

## Producción de metabolitos secundarios en cultivo de raíces *in vitro* y suspensiones celulares de *Ipomoea carnea* spp. *carnea* Jacq.

Consuelo Rojas-Idrogo<sup>1</sup>, Massuo Jorge Kato<sup>2</sup>, Guillermo Eduardo Delgado-Paredes<sup>1</sup>, Eny Iochet Segal Floh<sup>3</sup> & Walter Handro<sup>3</sup>

1 Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria, Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú.

2 Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748 – Bloco 11T, 05508-900, São Paulo, Brasil.

3 Laboratório de Biología Celular de Plantas (BIOCEL), Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, SP 11461, Brasil.

### Resumen

Correspondencia  
G.E. Delgado-Paredes  
E-mail: [guidelg2001@yahoo.es](mailto:guidelg2001@yahoo.es)  
**Recibido:** 27 octubre 2013  
**Aceptado:** 5 febrero 2014  
**Publicado on-line:** 17 noviembre 2014

*Ipomoea carnea* spp. *carnea* Jacq. es un arbusto dominante en el bosque estacionalmente seco del Perú y Ecuador. Los cultivos de raíces fueron establecidos en medio MS con diferentes concentraciones de AIB, sacarosa y combinaciones de AIB-sacarosa. Diversos explantes obtenidos de plántulas *in vitro* y plantas silvestres se cultivaron en diferentes combinaciones de 2,4-D, AIA, ANA y BAP, para inducir callos friables, dependiendo del tipo de explante y los reguladores de crecimiento. Suspensiones celulares se establecieron a partir de callos y estudiaron en su crecimiento y acumulación de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios identificados en cultivo de raíces y suspensiones celulares fueron fenoles, diversos flavonoides y la cumarina escopoletina.

**Palabras clave:** Bosque estacionalmente seco, Cultivos celulares, Determinación de fenoles, Flavonoides y escopoletina, Planta tóxica, Reguladores de crecimiento.

### Abstract

*Production of secondary metabolites in vitro root cultures and cellular suspension of Ipomoea carnea spp. carnea Jacq.*

*Ipomoea carnea* spp. *carnea* Jacq. is a dominant shrub in the seasonally dry forest of Peru and Ecuador. The root cultures were established on MS medium with different concentrations of IBA, sucrose and combinations of IBA-sucrose. Several explants obtained from *in vitro* plantlets and wild plants were cultured in different combinations of 2,4-D, IAA, NAA and BAP in order to induce friable calluses, which was depended of explant type and plant growth regulators. From a callus culture, cell suspensions were established and their growth and metabolite accumulation studied. Secondary metabolites identified, in the root and cell suspension cultures, were phenols, flavonoids, and coumarin scopoletin.

**Key words:** Cellular cultures, Phenols determination, Flavonoids and scopoletin, Plant growth regulators, Seasonally dry forest, Toxic plant.

## Introducción

La familia Convolvulaceae comprende aproximadamente 50-60 géneros con alrededor de 1600-1700 especies (Mabberley 1989) las que exhiben una amplia diversidad de caracteres morfológicos y un amplio rango de hábitos ecológicos. El género *Ipomoea* Sendtn. ex Vell. contiene alrededor de 500 especies (Mabberley 1989, McDonald & Mabry 1992); sin embargo, Austin & Huamán (1996) consideran que su número está entre 600-700 especies, con más de la mitad concentradas en las Américas. Para el Perú se han reportado 24 especies de *Ipomoea* (Brako & Zarucchi 1993) aunque para Austin & Huamán (1996) existen 52 especies. Los análisis RAPD-PCR y SDS-PAGE en proteínas de semillas permitiría definir varios aspectos sobre la diversidad genética y las relaciones taxonómicas entre las especies de *Ipomoea* (Abdel Khalik et al. 2012).

*I. carnea* spp. *carnea* es originaria del norte del Perú y se le conoce con el nombre vulgar de “borrachera”, extendiéndose por vastas regiones del BES (bosque estacionalmente seco), donde es consumida mayormente por el ganado caprino en la época de sequía cuando no hay otras alternativas de alimento, produciendo dependencia en las cabras y originando su intoxicación, adelgazamiento, apatía, pérdida de equilibrio, aborto en las preñadas, debilidad, parálisis de las extremidades posteriores y finalmente su muerte (Haraguchi et al. 2003). La toxicidad de *I. carnea* spp. *carnea* e *I. carnea* spp. *fistulosa* (Mart. ex Choisy) D. Austin, en el ganado caprino, ovino y vacuno, se atribuye a la presencia de los alcaloides swainsonina y calistegina B1, B2, B3 y C1 (Górniak et al. 2010) debido a sus efectos inmunomoduladores por inhibición del metabolismo de las glicoproteínas (Hueza & Górniak 2011). Otra importancia de *I. carnea* está relacionada a la presencia de numerosos hongos endofíticos como *Curvularia* (Wakker) Boedijn, *Aspergillus* Micheli, *Fusarium* Link ex Grey, entre otros, asociados a diversos tejidos en plantas de la India, los que han mostrado actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg), entre otras, y fungicida (*Trichophyton rubrum* Malmsten y *Aspergillus fumigatus* Fresenius) (Tayung et al. 2012). Estudios recientes indicaron que en Tailandia se le utiliza en el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA/AIDS)

(Woradulayapinij et al. 2005).

Entre las especies de Convolvulaceae, *I. batatas* L. (camote, boniato o batata) es la de mayor importancia económica debido a sus raíces tuberosas, consumidas por amplios sectores de la población mundial (Hironori et al. 2007); otra especie comestible es *I. aquatica* Forssk., conocida como “espinaca de agua” (Austin 2007a). Entre las especies silvestres de la sección *Batatas*, *I. trifida* (Kunth) G. Don e *I. triloba* L., son potencialmente útiles en el mejoramiento genético convencional de *I. batatas* (Austin 1988). Existen, sin embargo, un número significativo de especies de Convolvulaceae con real y potencial utilidad como ornamentales e incluso con propiedades medicinales y culinarias, como *Merremia dissecta* (Jacq.) Hallier f. (Austin 2007b). Recientemente, Meira et al. (2012) revisaron el género *Ipomoea* enfatizando en sus usos tradicionales, aspectos químicos y actividades biológicas.

En cultivo de tejidos, los trabajos sobre inducción de callos y procesos morfogénicos en *I. batatas* si bien se iniciaron en la década del 70, solamente en el últimos 20 años los resultados fueron relevantes, destacando los trabajos sobre organogénesis indirecta (El Far et al. 2009) y embriogénesis somática (Sefasi et al. 2012); sin embargo, en ambos casos el proceso está muy influenciado por el genotipo requiriéndose realizar diversas modificaciones en las condiciones físico-químicas del cultivo. En otras especies como *I. obscura* (L.) Ker Gawl., una enredadera originaria de la India con potencial medicinal, se indujo regeneración indirecta de brotes (Mungole et al. 2009); sin embargo, en otro estudio realizado en la misma especie, solamente se observó inducción de callos y formación de raíces (Sinha & Bandyopadhyay 2011). En *I. aquatica* únicamente se indujo formación de callos (Prasad et al. 2006) y en *I. carnea* spp. *carnea* no se conocen trabajos en cultivo de tejidos.

