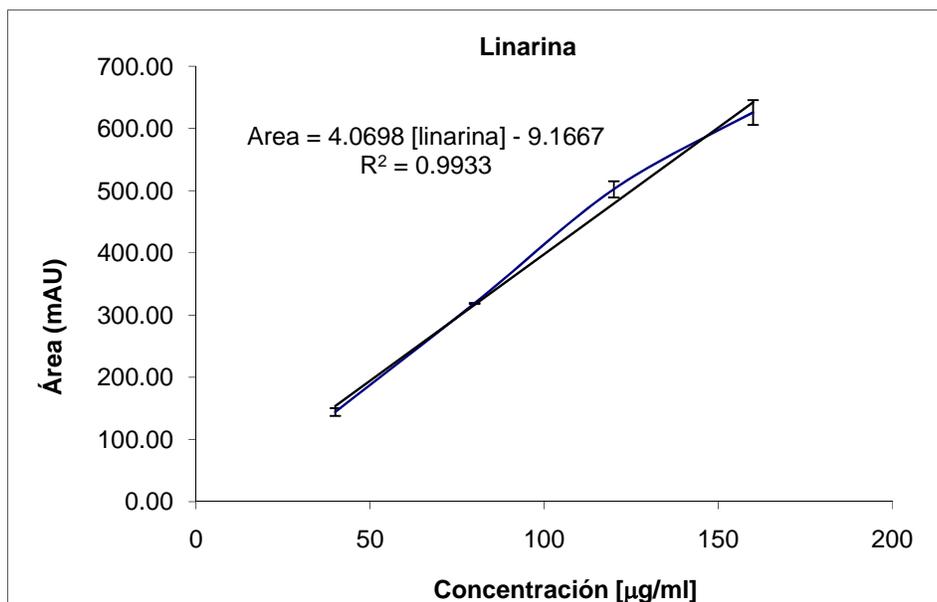


**ANEXO 5****Curvas patrón para los estándares de fenilpropanoides**

Una solución stock ( $0.2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) fue preparada y diluida para generar concentraciones finales de 40, 80, 120 y 160  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Cuando dichas diluciones fueron analizadas en el equipo de HPLC, las áreas correspondientes a éstas fueron graficadas, obteniéndose los siguientes gráficos:





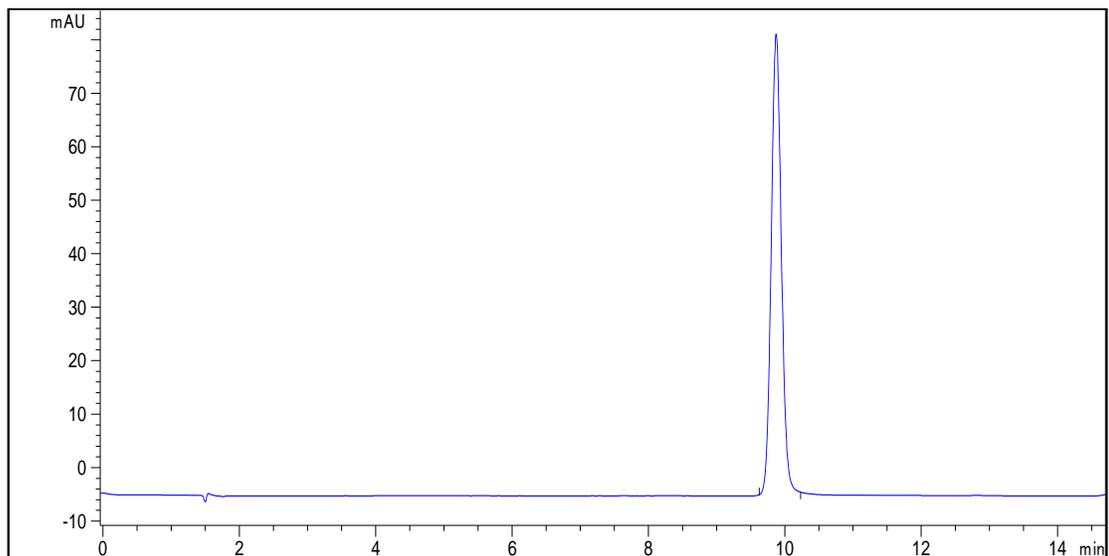


## ANEXO 6

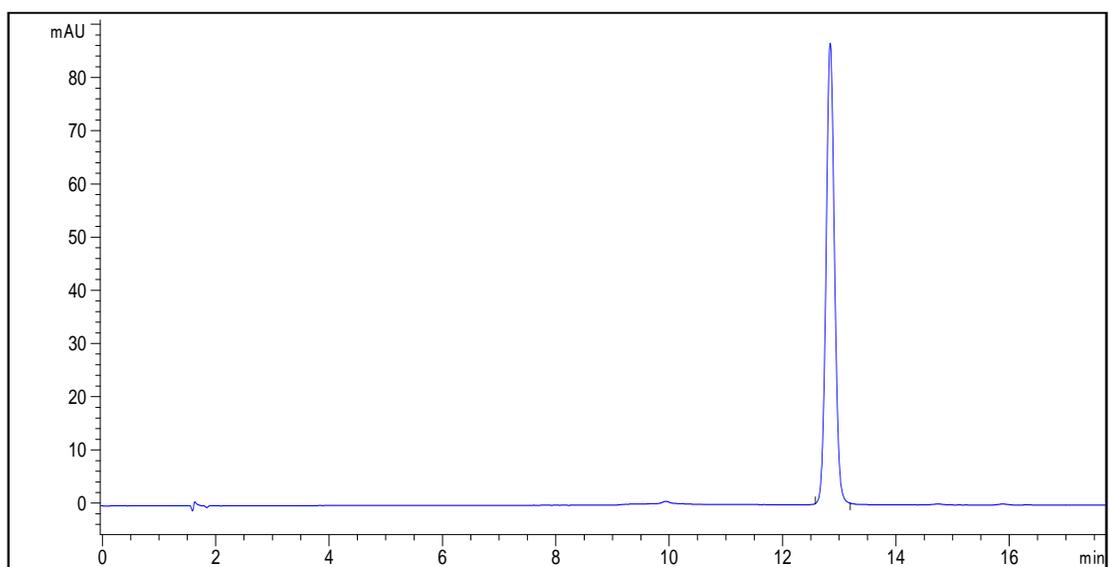
## Cromatogramas

## Estándares:

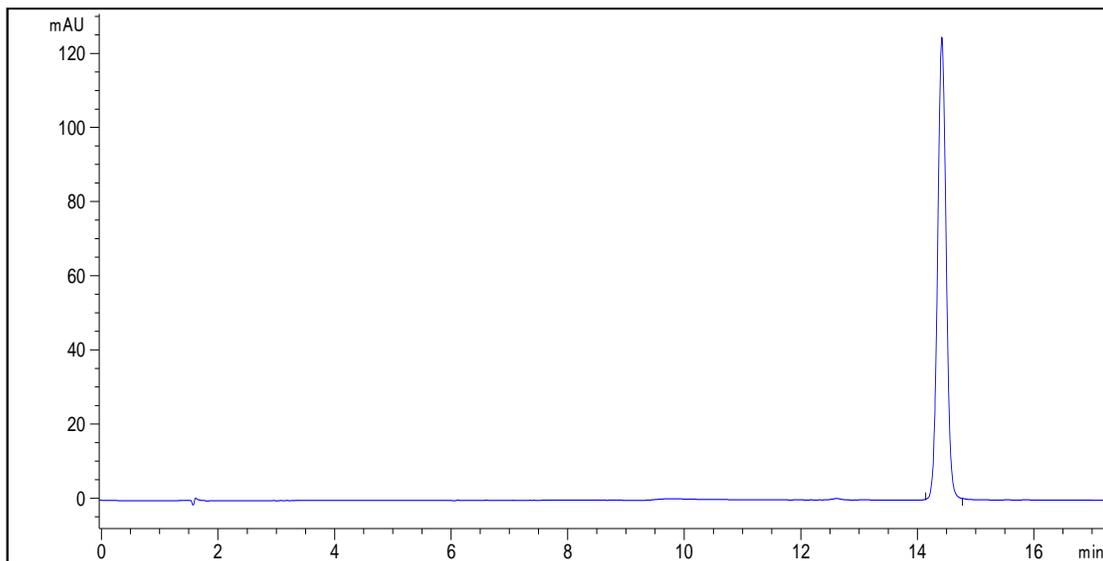
## a) Ácido cafeico



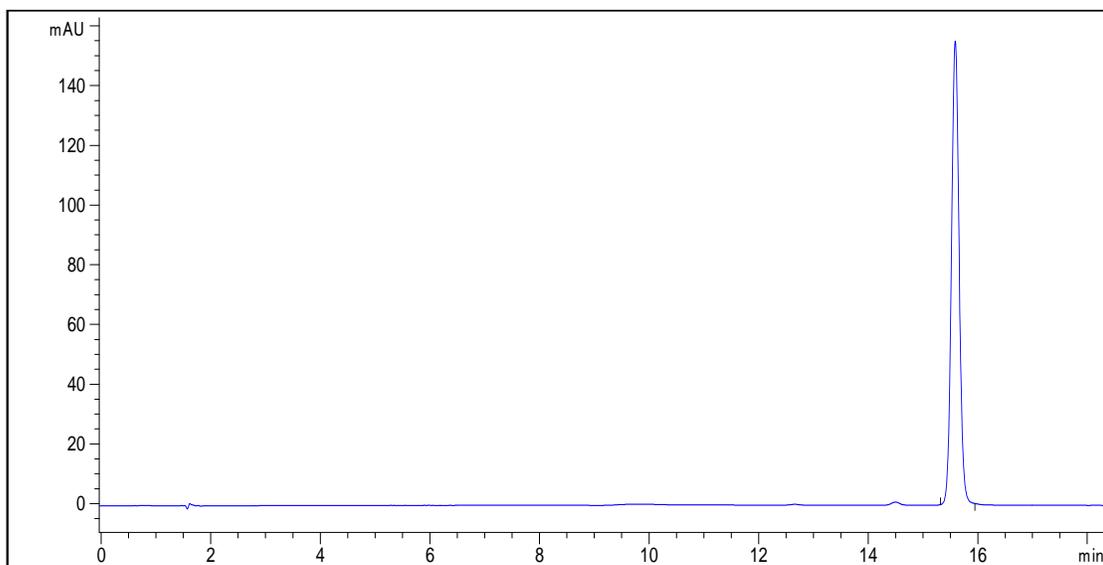
## b) Ácido p-coumárico

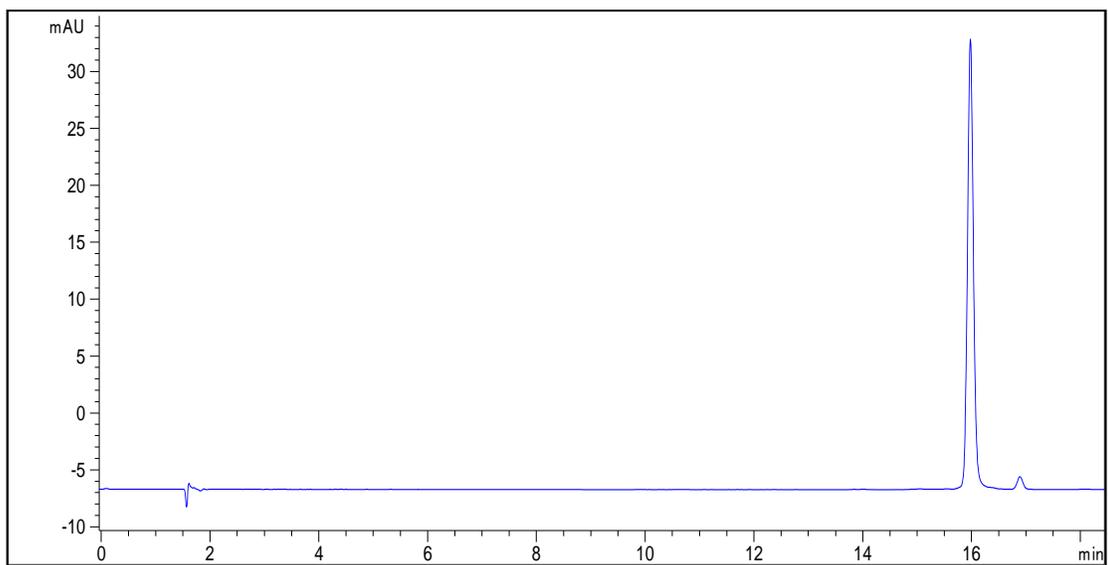
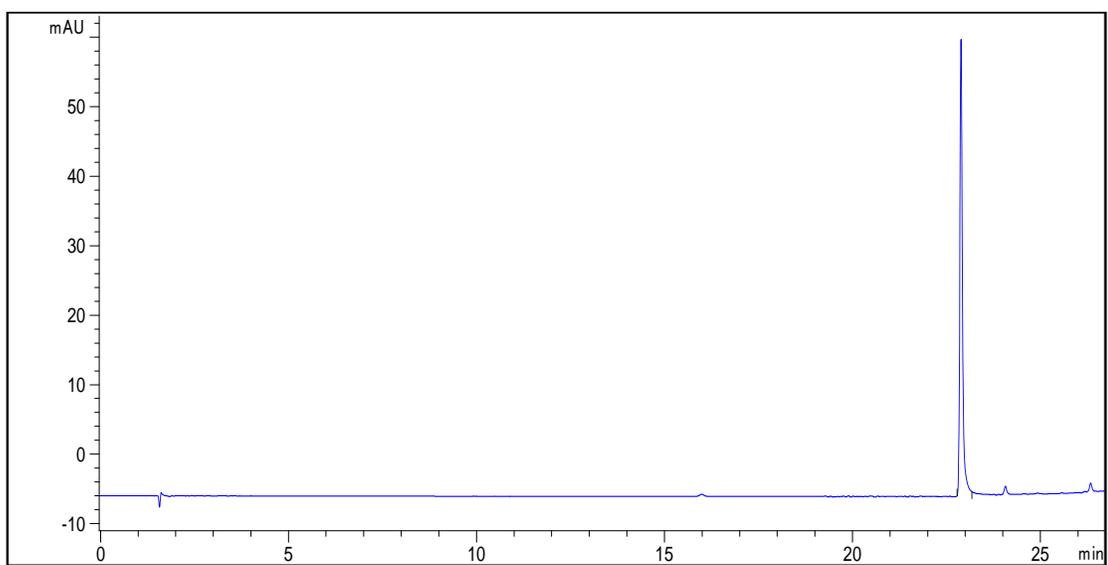