Por otro lado, la producción de metabolitos secundarios valiosos, en cultivos celulares, es una alternativa atractiva en relación a su extracción de plantas silvestres y a su síntesis química (Boonsongcheep et al. 2010). Alcaloides, compuestos fenólicos y glicolípidos son los más comunes componentes biológicamente activos obtenidos en los extractos de plantas de *Ipomoea* (Meira et al. 2012). En suspensiones celulares de *I. batatas* se identificaron los ácidos clorogénico y cafeico y

observó cambios en la composición de antocianinas (Konczak-Islam et al. 2003); asimismo, se identificó a 7-hidroxicoumarina (umbeliferona) utilizando como elicitador cloruro de mercurio (Smith et al. 2001) y en callos de raíces tuberosas moradas se sintetizaron antocianinas (Terahara et al. 2000). En otras especies como *I. aquatica* se observó actividad antioxidante en callos de hoja, específicamente del radical libre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Prasad et al. 2006). En *I. carnea* spp. *carnea* e *I. carnea* spp. *fistulosa*, si bien la literatura reporta numerosos trabajos en fitoquímica (Meira et al. 2012), por el contrario, sobre inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares, no se reportan trabajos realizados al respecto.

El presente estudio tuvo como objetivos la inducción de callos, el establecimiento de cultivo de raíces y suspensiones celulares, así como la determinación de algunos metabolitos secundarios de *Ipomoea carnea* spp. *carnea*, a fin de utilizar estos protocolos en posteriores investigaciones sobre biosíntesis de compuestos secundarios, que sustenten su producción a gran escala en sistemas *in vitro*.

## Material y métodos

### Material vegetal

Las semillas y estacas de plantas adultas de "borrachera" *Ipomoea carnea* spp. *carnea* Jacq. fueron recolectadas en el bosque estacionalmente seco de la región Lambayeque (Perú). La especie fue identificada por el Dr. Guillermo E. Delgado en base a la descripción realizada por Austin (1977), depositándose las muestras en el Herbario PRG de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque (Perú). Los cultivos *in vitro* se realizaron en el Laboratório de Biología Celular de Plantas del Instituto de Ciências Biológicas y los análisis fitoquímicos en el Laboratório de Química de Produtos Naturais del Instituto de Química, ambos en la Universidade de São Paulo, Brasil.

### Germinación de semillas y propagación por estacas

En el laboratorio, una semana después de recolectadas, las semillas fueron manualmente desprovistas de la cubierta de pelos y en grupos de 25 uni-

dades se desinfectaron con alcohol etílico 70% durante 1 min en NaClO comercial (CLOROX®, 4,9% de cloro activo) durante 20 min. El medio de cultivo incorporó las sales minerales RM-64 (Linsmaier & Skoog 1965), la vitamina tiamina, HCl 1 mg<sup>l</sup> y m-inositol 100 mg<sup>l</sup>, sacarosa 2% y goma gellan (Phytigel®) 1,5 g<sup>l</sup>. Antes de la incorporación del agente gelificante, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 ± 0,1 con KOH y HCl 0,1 N. La esterilización se realizó en autoclave a 121 °C durante 20 min. Las semillas se incubaron en condiciones de oscuridad y 24-26 °C.

Estacas de 20 cm de longitud y 1,5-2 cm de diámetro se sembraron en bolsas conteniendo tierra de cultivo esterilizada, estableciéndose en invernadero.

### Cultivo de raíces, inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares

Un promedio de tres raíces de 5 cm de longitud, obtenidas de plántulas de semillas germinadas *in vitro* y un peso fresco promedio de 0,025 g, se cultivaron en Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo líquido, el cual incorporó las sales minerales RM-64, vitaminas, ácido indolbutírico (AIB) 0,0; 0,5; 1,0 y 2,0 mg<sup>l</sup> y las concentraciones de sacarosa 0; 0,5; 1; 2; 4; 6 y 8 %. Los cultivos se mantuvieron en rotación a 100 rpm, en 35 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de irradiancia y 24-26 °C las 24 h del día, realizándose subcultivos mensuales. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

En la inducción de callos, se utilizaron explantes de plántulas *in vitro* (hoja cotiledonar, peciolo, hipocótilo y raíz) y de plantas adultas brotadas de las estacas (hoja, peciolo, pedúnculo floral y anteras). El tamaño promedio fue 5 cm de lado y 5-10 mm de longitud. Los explantes de estacas se desinfectaron de manera similar a las semillas, pero reduciendo la acción del NaClO a 3 min. La asepsia de las plántulas *in vitro* se consideró *per se*. Como medio de cultivo, se utilizó las sales minerales RM-64 suplementadas por varios tratamientos de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0,2-4,0 mg<sup>l</sup>) y combinaciones de ácido indol-3-acético (AIA) (0,5-4,0 mg<sup>l</sup>)–6-benzilaminopurina (BAP) (0,1-0,5 mg<sup>l</sup>) y ácido naftaleneacético (ANA) (0,5-4,0 mg<sup>l</sup>)–BAP (0,5 mg<sup>l</sup>), vitaminas, sacarosa 2% y goma gellan 1,5 g<sup>l</sup>. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

En el establecimiento de suspensiones celulares, los callos se subcultivaron en las sales minerales RM-64 con sacarosa 2 % y BAP 2,0 mg l<sup>-1</sup>, e incubaron en luz (35 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) y otros en oscuridad. Después de 45 días, regiones friables de callos clorofilados y aclorofilados, inducidos de hojas cotiledonales de plántulas *in vitro*, se subcultivaron en dos tratamientos de medio de cultivo con 2,4-D 0,2 mg l<sup>-1</sup>-ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) 1,0 mg l<sup>-1</sup> y AIA 0,2 mg l<sup>-1</sup>-BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup> hasta el establecimiento de la suspensión celular en Erlenmeyers de 250 ml, con 50 ml de medio de cultivo. En un ensayo adicional, suspensiones celulares clorofiladas y aclorofiladas se establecieron en los mismos tratamientos de medio de cultivo ensayados (2,4-D-AG<sub>3</sub> y AIA-BAP) con el suplemento de sacarosa 2, 4 y 6%. Se realizaron cinco subcultivos previos antes de la evaluación del crecimiento.

### **Evaluación del crecimiento de las suspensiones celulares**

En la determinación del volumen de empaquetamiento celular se utilizó el método de King (1984) modificado, adaptándose un tubo de ensayo graduado a Erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo. En esta evaluación [masa celular (g/50 ml) x tiempo (días)] se escogieron siete puntos de la curva determinándose los pesos fresco y seco en 21 Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo 50 ml del medio de cultivo de experimentación, retirándose tres Erlenmeyers por día; la desecación de la masa celular se realizó en estufa a 50 °C durante 24 h. Las evaluaciones abarcaron un lapso de siete días.

### **Análisis químicos**

En la extracción de fenoles totales de las suspensiones celulares clorofiladas y aclorofiladas, en medio de cultivo 2,4-D-AG<sub>3</sub> y AIA-BAP, se siguió la metodología descrita por Wescott & Henshaw (1976). Muestras de 0,2 g de peso seco, se trituraron con arena lavada y sometieron en baño de María a 60 °C por tres veces consecutivas con etanol 70 % (v/v) durante 15 min. En la estimación de los fenoles totales, se empleó el reactivo de Folin-Denis y ácido gálico como reactivo patrón, en las concentraciones de 10, 30, 50, 70 y 90 mg l<sup>-1</sup>. La determinación fue realizada en espectrofotómetro UV-1601 Shimadzu con tres lecturas a 725 nm de absorbancia en 1 ml de muestra, expresándose los valores en μg g<sup>-1</sup>.

La extracción de flavonoides, tanto de células frescas de las suspensiones celulares como de raíces, se realizó en 200 y 500 mg de muestra, respectivamente. El material fue congelado en nitrógeno líquido, macerado y sometido a extracción por agitación con 4 ml de metanol 60% con dietilditiocarbamato de sodio 0,5 M; luego se filtró y centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. En los análisis se utilizó el sistema CLAE (cromatografía líquida de alta eficiencia) en cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-10QS y detector UV-Vis Shimadzu SPD-10AVup de inyector manual. Asimismo, se utilizó una mezcla de patrones de flavonoides conocidos (250 ng μl<sup>-1</sup>), conteniendo rutina, quercetina, miricetina, morina, quercitrina, apigenina y campferol y como fase móvil un gradiente de elución lineal de 20-40% de acetonitrila en ácido trifluoroacético 0,1% durante 30 min con flujo de 1 ml min<sup>-1</sup> y un volumen de inyección de la muestra de 10 μl.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar DCA (Zar, 2009) en la evaluación del crecimiento de raíces *in vitro*, procesándose los datos a través de un ANOVA de un solo factor, teniendo como tratamientos los compuestos AIB, sacarosa y la combinación AIB-sacarosa; luego se aplicó la prueba de Tukey (α= 0,05), para determinar las diferencias entre tratamientos. Los resultados sobre inducción de callos se expresaron cualitativamente mediante una escala empírica y cuantitativamente mediante porcentajes, mientras que para suspensiones celulares se hizo una representación gráfica de los promedios con sus respectivas desviaciones estándares.

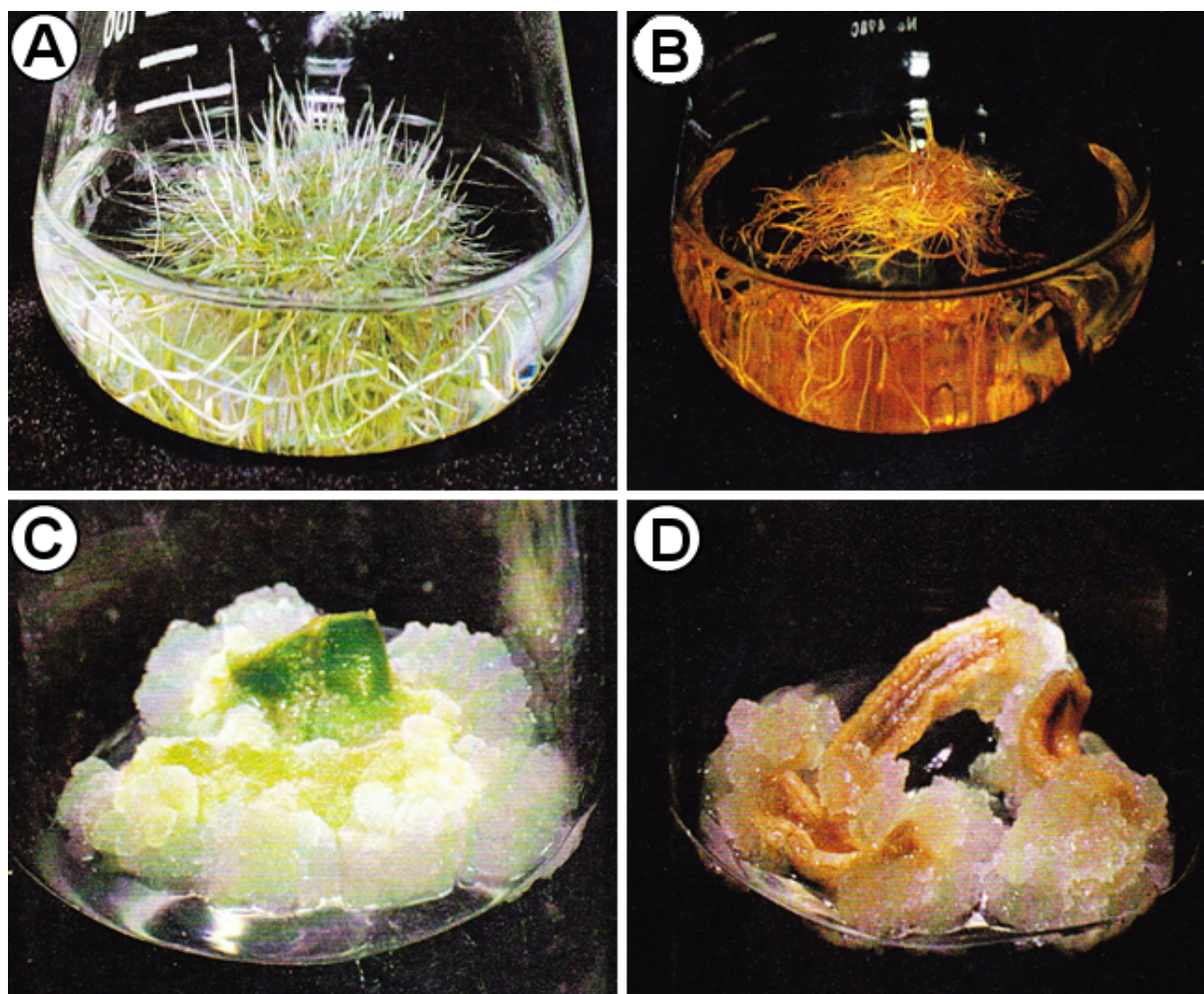
## **Resultados y discusión**

### **Germinación de semillas**

La germinación de semillas *in vitro* fue 100% en 26-28 °C y 18-6 h de oscuridad-luz, sin observarse contaminación por hongos o bacterias; en otras condiciones de temperatura y fotoperiodo la germinación *in vitro* fue 20%, tan igual a lo observado en condiciones de invernadero.