**c) Ácido ferúlico**



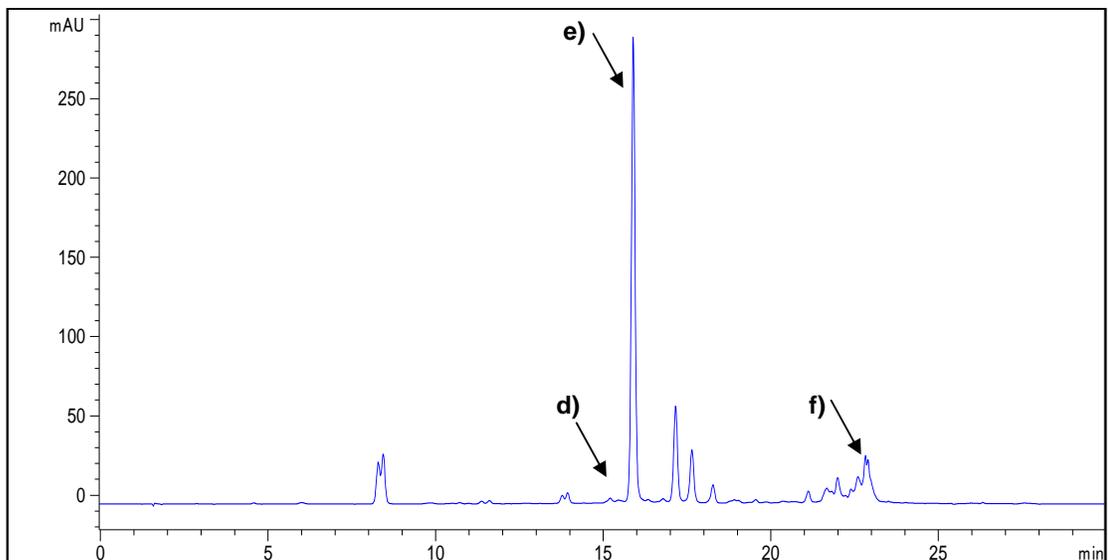
**d) Ácido sinápico**



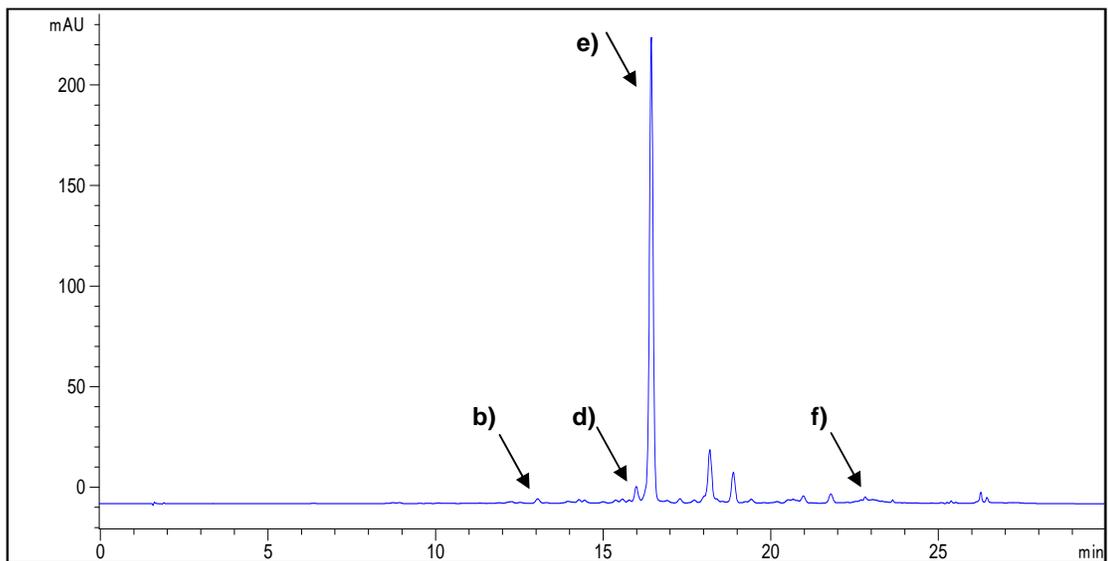
**e) Verbacósido****f) Linarina**

**Líneas celulares:**

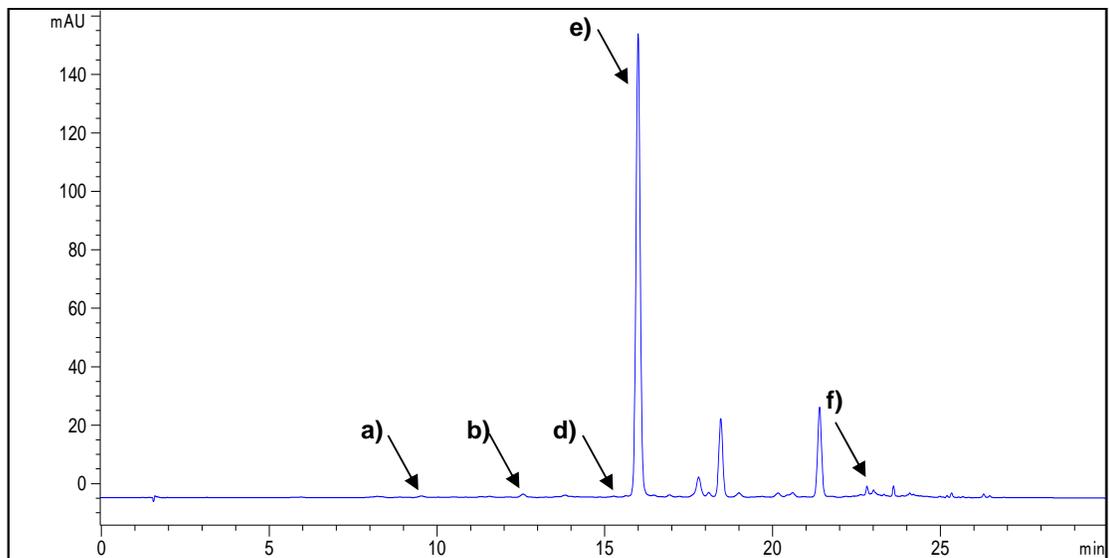
**Callo blanco**



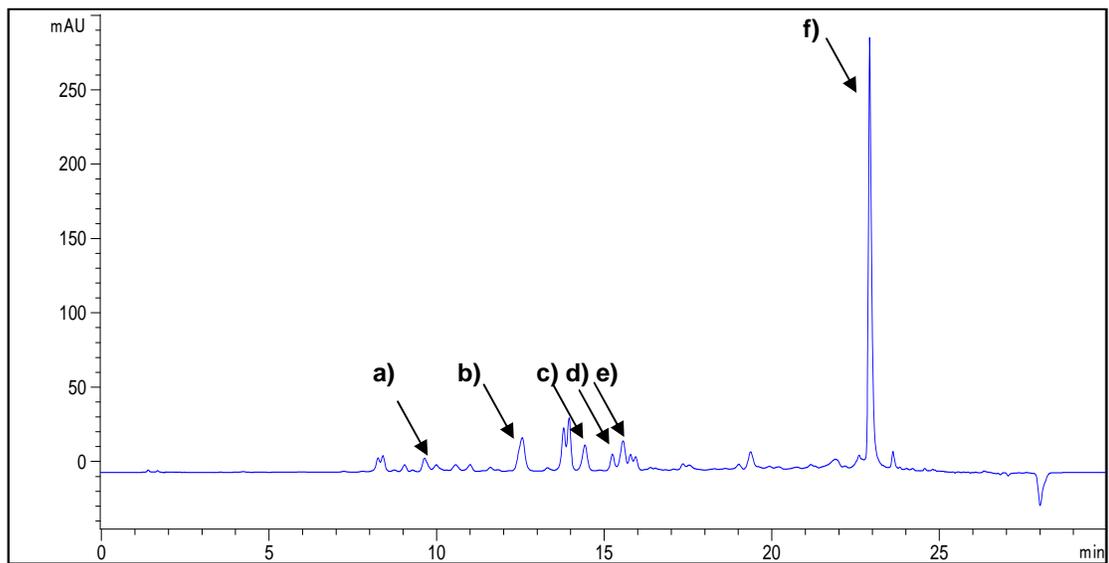
**Callo verde**



**Raíces**

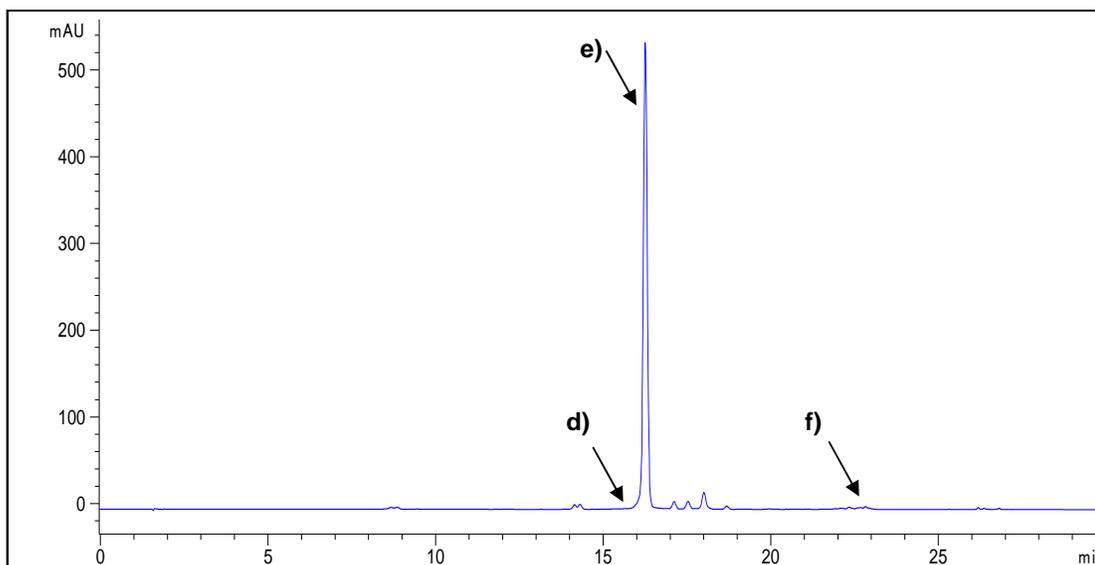


**Hojas de planta silvestre**



## Cultivos de células en suspensión

Cromatograma correspondiente al día 16 de cultivo, uno de los tiempos en los que se evalúa la máxima producción de verbascósido.



## ANEXO 7

### Artículo:

M. E. Estrada-Zúñiga, F. Cruz-Sosa, M. Rodríguez-Monroy, J. R. Verde-Calvo, E. J. Vernon-Carter (2009). Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 97:39–47

# Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth

M. E. Estrada-Zúñiga · F. Cruz-Sosa ·  
M. Rodríguez-Monroy · J. R. Verde-Calvo ·  
E. J. Vernon-Carter

Received: 20 October 2008 / Accepted: 16 December 2008 / Published online: 28 January 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** Plant tissue cultures represent a potential source for producing secondary metabolites. In this work, *Buddleja cordata* tissue cultures were established in order to produce phenylpropanoids (verbascoside, linarin and hydroxycinnamic acids), as these metabolites are credited with therapeutic properties. Highest callus induction (76.4–84.3%) was obtained in five treatments containing 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D: 0.45–9.05  $\mu\text{M}$ ) with Kinetin (KIN: 2.32, 4.65  $\mu\text{M}$ ), whereas highest root induction (79.6%) corresponded to the  $\alpha$ -Naphthaleneacetic acid (9.05  $\mu\text{M}$ ) with KIN (2.32  $\mu\text{M}$ ) treatment. Verbascoside was the major phenylpropanoid produced in in vitro cultures (root, white and green callus) [66.24–86.26  $\text{mg g}^{-1}$  dry weight (DW)], while linarin and hydroxycinnamic acid production was low (0.95–3.01  $\text{mg g}^{-1}$  DW). Verbascoside and linarin production were improved in cell suspension culture (116  $\text{mg g}^{-1}$  DW and 8.12  $\text{mg g}^{-1}$  DW, respectively).

**Keywords** Tissue culture · *Buddleja cordata* · Secondary metabolite · Verbascoside · Linarin · Hydroxycinnamic acids

## Abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
DAD	Photodiode array detection
DW	Dry weight
GI	Growth index
HPLC	High performance liquid chromatography
IAA	Indole-3-acetic acid
KIN	Kinetin
$\mu$	Specific growth rate
MB	Maximum biomass
NAA	$\alpha$ -Naphthaleneacetic acid
PGR(s)	Plant growth regulator(s)
qp	Specific production rate
td	Doubling time
$Y_{X/S}$	Yield of biomass from substrate
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

M. E. Estrada-Zúñiga · F. Cruz-Sosa (✉) · J. R. Verde-Calvo  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco No. 186,  
Col. Vicentina, CP 09340 Mexico, DF, Mexico  
e-mail: cuhp@xanum.uam.mx

M. Rodríguez-Monroy  
Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de  
Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional,  
CP 62731 Yautepec, Morelos, Mexico

E. J. Vernon-Carter  
Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica,  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael  
Atlixco No. 186, Col. Vicentina, CP 09340 Mexico, DF, Mexico

## Introduction

Secondary metabolites from plants (phenylpropanoid, alkaloid and terpenoid metabolites) are complex bioactive compounds of low molecular weight playing many roles in their interaction with the environment. The production of these compounds is often low (less than 1% dry weight) and depends greatly on the physiological and developmental stage of the plant (Oksman-Caldentey and Inze 2004). Not surprisingly, since ancient times, human beings have exploited several plants as sources of pharmaceuticals for therapeutic purposes (Buchanan et al. 2000). *Buddleja*

*cordata* Humb. Bonpl. & Kunth (Buddlejaceae) commonly known as “tepozán” is a tree extensively distributed in Mexico, but with a higher population density in the Central Mexican Highlands (Aguilar-Rodríguez et al. 2006). Its leaves, bark and roots have been used widely in folk medicine against wounds or skin ailments, gastrointestinal infections, liver disorders, nasal haemorrhages, muscle cramps, rheumatism, headaches, and as diuretic and kidney treatments (Martínez 1989). The therapeutic properties have been attributed to major compounds belonging to the phenylpropanoid pathway which have been isolated from aerial parts. Those phenylpropanoids include the conjugated phenylpropanoid verbascoside, the flavonoid linarin, and the *p*-coumaric, caffeic, ferulic and sinapic hydroxycinnamic acids, all of which are credited with one or other of the following activities: parasiticide, anti-microbial, analgesic, anti-viral, anti-proliferative, anti-hypertensive, anti-oxidant and anti-inflammatory (Fernandez et al. 2004; Martínez-Vázquez et al. 1998; Nezbedova et al. 1999; Inagaki et al. 1991). Others compounds belonging to terpenoid metabolites have been isolated, such the iridoid aucubin with anti-bacterial and anti-oxidant activities, and buddledin A with pesticide, piscicidal and anti-fungal activities (Houghton et al. 2003). In folk medicine, these compounds are obtained as extracts or infusions from *B. cordata* wild plants, causing a drastic decrease in this plant's population. A way to mitigate this problem is by developing plant tissue culture of the species, since this biotechnological technique provides an alternative extraction procedure that may use cell, tissue and organ in an aseptic, controllable, automatized way and result large-scale cultivation. Cell suspension cultures represent the best system of cultivation for producing secondary metabolites because fast growth rates can be achieved. However, the establishment of cell cultures for producing secondary metabolites is not always feasible as their biosynthesis can be associated with cellular differentiation (Bourgaud et al. 2001; Sarin 2005).

There are successful examples of tissue cultures for several medicinal plants where an increased content of the bioactive secondary metabolites has been achieved compared to that from wild plants. Several biotechnological advances have been developed in tissue culture that improve secondary metabolite production such as optimization of cultural conditions, selection of high-producing strains, precursor feeding, elicitation, metabolic engineering, transformed root cultures, micropropagation, and bioreactor cultures, among others (Bourgaud et al. 2001; Sarin 2005). There are no published reports regarding the phenylpropanoid production of *B. cordata* in tissue culture. Nevertheless, tissue cultures for producing bioactive compounds by other medicinal plants (wild or cultivated) closely related to the Buddlejaceae have been reported

(Dhakulkar et al. 2005; Nezbedova et al. 1999; Skrzypek and Wysokinska 1999; Wysokinska and Rozga 1998; Pletsch et al. 1993).

The aim of this work was two-fold: (1) to evaluate the influence of different plant growth regulators over *B. cordata* immature leaves in order to obtain callus cultures; and (2) to evaluate the production of phenylpropanoid compounds, specifically verbascoside, linarin and hydroxycinnamic acids in *B. cordata* tissue cultures.

## Materials and methods

### Plant material

Plants, approximately 2 years old, were collected from Santa Maria Village from Apaxco, State of Mexico, Mexico, in July 2005. The plants were fertilized and conditioned to a greenhouse located in the Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa Campus (UAM-I). A sample was deposited in the UAM-I herbarium, identified as *Buddleja cordata* Kunth (Buddlejaceae) and registered with number 61170. After 3 months, the best visually adapted (the sanest) collected plant, was used as source of explants. Immature leaves of 3–5 cm length were removed from the plant, washed with soap solution during 10 min and rinsed with running tap water. Then the leaves were immersed into a 70% (v/v) ethanol solution for 30 s, followed by rinsing in distilled water, and another immersion in a 0.6% (v/v) sodium hypochlorite solution, with low shaking for 15 min. Afterwards, under aseptic conditions, the leaves were rinsed three times in sterile deionized water, followed by rinsing and segmenting in an sterile antioxidant solution (100 mg citric acid and 150 mg ascorbic acid l<sup>-1</sup> solution). Segments of 5 × 5 mm were obtained from the leaves, with the underside (abaxial) set over the induction culture medium. Explants derived from a leaf were used for a treatment consisting of six glass containers, each one containing three explants (*n* = 18).

### Culture medium and incubation conditions

The basal culture medium employed consisted of half-strength MS (Murashige and Skoog 1962), supplemented with 3% (w/v) sucrose, 100 mg l<sup>-1</sup> citric acid and 150 mg l<sup>-1</sup> acid ascorbic. Phytigel (0.2% (w/v)) was used for solidifying the culture medium. For evaluating the callus response of immature leaves, the induction medium culture consisted of adding different combinations of PGRs: the cytokinin KIN, and the auxins IAA, NAA and 2,4-D to basal medium. A factorial design (3 × 5) was employed. For cytokinin, the applied concentration levels were 0.00, 2.32 and 4.65 μM, and for each auxin were

0.00, 0.45, 2.26, 4.52 and 9.05  $\mu\text{M}$ . About 20 ml of culture medium was put in a glass container of 100 ml. Cultures were incubated at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  under a photoperiod of 16 h light, by using white florescent light ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). For each treatment, the explants presenting callus or morphogenic induced responses were expressed as a percentage of the total explants used, which was determined on the fourth week of culture.