### **Cultivo de raíces**

El mayor crecimiento de raíces, después de 30 días de cultivo y partiendo de un peso fresco de



**Figura 1.** Desarrollo de raíces e inducción de callos de *Ipomoea carnea* spp. *carnea*. **A:** RM-64, AIB 1,0 mg $l^{-1}$  y sacarosa 8%; **B:** RM-64, AIB 1, 0 mg $l^{-1}$  y sacarosa 8%, después del tercer subcultivo; **C:** Callos en hoja cotiledonar (RM-64, AIA 0,1 mg $l^{-1}$  y sacarosa 2%); **D:** Callos en anteras (RM-64, AIA 0,1 mg $l^{-1}$  y sacarosa 2%).

**Figure 1.** Development of roots and callus induction of *Ipomoea carnea* spp. *carnea*. **A:** RM-64, 1.0 mg $l^{-1}$  IBA and 8% sucrose; **B:** RM-64, 1.0 mg $l^{-1}$  IBA and 8% sucrose, after the third subculture. **C:** Cotyledonary leaf callus (RM-64, 0.1 mg $l^{-1}$  IAA and 2% sucrose); **D:** Callus in anthers (RM-64, 0.1 mg $l^{-1}$  IAA and 2% sucrose).

0,025 g, se observó en los siguientes tratamientos de medios de cultivo con AIB 1,0 mg $l^{-1}$  (a), sacarosa 8% (b) AIB 1,0 mg $l^{-1}$  más sacarosa 8% (c), alcanzando una tasa de 0,39; 0,86 y 1,03 g de peso fresco, incrementándose en 15,6; 34,4 y 41,2 veces respectivamente (Tabla 1). Sin embargo, solamente las raíces que crecieron con sacarosa y AIB se mantuvieron en buenas condiciones fisiológicas, subcultivándose varias veces (Fig. 1B), siempre que procedieran de plántulas de semillas germinadas *in vitro*, en cambio en otras condiciones de medio de cultivo y cuya procedencia fue de otros tejidos o de callos, las raíces se tornaron amarillas y finalmente murieron (Fig. 1B).

Por otro lado, secciones de raíces formadas en medio de cultivo líquido y utilizadas como explantes en medio de cultivo gelificado suplemen-

tado con AIA ó 2,4-D 2,0 mg $l^{-1}$ , en combinación con BAP 0,1 mg $l^{-1}$ , indujeron solamente raíces laterales, en tanto que en medio de cultivo con AIA 0,1 mg $l^{-1}$  y BAP 2,0 mg $l^{-1}$  desarrollaron callos en 100% de los explantes.

La literatura no reporta trabajos en cultivo de raíces en especies de *Ipomoea* pero sí existen numerosos trabajos en otros grupos vegetales; así tenemos el incremento de biomasa de raíces de *Astragalus chrysochlorus* Boiss. & Kotschy (Hasançebi et al. 2011) y *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch.Bip. ex Walp. (Khalafalla et al. 2009), en medio de cultivo líquido con diversas clases y concentraciones de auxinas. Recientemente, el sistema de raíces genéticamente transformadas, utilizando *Agrobacterium rhizogenes* (Riker et al.) Conn, incrementó la producción de

diversos metabolitos secundarios como el alcaloide de nicotina en *Nicotiana tabacum* L. (Zhao et al. 2013), isoflavonoides en *Pueraria candollei* var. *candollei* Benth. (Danphitsanuparn et al. 2012) y naftoquinonas antitumorales en *Lithospermum canescens* (Michx.) Lehm. (Syklovska-Baranek et al. 2012).

Tratamientos		Respuesta	
AIB (mg l <sup>-1</sup> )	Sacarosa (%)	Peso final (g)	Δ peso fresco (n° veces)
0,0		0,13 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,2
0,5		0,28 ± 0,03 <sup>b</sup>	11,2
1,0		0,39 ± 0,02 <sup>c</sup>	15,6
2,0		0,18 ± 0,03 <sup>a</sup>	7,2
	0,0	0,10 ± 0,00 <sup>a</sup>	4,0
	0,5	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,0
	1,0	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,8
	2,0	0,35 ± 0,05 <sup>b</sup>	14,0
	4,0	0,50 ± 0,04 <sup>c</sup>	20,0
	6,0	0,78 ± 0,06 <sup>d</sup>	31,2
	8,0	0,86 ± 0,03 <sup>d</sup>	34,4
1,0	0,5	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,0
1,0	1,0	0,12 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,8
1,0	2,0	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,0
1,0	4,0	0,35 ± 0,03 <sup>b</sup>	14,0
1,0	6,0	0,48 ± 0,02 <sup>c</sup>	19,2
1,0	8,0	1,03 ± 0,10 <sup>d</sup>	41,2

**Tabla 1.** Crecimiento de raíces de *Ipomoea carnea* spp. *carnea* en medio de cultivo RM-64 suplementado con AIB, sacarosa y sacarosa + AIB, después de 30 días de cultivo. Valores con letras diferentes en el mismo grupo son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Table 1.** Root growth of *Ipomoea carnea* spp. *carnea* in culture medium supplemented with RM-64, AIB, sucrose, and sucrose + AIB, after 30 days of culture. Values with different letters in the same group are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## Inducción de callos

En todos los explantes, procedentes de plántulas *in vitro*, y tratamientos ensayados, en especial en las combinaciones AIA-BAP y ANA-BAP, se indujo 100% de callos y grado ++ de desarrollo (Fig. 1C). En los tratamientos con 2,4-D 0,5 y 1,0 mg l<sup>-1</sup> se observó 30 a 50 % de callos, aunque con grado +++ de desarrollo, en todos los explantes ensayados excepto peciolo. ANA o AIA 0,5 mg l<sup>-1</sup>, sin suplemento de BAP, no indujo callos en el primer caso y solamente raíces en el segundo caso (Tabla 2).

En explantes de plantas silvestres (Fig. 1D), solamente en hojas y peciolo se indujeron callos

en las combinaciones ANA-BAP y AIA-BAP con 100% de frecuencia y grados ++ y +++ de desarrollo, mientras que con 2,4-D 0,2 mg l<sup>-1</sup> la inducción de callos fue esporádica (20%). Las anteras mostraron una respuesta media en la inducción de callos, alcanzando una frecuencia de 40%, en grado +++ de desarrollo, únicamente en el tratamiento 2,4-D 0,2 mg l<sup>-1</sup> y en el pedúnculo floral solamente se indujo callo en el tratamiento AIA 0,1-BAP 0,2 mg l<sup>-1</sup>, mostrando 100% de frecuencia y grado +++ de desarrollo (Tabla 3).