#### Maintenance and stability of cultures

In order to establish *B. cordata* line callus cultures, treatments that induced the highest percentage of white friable callus (2,4-D 0.45  $\mu\text{M}$  with KIN 2.32  $\mu\text{M}$  treatment) or white callus developing roots (NAA 9.05  $\mu\text{M}$  with KIN 2.32  $\mu\text{M}$  treatment) were selected for producing enough biomass for the next experiments, and were subcultured monthly in the same induction medium. Monitoring of phenotypic callus characteristics such as color, friability and fast proliferation were assessed every cycle during the maintenance stage to see if changes occurred. When phenotypic changes occurred, the new callus (green forming aggregates, which developed from callus developing root) was separated and both were grown in the same medium culture. After several subculture cycles, genetic stability for each line culture was inferred by estimating growth parameters ( $\mu$ , td and GI) during three consecutive subculture cycles (Bourgaud et al. 2001). In order to determine growth parameters, growth kinetics were realized for the line cultures: white friable callus, green aggregated callus, and white callus developing roots. Measurements of fresh and dry biomass weight were made at 15 intervals during 40 days of culture. GI was calculated gravimetrically as indicated by Nezbedova et al. (1999) while  $\mu$  and td were estimated from exponential stage measurements as indicated by Quintero (1993). The corresponding measurement from each interval was made from three glass containers each one inoculated with 2 g of fresh biomass ( $n = 3$ ). Once culture stability was established, the phenylpropanoid analysis was made.

#### Phenylpropanoids extraction and standards preparation

Samples of fresh biomass (2 g) from each culture (white or green callus, or root of a stationary stage of growth), and leaves (from the plant used as source of explants) was lyophilized and extracted (100 mg DW biomass) with boiling MeOH (50 ml) for 1 h, filtered, and concentrated to 10 ml under reduced pressure. Stock standards solutions ( $0.2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) of: caffeic, *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids (Sigma Chemicals, USA), verbascoside and linarin (Extrasynthese, France) were prepared. Further dilutions of each stock solution (40, 80, 120 and 160  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) were

made using MeOH as solvent in order to obtain the calibration curve. For extraction purposes, biomass of these samples was obtained from a glass container or leaves, three of them being used for every measurement ( $n = 3$ ).

#### HPLC analysis

Prior to use, every prepared methanolic extract and standard solution was filtered (0.45  $\mu\text{m}$ , nylon filter) for HPLC analysis. An Agilent Technologies 1100 series HPLC system with G1311A Quatpump (Alltech, USA), equipped with a Platinum EPS-C<sub>18</sub> column (7 mm  $\times$  53 mm, 3  $\mu$ ; Alltech) and a G1315B DAD (Alltech) was used for analyzing the phenylpropanoids from methanolic extract samples. HPLC conditions were made according to the procedure of Li et al. (2005), with some modifications. In brief, the mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B), a sample injection volume of 5  $\mu\text{l}$ , a flow rate of 1.0  $\text{ml min}^{-1}$  and a wavelength of 334 nm for DAD. The system was run with a gradient program as follows: 20 min, 100–75% A; 5 min, 75–0% A; and finally 5 min, 0–100% A. Standards and methanolic extracts were run in the same way. CHEM-STATION chromatography software (Rev. A.08.03; Agilent Technologies) was used to acquire data from the detector. For detecting, identifying and quantifying each phenylpropanoid from samples, peak areas at the corresponding standard retention time were used to determine their concentration from the prepared calibration curve. Each sample was injected three times ( $n = 3$ ).

#### Suspension culture

White callus lines were transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of liquid induction medium culture, stirred in a gyratory shaker at 110 rpm, and incubated at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  and a photoperiod of 16 h light ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Several passages of cultures were made between 15 and 20 days to increase biomass and assess both growth and phenylpropanoid production. Fresh and dry weight, sugars and viability measurements were made for 12 intervals during 30 days of culture. Fresh weight of cell suspension cultures, filtered under vacuum, and dry weight of lyophilized filtered cells, were recorded, and used for phenylpropanoid determination. Sugars were measured from the medium applying phenol-sulphuric method (Dubois et al. 1956) while cell viability was estimated by counting filtered cells (200 mg) in a haemocytometer using Evans blue (0.25% w/v) as dye for selecting dead cells. The  $\mu$ , td, and GI parameters were calculated as mentioned above, while  $Y_{X/S}$  and qp were calculated as indicated by Quintero (1993). An Erlenmeyer flask inoculated with 3 g of filtrated cell was used at each interval measurement; thus

three Erlenmeyer flasks were used for each interval ( $n = 3$ ).

### Statistics

The NCSS software was utilized for statistical analyses of the callus or root induced response percentage, growth parameters and pheypropanoid concentration. One-way ANOVA analysis followed by the Tukey–Kramer multiple media comparison tests was executed. A  $P$  value of less than 0.05 was assumed for significant differences. All of the experiments and measurements were done by triplicate.

## Results and discussion

### Callus and root induced responses

Establishment of aseptic cultures on the basal medium was difficult due to oxidation problems in explants. In order to solve this problem, an antioxidant solution (100 mg citric acid and 150 mg ascorbic acid  $l^{-1}$ ) was used either during rinsing and cutting of explants or it was added to the culture medium. Both treatments reduced stress caused by wounding and enhanced growth of explants. Perhaps segmenting and rinsing in the antioxidant solution not only eliminated toxic compounds such as polyphenols (characteristic of woody plants) produced by wounding, but also fomented the production of naturally occurring antioxidant molecules (Buchanan et al. 2000). The fact that immature leaves were used as the sole source of explants was because a high contamination from stem explants was observed and seeds did not germinate under aseptic conditions (data not shown).

Callus or morphogenic response was nil with the control treatment ( $K_0Aux_0$ ) and the treatments of KIN without auxin ( $K_1Aux_0$ ,  $K_2Aux_0$ ) (Table 1), but the three treatments showed similar visual explants elongation (Fig. 1a). When PGRs influenced the explants, callus and root (directly induced or indirectly developed from callus) were the induced responses (Table 1). The phenotypic characteristics observed for all those treatments were a white and friable appearance with fast proliferation for callus (Fig. 1b, c), while the root was hairy and whitish, but it was shorter when it was indirectly induced (Fig. 1d and e, respectively). Callus and root (directly induced) generally started at the edges (Fig. 1b and e, respectively) and gradually callus extended by the venation of the explants (Fig. 1f). Induction started after 3 weeks of culture for the  $K_xNAA_y$  treatments, while some callus developed root ( $K_1NAA_4$ ,  $K_2NAA_4$ ), and the rest of PGR the treatments ( $K_xIAA_y$  and  $K_x2,4D_y$ ) started their induction responses 1 week later (Table 1).

Synthetic auxins NAA and 2,4-D induced better response percentages for callus and root than the natural auxin IAA (Table 1), and response significantly increased by KIN addition. Higher percentages were reached with the  $K_12,4D_1$ ,  $K_12,4D_2$ ,  $K_12,4D_3$ ,  $K_12,4D_4$  and  $K_22,4D_4$  treatments with callus (76.4–84.3%); the  $K_1NAA_3$  treatment when root was directly induced (29.8%); and the  $K_1NAA_4$  treatment when root was indirectly induced (79.6%) (Table 1). Probably, these results can be attributed to the fact that synthetic PGRs are more stable against physical and enzymatic degradation than natural occurring auxins (Pierik 1990), so that at the end of the culture the treatments containing IAA did not possess a sufficiently high concentration of this PGR for inducing high percentage responses.

The results for *B. cordata* showed that 2,4-D was more effective than NAA for inducing callus. A similar response was reported for *Rehmania glutinosa* (Shoyama et al. 1986) and *Aphelandra* sp. (Nezbedova et al. 1999), both closely related to the Buddlejaceae. However, there are no reports about the influence of NAA on the root induction for other closely related species nor for callus percentages (Shoyama et al. 1986; Inagaki et al. 1991; Pletsch et al. 1993; Yamamoto et al. 1998; Nezbedova et al. 1999), but our results showed the relevance of exploring several PGRs for response induction purposes. Perhaps *B. cordata* immature leaf explants have high affinity with auxin protein transporters or receptors for NAA, which may affect the auxin intracellular concentration and consequently induced root percentages (Kepinski 2006). Also, induction response capability of explants depends on their genetic, biochemical, physiological and totipotency characteristics (Pierik 1990).