Entre las especies de *Ipomoea* a las que se indujeron callos, destaca *I. batatas*, debido a que mereció una mayor atención por los investigadores por su importancia económica alimenticia e industrial. En efecto, en raíces tuberosas se indujo callos en medio de cultivo con 2,4-D 0,5 mg l<sup>-1</sup>, que posteriormente produjeron líneas celulares con alto contenido de antocianinas, cuando se subcultivaron en medio de cultivo con 2,4-D 2,0 mg l<sup>-1</sup> (Konczak-Islam et al. 2000). En otro trabajo, utilizando segmentos caulinares, se observó inducción de callos en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento y formación de brotes cuando los callos se subcultivaron en medio de cultivo de regeneración con diversas citocininas (El Far et al. 2009). Estos resultados confirman observaciones iniciales de que la inducción de callos no es un proceso complejo en cultivo de tejidos de *I. batatas* (Liu et al. 2001), contrariamente a lo observado en la regeneración de plantas, tanto por organogénesis como por embriogénesis somática, donde en muy escasos genotipos se observó tales procesos morfogénicos.

En otras especies, como *I. obscura* (L.) Ker Gawl., los callos se indujeron en hojas, segmentos nodales y ápices caulinares, en medio de cultivo MS con varias combinaciones de 2,4-D y ANA con KIN y BAP, observándose que los mayores porcentajes de inducción (>90%) ocurrieron en las combinaciones 2,4-D-KIN, ANA-BAP y ANA-KIN, destacando los explantes de hojas (Mungole et al. 2009); asimismo, en otro trabajo realizado en explantes de hoja, en la misma especie, se obtuvieron resultados similares, es decir, los callos se indujeron en hojas destacando la combinación ANA-BAP (Sinha & Bandyopadhyay 2011). Estos resultados concuerdan en parte con los obtenidos en el trabajo que se presenta donde las hojas cotiledonales de plantas *in vitro* y las hojas de plantas silvestres mostraron una mayor inducción

Tratamientos (mg l <sup>-1</sup> )	Explantes (%)			
	Hoja cotiledonar	Peciolo	Hipocótilo	Raíz
<b>2,4-D</b>				
0,2	-	-	-	-
0,5	+++ (30)	-	-	+++ (30)
1,0	-	-	+++ (50)	-
2,0	-	-	-	-
4,0	-	-	-	-
<b>AIA/BAP</b>				
0,5/0,0	R	R	-	-
0,5/0,5	++ (100)	++ (100)	++ (100)	++ (100)
1,0/0,5	++ (100)	++ (100)	++ (100)	++ (100)
2,0/0,5	-	++ (100)	++ (100)	++ (100)
4,0/0,5	++ (100)	++ (100)	++ (100)	++ (100)
2,0/0,1	-	-	-	R
0,1/0,2	++ (100)	++ (100)	++ (100)	++ (100)
<b>ANA/BAP</b>				
0,5/0,0	-	-	-	-
0,5/0,5	++ (100)	++ (100)	++ (30)	++ (40)
1,0/0,5	++ (100)	++ (100)	++ (60)	++ (60)
2,0/0,5	++ (100)	++ (100)	++ (100)	++ (20)
4,0/0,5	++ (20)	++ (100)	-	-

**Tabla 2.** Efecto de varias concentraciones de reguladores de crecimiento en la inducción de callos en diferentes explantes de plántulas *in vitro* de *Ipomoea carnea* spp. *carnea*, después de 45 días de cultivo. —: sin formación de callo; +: callo cubre 1/3 del explante; ++: callo cubre 1/2 a 2/3 del explante; +++: callo cubre todo el explante; R: raíces.

**Table 2.** Effect of various concentrations of growth regulators on callus induction on different explants of *in vitro* plantlets of *Ipomoea carnea* spp. *carnea*, 45 days of culture after. —: without callus formation; +: callus covers 1/3 of the explant; ++: callus covers 1/2 to 2/3 of the explant; +++: callus covers the whole explant; R: roots.

Tratamientos (mg l <sup>-1</sup> )	Explantes (%)			
	Hoja	Peciolo	Pedúnculo floral	Anteras
<b>2,4-D</b>				
0,2	++ (20)	++ (20)	-	+++ (40)
0,5	-	-	-	++ (20)
1,0	-	-	-	-
2,0	-	-	-	-
4,0	-	-	-	-
<b>AIA/BAP</b>				
0,5/0,0	-	R	-	-
0,5/0,5	++ (100)	-	-	-
1,0/0,5	++ (100)	++ (100)	-	-
2,0/0,5	-	++ (100)	-	-
4,0/0,5	++ (100)	++ (100)	-	-
2,0/0,1	-	-	-	-
0,1/0,2	+++ (100)	+++ (100)	+++ (100)	-
<b>ANA/BAP</b>				
0,5/0,0	-	-	-	-
0,5/0,5	++ (100)	++ (100)	-	-
1,0/0,5	++ (100)	++ (100)	-	-
2,0/0,5	++ (100)	++ (100)	-	-
4,0/0,5	++ (20 ±)	++ (100)	-	-

**Tabla 3.** Efecto de varias concentraciones de reguladores de crecimiento en la inducción de callos en diferentes explantes de plantas silvestres de *Ipomoea carnea* spp. *carnea*, después de 45 días de cultivo. —: sin formación de callo; +: callo cubre 1/3 del explante; ++: callo cubre 1/2 a 2/3 del explante; +++: callo cubre todo el explante; R, raíces.

**Table 3.** Effect of various concentrations of growth regulators on callus induction on different explants from wild plants of *Ipomoea carnea* spp. *carnea*, 45 days of culture after. —: without callus formation; +: callus covers 1/3 of the explant; ++: callus covers 1/2 to 2/3 of the explant; +++: callus covers the whole explant; R: roots.

de callos respecto al resto de explantes ensayados, lo mismo que la combinación ANA-BAP sobre otras combinaciones ensayadas; sin embargo, 2,4-D, como único regulador de crecimiento, no resultó favorable, posiblemente porque no interactuó con ninguna clase de citocininas.

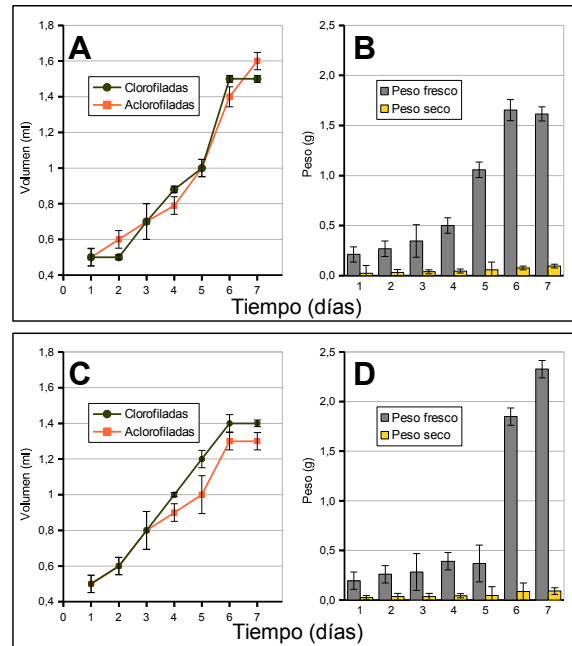
En *I. carnea* spp. *carnea* no se cuenta con trabajos sobre inducción de callos.

### Suspensiones celulares

El establecimiento de suspensiones celulares se realizó en los mismos medios de cultivo utilizados en la inducción de callos friables (2,4-D 0,2-AG<sub>3</sub> 1,0 mg l<sup>-1</sup> y AIA 0,2-BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup>). Las suspensiones celulares de anteras y pedúnculo floral si bien se iniciaron incoloras, luego se tornaron anaranjadas y finalmente murieron, en cambio las de callos clorofilados y aclorofilados se mantuvieron por mayor tiempo y durante varios ciclos de subcultivos, en especial las aclorofiladas, siempre que el subcultivo se realizara en el quinto día de cultivo, antes que alcanzaran la fase estacionaria.

Con el tratamiento con 2,4-D 0,2-AG<sub>3</sub> 1,0 mg l<sup>-1</sup>, una vez establecida la suspensión celular en células clorofiladas y aclorofiladas, las fases de reposo, exponencial y linear abarcaron cada una 48 h, respectivamente, hasta alcanzar la fase estacionaria en el séptimo día de cultivo, con un volumen de empaquetamiento celular de 1,5 ml, para células clorofiladas, y 1,6 ml, para células aclorofiladas (Fig. 2a); el peso fresco registró alrededor de 1,5 g (Fig. 2b), en ambos sistemas de cultivo. En el tratamiento con AIA 0,2-BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup>, en el crecimiento de ambos tipos celulares, la fase de reposo duró 48 h y las fases exponencial y linear no estuvieron claramente delimitadas pero entre ambas abarcaron 96 h, alcanzándose la fase estacionaria en el sexto día del cultivo, con un volumen de empaquetamiento celular de 1,4 ml, para células clorofiladas y 1,3 ml, para aclorofiladas (Fig. 2c); el peso fresco registró alrededor de 2,3 g (Fig. 2d), en ambos sistemas de cultivo. Comparando ambos tratamientos de medio de cultivo, si bien en el 2,4-D-AG<sub>3</sub> se alcanzó un mayor volumen de empaquetamiento celular, fue en el tratamiento AIA-BAP donde se alcanzó un mayor peso fresco.

En los tratamientos con 2,4-D 0,2-AG<sub>3</sub> 1,0 mg l<sup>-1</sup>, y sacarosa 2,4 y 6%, para células aclorofiladas, solamente con sacarosa 4%, la curva de creci-

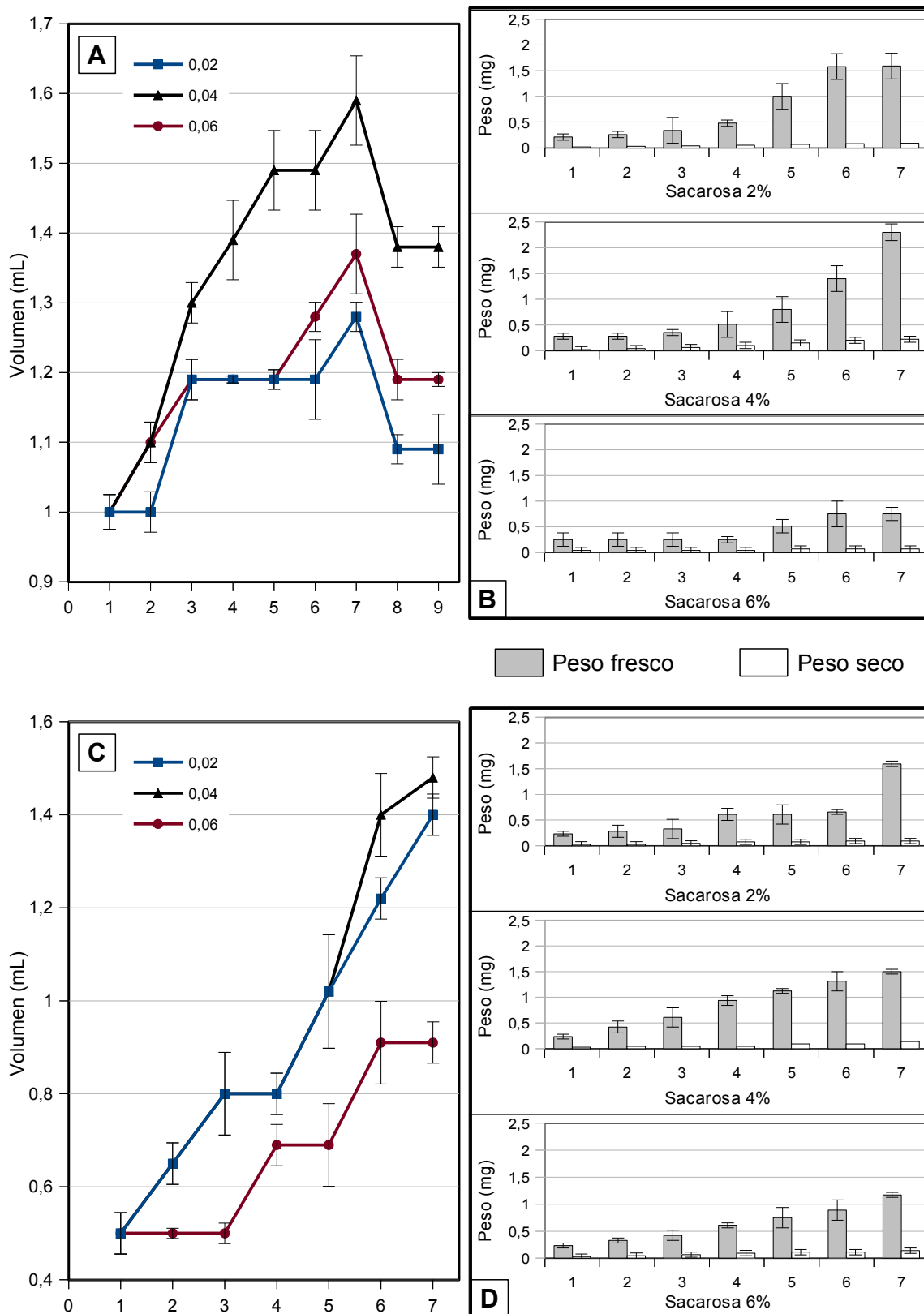


**Figura 2.** Suspensiones celulares de *Ipomoea carnea* spp. *carnea*. **A:** Ciclo de crecimiento de células clorofiladas y aclorofiladas (RM-64, 2,4-D 0,2 mg l<sup>-1</sup>, AG<sub>3</sub> 1,0 mg l<sup>-1</sup> y sacarosa 2%); **B:** Peso fresco y seco; **C:** Ciclo de crecimiento de células clorofiladas y aclorofiladas (RM-64, AIA 0,2 mg l<sup>-1</sup>, BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup> y sacarosa 2%); **D:** Peso fresco y seco.