### Stability of cultures

As non-phenotypic differences were observed among the five treatments producing the highest percentages of induced white callus,  $K_12,4D_1$  treatment was selected for further experimentation. After 9 subcultures of maintenance, green callus forming little aggregates was developed, and after 18 subcultures the growth parameters ( $\mu$ , td, GI) were determined for white callus, green callus and root *B. cordata* line cultures. Genetic stability was established in all the line cultures as they did not exhibit significant differences (see columns in Table 2). However, differences for these values were found between in vitro line cultures, with the fastest ( $\mu = 0.157 \text{ day}^{-1}$ , td = 4.413 days) and the highest growth (GI = 5.945) occurring for white callus (see rows in Table 2). Both growth parameters were better than those reported for *Tecoma sambucifolium* callus ( $\mu = 0.126 \text{ day}^{-1}$ , td = 5.5 days) (Pletsch et al. 1993), a closely related species to Buddlejaceae. In general terms,

**Table 1** Percentage of the morphogenic induced responses in explants from immature *B. cordata* leaves under different levels of cytokinin with auxin after 30 culture days

Treatment code	PGR ( $\mu\text{M}$ )	Morphogenic response induced (%)		
		Callus	Root	
			Direct	Indirect
KIN				
K <sub>0</sub> Aux <sub>0</sub>	0.00	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> Aux <sub>0</sub>	2.32	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> Aux <sub>0</sub>	4.65	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
KIN IAA				
K <sub>0</sub> IAA <sub>1</sub>	0.00 0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> IAA <sub>2</sub>	0.00 2.26	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> IAA <sub>3</sub>	0.00 4.52	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> IAA <sub>4</sub>	0.00 9.05	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	10.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> IAA <sub>1</sub>	2.32 0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> IAA <sub>2</sub>	2.32 2.26	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> IAA <sub>3</sub>	2.32 4.52	13.7 ± 1.6 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> IAA <sub>4</sub>	2.32 9.05	7.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	7.6 ± 2.0 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> IAA <sub>1</sub>	4.65 0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> IAA <sub>2</sub>	4.65 2.26	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> IAA <sub>3</sub>	4.65 4.52	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> IAA <sub>4</sub>	4.65 9.05	9.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
KIN 2,4-D				
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>1</sub>	0.00 0.45	7.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>2</sub>	0.00 2.26	11.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>3</sub>	0.00 4.52	17.8 ± 1.1 <sup>c</sup>	7.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> 2,4D <sub>4</sub>	0.00 9.05	20.4 ± 1.9 <sup>c</sup>	11.1 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>1</sub>	2.32 0.45	76.4 ± 2.1 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>2</sub>	2.32 2.26	81.5 ± 1.9 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>3</sub>	2.32 4.52	83.8 ± 2.8 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> 2,4D <sub>4</sub>	2.32 9.05	84.3 ± 2.4 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>1</sub>	4.65 0.45	47.2 ± 2.8 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>2</sub>	4.65 2.26	65.7 ± 3.3 <sup>f</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>3</sub>	4.65 4.52	74.1 ± 2.0 <sup>f</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> 2,4D <sub>4</sub>	4.65 9.05	79.6 ± 1.9 <sup>g</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
KIN NAA				
K <sub>0</sub> NAA <sub>1</sub>	0.00 0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> NAA <sub>2</sub>	0.00 2.26	10.2 ± 0.8 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> NAA <sub>3</sub>	0.00 4.52	22.6 ± 0.6 <sup>c</sup>	11.1 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>0</sub> NAA <sub>4</sub>	0.00 9.05	31.9 ± 1.4 <sup>d</sup>	22.2 ± 2.1 <sup>d</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> NAA <sub>1</sub>	2.32 0.45	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	7.4 ± 1.9 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> NAA <sub>2</sub>	2.32 2.26	9.3 ± 3.2 <sup>b</sup>	8.3 ± 2.1 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> NAA <sub>3</sub>	2.32 4.52	47.3 ± 3.5 <sup>e</sup>	29.8 ± 2.2 <sup>e</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>1</sub> NAA <sub>4</sub>	2.32 9.05	6.9 ± 3.7 <sup>b</sup>	8.3 ± 1.6 <sup>b</sup>	79.6 ± 1.9 <sup>c</sup>
K <sub>2</sub> NAA <sub>1</sub>	4.65 0.45	24.1 ± 3.2 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> NAA <sub>2</sub>	4.65 2.26	33.7 ± 2.9 <sup>d</sup>	15.9 ± 0.7 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> NAA <sub>3</sub>	4.65 4.52	50.5 ± 0.5 <sup>e</sup>	11.1 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
K <sub>2</sub> NAA <sub>4</sub>	4.65 9.05	57.9 ± 2.5 <sup>e</sup>	7.9 ± 1.2 <sup>b</sup>	12.0 ± 1.7 <sup>b</sup>

Within a column, means ± SD followed by the same letter are not significantly different at the 5% level of significance

growth parameters are not determined for inferring callus culture genetic stability, but their estimation is convenient when somaclonal callus variation may occur, as it affects secondary metabolites production (Bourgaud et al. 2001). Different  $\mu$ , td and GI values were shown by white and green callus obtained with treatment K<sub>1</sub>NAA<sub>4</sub> probably because somaclonal variation occurred. Skrzypek and Wysokinska (1997) reported for red callus of *Penstemon serrulatus* that the phenotypic characteristics of colour, growth rate and phenolic production pattern could be used as indicator of genetic stability.

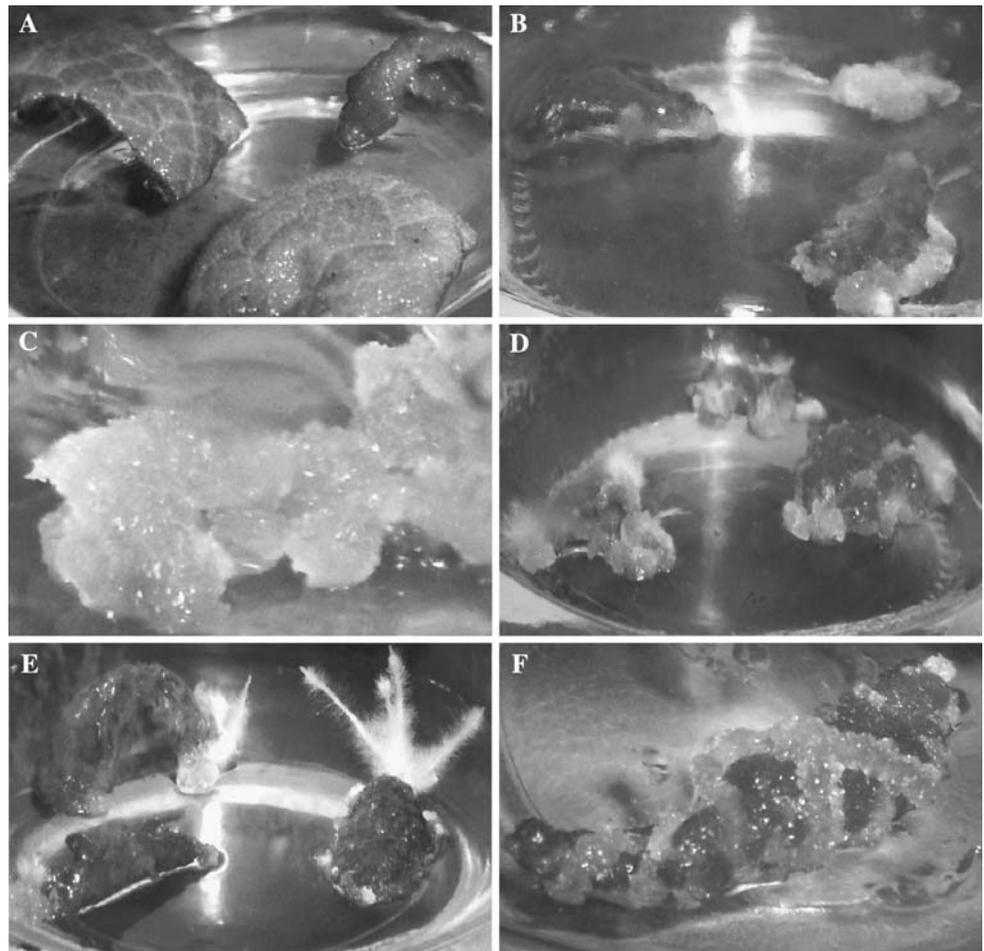
#### Production of phenylpropanoids in tissue cultures and wild-plants

All in vitro cultures (white callus, green callus, and root) produced verbascoside and linarin, but the hydroxycinnamic acids (caffeic, *p*-coumaric, ferulic and sinapic acids) were not produced in all (Table 3). High verbascoside production was detected for the in vitro cultures (66.24–86.26 mg g<sup>-1</sup> DW), while for linarin it was low (2.12–3.01 mg g<sup>-1</sup> DW). The hydroxycinnamic acids were produced in low concentrations (0.95–2.57 mg g<sup>-1</sup> DW) (Table 3). The hydroxycinnamic acids were probably not detected because they are precursors of the phenylpropanoid pathway (Buchanan et al. 2000).