**Figure 2.** Cell suspensions of *Ipomoea carnea* spp. *carnea*. **A:** Growth cycle of with chlorophyll and without chlorophyll cells (RM-64, 0,2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, 1,0 mg l<sup>-1</sup> AG<sub>3</sub>, 2% sucrose) **B:** Fresh and dry weight; **C:** Growth cycle of with chlorophyll and without chlorophyll cells (RM-64, 0,2 mg l<sup>-1</sup> IAA, 0,1 mg l<sup>-1</sup> BAP and 2% sucrose); **D:** Fresh and dry weight.

miento de las suspensiones celulares siguió una tendencia similar a la curva sigmoidea alcanzando 1,6 ml de volumen de empaquetamiento celular en el séptimo día de cultivo, mientras que con sacarosa 2 y 6% el crecimiento de las suspensiones celulares fue errático, con 48 h de fase estacionaria entre las fases exponencial y linear, para luego decrecer en el octavo día de cultivo; en ambos casos el volumen de empaquetamiento celular fue 1,3 y 1,4 ml (Fig. 3a); el peso fresco registró alrededor de 2,4; 1,4 y 0,8 g, con sacarosa 4,2 y 6%, respectivamente (Fig. 3b). En el tratamiento AIA 0,2-BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup>, con sacarosa 2,4 y 6%, para células clorofiladas, la curva de crecimiento de las suspensiones celulares siguió una tendencia similar a la curva sigmoidea alcanzándose los niveles de 1,5, 1,4 y 0,9 ml, de volumen de empaquetamiento celular, con sacarosa 4, 2 y 6%, respectivamente, en el séptimo día del cultivo (Fig. 3c); el peso fresco registró alrededor de 1,5, 1,4 y 1,0 g, en los tratamientos de sacarosa 2, 4 y 6%, respectivamente (Fig. 3d). Comparando ambos tratamientos de medio





**Figura 3.** Suspensiones celulares de *Ipomoea carnea* spp. *carnea* durante 7 días **A:** Ciclo de crecimiento de células acolorifiladas (RM-64, 2,4-D 0,2 mg l<sup>-1</sup>, AG<sub>3</sub> 1,0 mg l<sup>-1</sup> y sacarosa 2, 4 y 6%); **B:** Peso fresco y seco; **C:** Ciclo de crecimiento de células clorofiladas (RM-64, AIA 0,2 mg l<sup>-1</sup>, BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup> y sacarosa 2, 4 y 6%); **D:** Peso fresco y seco.

**Figure 3.** Cell suspensions of *Ipomoea carnea* spp. *carnea* for seven days. **A:** Growth cycle of without chlorophyll cells (RM-64, 0.2 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, AG<sub>3</sub> 1.0 mg l<sup>-1</sup> and 2, 4 and 6% sucrose); **B:** Fresh and dry weight; **C:** Growth cycle of with chlorophyll cells (RM-64, 0.2 mg l<sup>-1</sup> IAA, 0.1 mg l<sup>-1</sup> BAP and 2, 4 and 6% sucrose); **D:** Fresh and dry weight.

de cultivo, el mayor volumen de empaquetamiento celular se alcanzó en los que incorporaron sacarosa 4%, aunque el contenido de peso fresco fue mayor con 2,4-D-AG<sub>3</sub> de células aclorofiladas respecto a AIA-BAP de células clorofiladas.

En *I. batatas*, suspensiones celulares inducidas en callos de raíces tuberosas, en medio de cultivo con 2,4-D 2,0 mg l<sup>-1</sup>, alcanzaron la fase estacionaria en 18 días en condiciones de oscuridad, mostrando una curva de crecimiento sin diferenciación entre la fase exponencial y la fase linear (Konczak-Islam et al. 2003). En otro trabajo similar, con 2,4-D 2,2 mg l<sup>-1</sup>, la curva de crecimiento de las suspensiones celulares se alcanzó en siete días (Sultana & Rahman 2011), tan igual a lo ocurrido en el trabajo que se presenta sobre *I. carnea* spp. *carnea*. Otros protocolos de suspensiones celulares en *I. batatas* se establecieron con la finalidad de inducir embriogénesis somática (Liu et al. 2001).

### Análisis químicos

El análisis de fenoles en suspensiones celulares con 2,4-D 0,2-AG<sub>3</sub> 1,0 mg l<sup>-1</sup>, en células clorofiladas, mostró un aumento gradual en la concentración a medida que transcurría el tiempo de cultivo alcanzando 85 µg g<sup>-1</sup> de peso seco en siete días de cultivo, pero en células aclorofiladas se observó un decrecimiento en la concentración hasta alcanzar 9,0 µg g<sup>-1</sup> de peso seco, en el mismo tiempo de cultivo (datos no mostrados en tabla). En el tratamiento AIA 0,2-BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup>, en células clorofiladas si bien hubo un aumento gradual en la concentración de fenoles, el pico máximo alcanzado en siete días de cultivo fue 18 µg g<sup>-1</sup> de peso seco, mientras que en células aclorofiladas se observó un decrecimiento en la concentración hasta alcanzar 20,0 µg g<sup>-1</sup> de peso seco, en el mismo tiempo de cultivo (datos no mostrados en tabla). En general, la concentración de fenoles fue influenciada por la composición del medio de cultivo, resultando superior con 2,4-D-AG<sub>3</sub> respecto a AIA-BAP e incrementándose en las suspensiones con células clorofiladas y decreciendo en las suspensiones con células aclorofiladas.