The phenylpropanoid content in leaves from *B. cordata* was compared to that of *B. cordata* in vitro cultures. In folk medicine, leaves are the part of the plant used for curative purposes. In general terms, it was found that in vitro cultures (white callus, green callus and root) produced higher phenylpropanoid concentrations than the wild plant leaves (Table 3). Therefore, in vitro *B. cordata* cultures represent a potential source for producing phenylpropanoids instead of using wild plants.

After 10 subcultures of cell suspension culture, growth and phenylpropanoid production were characterized, and a typical growth pattern was observed (Fig. 2a). The maximum biomass (=12.93 g DW l<sup>-1</sup>) was reached after 14 days of culture (Fig. 2a), which had an  $Y_{X/S}$  = 0.68 g g<sup>-1</sup>, while GI = 8.14. A  $\mu$  value = 0.1945 day<sup>-1</sup> (corresponding to td = 3.56 days) was obtained from the exponential stage. Verbascoside and linarin production were associated with growth (Fig. 2a, b) because their specific production rates values ( $qp_v$  = 0.2135 ± 0.0275 day<sup>-1</sup> and  $qp_L$  = 0.1823 ± 0.0266 day<sup>-1</sup>, respectively) were not different from the specific growth rate value ( $\mu$  = 0.1945 ± 0.0096 day<sup>-1</sup>). These productions reached maximum levels (116.36 mg g<sup>-1</sup> DW, equivalent to 1.44 g l<sup>-1</sup> for verbascoside; 8.26 mg g<sup>-1</sup> DW, equivalent to 0.10 g l<sup>-1</sup> for linarin) during 16–22 days of culture (Fig. 2b). Hydroxycinnamic acids production was not associated with growth (Fig. 2a, b) probably because these acids are precursors of verbascoside

**Fig. 1** Callus and root induction from immature leaves explants of *B. cordata* to IAA, 2,4-D and NAA with KIN growth regulators: **a** explants under KIN; **b** white friable induced callus; **c** white proliferated friable callus; **d** whitish hairy root developed from callus; **e** whitish hairy root directly developed from explants; **f** callus going to venation



**Table 2** Growth parameter observed for three continuous subcultures of in vitro *B. cordata* cultures

Subculture	Growth parameter	In vitro cultures		
		White callus	Green callus	Root
1st	$\mu$ (day <sup>-1</sup> )	0.158 ± 0.014	0.098 ± 0.008	0.060 ± 0.011
	td (days)	4.395 ± 0.396	7.100 ± 0.552	11.541 ± 0.756
	GI	5.941 ± 0.522	4.311 ± 0.379	3.901 ± 0.261
2nd	$\mu$ (day <sup>-1</sup> )	0.153 ± 0.015	0.100 ± 0.007	0.0614 ± 0.016
	td (days)	4.525 ± 0.452	6.918 ± 0.463	11.2919 ± 1.054
	GI	5.824 ± 0.757	4.361 ± 0.567	4.0990 ± 0.455
3rd	$\mu$ (day <sup>-1</sup> )	0.161 ± 0.013	0.095 ± 0.008	0.0582 ± 0.015
	td (days)	4.319 ± 0.337	7.266 ± 0.617	11.9151 ± 1.058
	GI	6.071 ± 0.345	4.255 ± 0.242	3.9979 ± 0.324
Mean	$\mu$ (day <sup>-1</sup> )	0.157 ± 0.004 <sup>c</sup>	0.098 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.0599 ± 0.002 <sup>a</sup>
	td (days)	4.413 ± 0.104 <sup>a</sup>	7.094 ± 0.174 <sup>b</sup>	11.5827 ± 0.173 <sup>c</sup>
	GI	5.945 ± 0.124 <sup>c</sup>	4.309 ± 0.053 <sup>b</sup>	3.9994 ± 0.099 <sup>a</sup>

Within a row, the same letter following in vitro culture means ± SD of each growth parameter shows that they are not significantly different at the 5% level

and linarin. This fact can be established by observing changes in the phenylpropanoids production patterns at specific time points in the culture (Fig. 2a, b).

The verbascoside concentration of *B. cordata* cell suspension culture was similar to that reported for other cell suspension cultures (Ellis 1983; Inagaki et al. 1991;

**Table 3** Phenylpropanoid content from in vitro cultures and leaves methanolic extracts from *B. cordata*

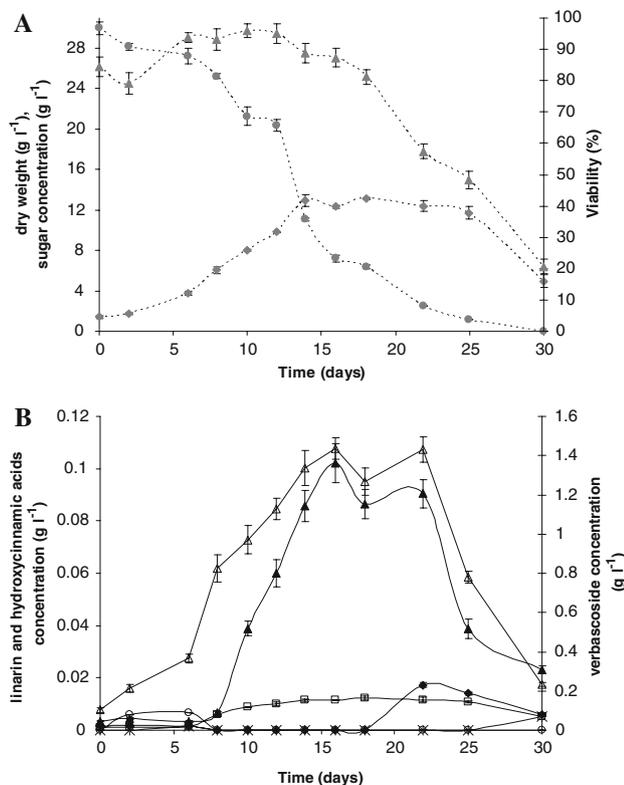
Phenylpropanoid compound	Tr (min)	Phenylpropanoid content from <i>B. cordata</i> samples (mg g <sup>-1</sup> DW)			
		Leaves	In vitro cultures		
			White callus	Green callus	Root
Caffeic acid	9.85	1.67 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.57 ± 0.09 <sup>c</sup>
<i>p</i> -Coumaric acid	12.74	1.88 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.31 ± 0.38 <sup>c</sup>
Ferulic acid	14.5	5.55 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Sinapic acid	15.61	1.04 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.03 <sup>b</sup>
Verbascoside	15.98	10.10 ± 1.48 <sup>a</sup>	86.26 ± 1.97 <sup>c</sup>	66.24 ± 1.17 <sup>b</sup>	68.29 ± 10.06 <sup>b</sup>
Linarin	22.89	41.81 ± 5.21 <sup>b</sup>	2.12 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.13 <sup>a</sup>	3.01 ± 0.50 <sup>a</sup>

Within a row, means ± SD followed by the same letter are not significantly different at the 5% level

Skrzypek and Wysokinska 1999; Nezbedova et al. 1999), so that its production may be considered as efficient. These reports did not evaluate  $Y_{X/S}$ , which is recommended when designing experiments, because its value depends on the kind of tissue cultured and on the growth conditions (Quintero 1993), not the viability. The reported value of  $Y_{X/S}$  (0.68 g g<sup>-1</sup>) was near to the upper limits reported for

plant cell cultures (e.g., 0.78 g g<sup>-1</sup> for *Chataranthus roseus*; Pareilleux and Vinas 1983). It is known that verbascoside production is often enhanced by both biotic and abiotic stress conditions (elicitation, increasing sucrose concentrations, varying PGRs or mineral nutrient concentrations) (Oksman-Caldentey and Inze 2004; Nezbedova et al. 1999; Skrzypek and Wysokinska 1999; Pletsch et al. 1993; Dell et al. 1989). Thus, we might assume that the production of verbascoside by *B. cordata* tissue culture may be significantly improved by testing those different conditions. Other promising incubation conditions used in cell suspension cultures guiding to increased secondary metabolites production are light intensity, temperature, and chemical agents that alter membrane permeability (Orozco-Sánchez and Rodríguez-Monroy 2007). None of these conditions were tested in this work, as they were beyond its scope. Also, future work might involve the transformation of *B. cordata* root cultures, as it is a way of improving  $\mu$ , enhancing growth, and increasing verbascoside production (Wysokinska and Rozga 1998). *B. cordata* root cultures research can be extended to include bioactive terpenoids production as they have been isolated from wild plant roots (Houghton et al. 2003).

Concluding, we can say that for the first time high percentages of callus (76.4–84.3%) and root (79.6%) responses by *B. cordata* have been reported. Callus induction was achieved by applying 2,4-D 0.45  $\mu$ M with KIN 2.32  $\mu$ M, and NAA 9.05  $\mu$ M with KIN 2.32  $\mu$ M for achieving root induction. Three in vitro line cultures were established once stability was reached: white and green callus, and root. All the line cultures had the capability to accumulate verbascoside, linarin and some hydroxycinnamic acids. Verbascoside was detected as the major phenylpropanoid accumulated in those in vitro cultures, 86.26 mg g<sup>-1</sup> DW being the high production evaluated for white callus culture. Concentrations for linarin (2.12–3.01 mg g<sup>-1</sup> DW) and hydroxycinnamic acids (0.95–2.57 mg g<sup>-1</sup> DW) were in comparison relatively low. Cells suspension culture of white callus were established, which



**Fig. 2** Growth and phenylpropanoid production in *B. cordata* cell suspension culture: **a** growth (—◆—) dry weight, (---●---) sugar totals and (—▲—) viability; **b** phenylpropanoid production (—Δ—) verbascoside, (—▲—) linarin, (—□—) sinapic acid, (—◆—) caffeic acid, (—\*—) *p*-coumaric acid and (—○—) ferulic acid. Results are the means ± SD of growth, viability, sugar and phenylpropanoid concentration measurements made on extracts by triplicate

were characterized for growth and phenylpropanoids production. Verbascoside and linarin production were associated to growth ( $qp = 0.2135$  and  $0.1823 \text{ day}^{-1}$ , respectively;  $\mu = 0.1945 \text{ day}^{-1}$ ), reaching their highest metabolite production ( $116.36$  and  $8.26 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ , respectively) when cell growth was in stationary stage. Callus and root cultures represent suitable systems for producing verbascoside as significantly higher concentrations are obtainable in comparison to those found in wild *B. cordata* plants ( $10.10 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ ). The successful establishment of callus and root line cultures represents the paving for researching about biotechnological advances in *B. cordata* tissue cultures regarding the secondary metabolite production. High verbascoside concentrations could be enhanced not only by stressing the cultures, but also genetic engineering could contribute to that purpose by controlling their biosynthesis pathway and also increasing linarin production. The root transformation technique represents a suitable system for producing phenylpropanoid and probably terpenoid metabolites. Also, application of these methodologies in bioreactors could give rise to the commercial production of these valuable metabolites. Furthermore, a micropagation protocol could be established that may contribute to palliate the overexploitation of *B. cordata* natural plant populations, and may guarantee the availability of this plant for the obtention of medicinal compounds.

**Acknowledgements** The authors thank the Programa de Apoyo de la Investigación Multidisciplinario (Desarrollo de fitomedicamentos a partir de plantas medicinales y sus extractos para el control de la diabetes mellitus) for the partial financing of this project, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through grant 81157. We also thank Biologist Jorge Santana Carrillo at UAM-I herbarium for taxonomic identification of the collected plant as *Buddleja cordata*.

## References

- Aguilar-Rodríguez S, Terrazas T, López-Mata L (2006) Anatomical wood variation of *Buddleja cordata* (Buddlejaceae) along its natural range in Mexico. *Trees (Berl)* 20:253–261. doi:10.1007/s00468-005-0007-5
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci* 161:839–851. doi:10.1016/S0168-9452(01)00490-3
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2000) Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plants Physiologists, Maryland
- Dell B, Elsegood C, Ghisalberti E (1989) Production of verbascoside in callus tissue of *Eremophila* spp. *Phytochemistry* 28:1871–1872. doi:10.1016/S0031-9422(00)97876-2
- Dhakulkar S, Ganapathi TR, Bhargava S, Bapat VA (2005) Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. *Plant Sci* 169:812–818. doi:10.1016/j.plantsci.2005.05.014
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Ellis BE (1983) Production of hydroxyphenylethanol glycosides in suspension cultures of *Syringa vulgaris*. *Phytochemistry* 22:1941–1943. doi:10.1016/0031-9422(83)80018-1
- Fernandez S, Wasowski C, Paladini AC, Marder M (2004) Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Behav* 77:399–404. doi:10.1016/j.pbb.2003.12.003
- Houghton PJ, Mensah AY, Iessa N, Hong LY (2003) Terpenoids in Buddleja: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry* 64:385–393. doi:10.1016/S0031-9422(03)00264-4
- Inagaki N, Nishimura H, Okada M, Mitsuhashi H (1991) Verbascoside production by plant cell cultures. *Plant Cell Rep* 9:484–487. doi:10.1007/BF00232101
- Kepinski S (2006) Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Curr Opin Plant Biol* 9:28–34. doi:10.1016/j.pbi.2005.11.001
- Li L, Tsao R, Liu Z, Liu S, Yang R, Young JC, Zhu H, Deng Z, Xie M, Fu Z (2005) Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1063:161–169. doi:10.1016/j.chroma.2004.11.024
- Martínez M (1989) Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas, México
- Martínez-Vázquez M, Ramírez-Apan TO, Lastra AL, Bye R (1998) A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. *Planta Med* 64:134–137
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nezbedova L, Hesse M, Dusek J, Werner C (1999) Chemical potential of *Aphelandra* sp. cell cultures. *Plant Cell Tissue Org* 58:133–140. doi:10.1023/A:1006363612428
- Oksman-Caldentey KM, Inze D (2004) Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci* 9:433–440. doi:10.1016/j.tplants.2004.07.006
- Orozco-Sánchez F, Rodríguez-Monroy M (2007) Cell suspension culture of *Azadirachta indica* for production of a bioinsecticide. *Rev Mex Ing Quim* 6:251–258
- Pareilleux A, Vinas R (1983) Influence of the aeration rate on the growth yield in suspension cultures of *Carharanthus roseus* (L.) G. Don. *J Ferment Technol* 61:429–433
- Pierik R (1990) Cultivo in vitro de las plantas superiores. Mundi-prensa, España
- Pletsch M, Piacente S, Pizza C, Charlwood B (1993) The accumulation of phenylpropanoid glycosides in tissue cultures of *Tecoma sambucifolium*. *Phytochemistry* 34:161–165. doi:10.1016/S0031-9422(00)90799-4
- Quintero R (1993) Ingeniería bioquímica. Alhambra mexicana, México
- Sarin R (2005) Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology* 4:79–93
- Shoyama Y, Matsumoto M, Nishioka I (1986) Four caffeoyl glycosides from callus tissue of *Rehmannia glutinosa*. *Phytochemistry* 25:1633–1636. doi:10.1016/S0031-9422(00)81224-8
- Skrzypczek Z, Wysokinska H (1997) Phenolics from cell suspension cultures of *Penstemon serrulatus*; relation to plant organs. *Z Naturforsch* 52c:426–432

- Skrzypek Z, Wysokinska H (1999) Accumulation of phenylethanoids in suspension cultures of *Penstemon serrulatus* Menz. Biotechnol Lett 21:691–693. doi:[10.1023/A:1005554224150](https://doi.org/10.1023/A:1005554224150)
- Wysokinska H, Rozga M (1998) Establishment of transformed root cultures of *Paulownia tomentosa* for verbascoside production. J Plant Physiol 152:78–83
- Yamamoto H, Yoshida K, Kondo Y, Inoue K (1998) Production of cornoside in *Abeliophyllum distichum* cell suspension cultures. Phytochemistry 48:273–277. doi:[10.1016/S0031-9422\(97\)01134-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)01134-5)

México, D.F. a 4 de febrero de 2010

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**Establecimiento de cultivos de tejido de la planta medicinal *Buddleja  
cordata* (Buddlejaceae) y su capacidad productora de fenilpropanoides**

que presentó:

**María Elena Estrada Zúñiga**

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa  
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter  
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Mario Rodríguez Monroy  
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN

Comité de evaluación:

Presidente: Dr. Jaime Eduardo Vernon Carter  
Universidad Autónoma Metropolitana

Secretario: Dra. Leticia Buendía González  
Universidad Autónoma del Estado de México

Vocal: Dr. Mario Rodríguez Monroy  
Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN

Vocal: Dr. Juan Orozco Villafuerte  
Universidad Autónoma del Estado de México