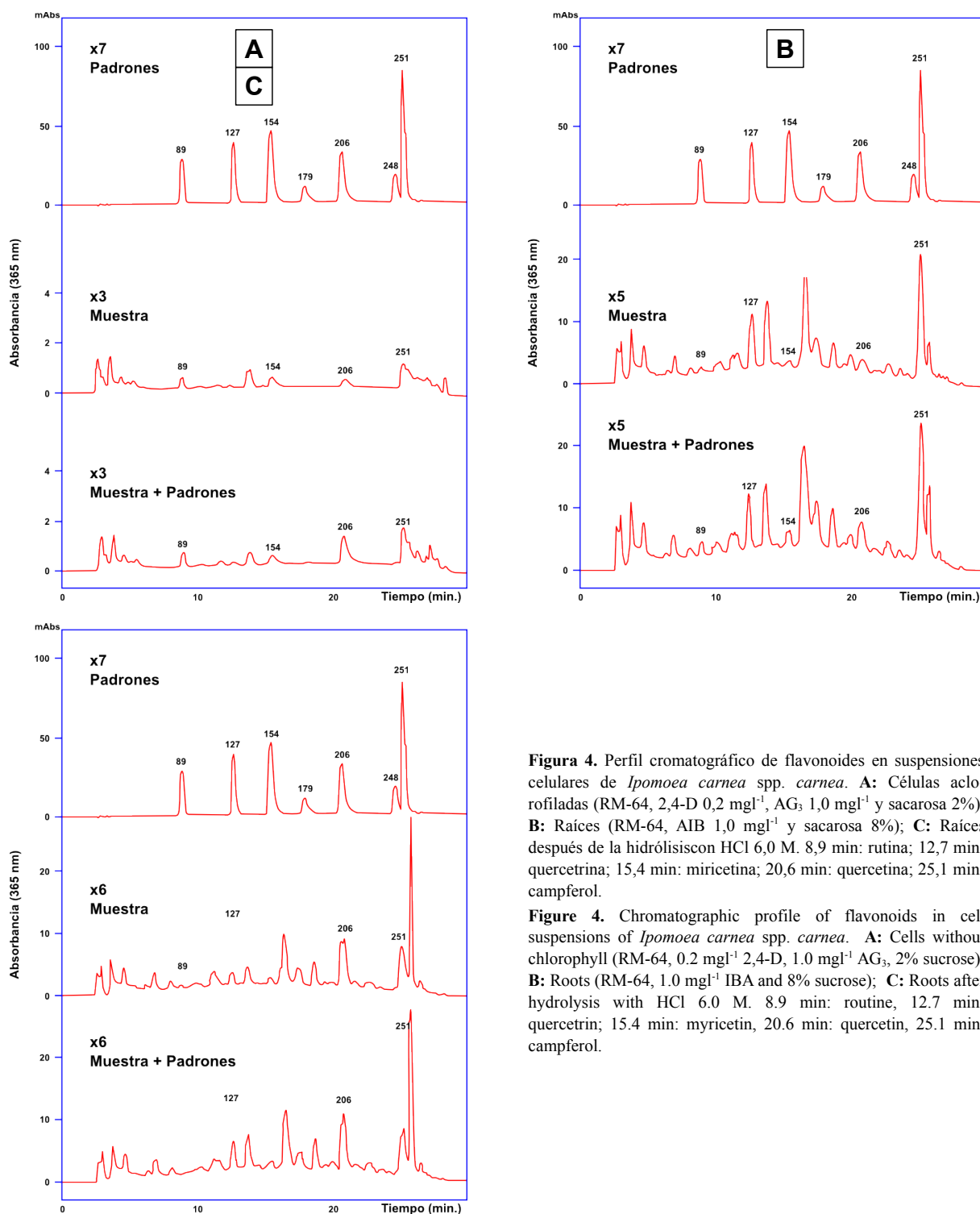
En *I. batatas*, suspensiones celulares inducidas en callos de raíces tuberosas, con 2,4-D 2,0 mg l<sup>-1</sup>, produjeron alto contenido de antocianinas y compuestos fenólicos, específicamente, los ácidos clorogénico y cafeico, en 24 días de cultivo en oscuridad (Konczak-Islam et al. 2003). Estos resulta-

dos se correlacionan en parte con lo observado en el trabajo que se presenta, específicamente en suspensiones celulares clorofiladas con 2,4-D 0,2 mg l<sup>-1</sup> y AG<sub>3</sub> 1,0 mg l<sup>-1</sup>, con la diferencia que en este caso el ciclo máximo de crecimiento de las suspensiones celulares se alcanzó en siete días de cultivo, necesiándose subcultivarlas para prevenir la muerte de las células.

Los compuestos fenólicos constituyen una gran familia de metabolitos secundarios destacando los ácidos gálico, clorogénico, entre otros, aislados aún en microalgas muy primitivas como *Spirulina maxima* Turpin ex Gomont (Cyanobacteria) (Abd El-Baky et al. 2009), probablemente responsables por el pardeamiento de las suspensiones celulares, observado en el trabajo que se presenta, lo que resultaría de la degradación oxidativa de tales compuestos, proceso que es catalizado por la polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidasa (POD) (Lei et al. 2004); asimismo, la condición de estrés en los primeros días del establecimiento de la suspensión celular sería la causa del alto contenido de fenoles presentado lo que disminuyó durante el proceso.

Los análisis cromatográficos realizados mediante CLAE mostraron que los flavonoides rutina, miricetina, quercetina y campferol ocurrieron solamente en extracto de células aclorofiladas, en medio de cultivo con ANA 0,2-BAP 0,1 mg l<sup>-1</sup> (Fig. 4a); en los medios de cultivo de células clorofiladas no se detectó flavonoides. En extracto de raíces, en medio de cultivo líquido, con AIB 1,0 mg l<sup>-1</sup> y sacarosa 8%, solamente se observó rutina, quercetrina, miricetina, quercetina y campferol (Fig. 4b), mientras que en extractos de raíces, después de la hidrólisis con HCl 6,0 M, se observó un ligero incremento de quercetrina, quercetina y campferol (Fig. 4c).

La literatura no reporta trabajos en cultivo de tejidos de *Ipomoea*, con la finalidad de inducir biosíntesis de flavonoides; sin embargo, son numerosos los estudios realizados en diversas especies vegetales. En *Saussurea medusa* Maxim. (Asteraceae) se determinó el efecto de varios reguladores de crecimiento en la cinética de la suspensión celular y la producción de flavonoides (Liu & Saxena 2009). En otras especies como en *Centella asiatica* (L.) Urb. (Apiaceae) se estudió el efecto de las interacciones de varias auxinas y citoquininas en la producción de quercetina, campferol, luteolina y rutina, estableciéndose líneas celu-



**Figura 4.** Perfil cromatográfico de flavonoides en suspensiones celulares de *Ipomoea carnea* spp. *carnea*. **A:** Células aclofiladas (RM-64, 2,4-D 0,2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, AG<sub>3</sub> 1,0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> y sacarosa 2%); **B:** Raíces (RM-64, AIB 1,0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> y sacarosa 8%); **C:** Raíces después de la hidrólisis con HCl 6,0 M. 8,9 min: rutina; 12,7 min: quercetrina; 15,4 min: miricetina; 20,6 min: quercetina; 25,1 min: campferol.

**Figure 4.** Chromatographic profile of flavonoids in cell suspensions of *Ipomoea carnea* spp. *carnea*. **A:** Cells without chlorophyll (RM-64, 0.2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> 2,4-D, 1.0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> AG<sub>3</sub>, 2% sucrose); **B:** Roots (RM-64, 1.0 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> IBA and 8% sucrose); **C:** Roots after hydrolysis with HCl 6.0 M. 8.9 min: routine, 12.7 min: quercetrin; 15.4 min: myricetin, 20.6 min: quercetin, 25.1 min: campferol.

lares de altos rendimientos, en especial de luteolina (Tan et al. 2010). Por otro lado, se determinó la producción de quercetina, isoquercetrina, quercetrina, rutina e hiperósido, así como escopoletina y los ácidos fenolcarbónicos, p-cumárico y clorogénico, en suspensiones celulares de *Astragalus missouriensis* Nutt. (Fabaceae) (Ionkova 2009).

Otro metabolito secundario aislado fue la cu-

marina escopoletina en raíces y hojas de plantas de campo en las concentraciones de 100 y 67 mg g<sup>-1</sup> de extracto, respectivamente, y en raíces y callos de hojas en cultivos *in vitro* en las concentraciones de 16 y 9 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. La purificación de este compuesto fue monitoreada por la fuerte fluorescencia presentada, similar a la ergometrina. El espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Fig. 5) pre-

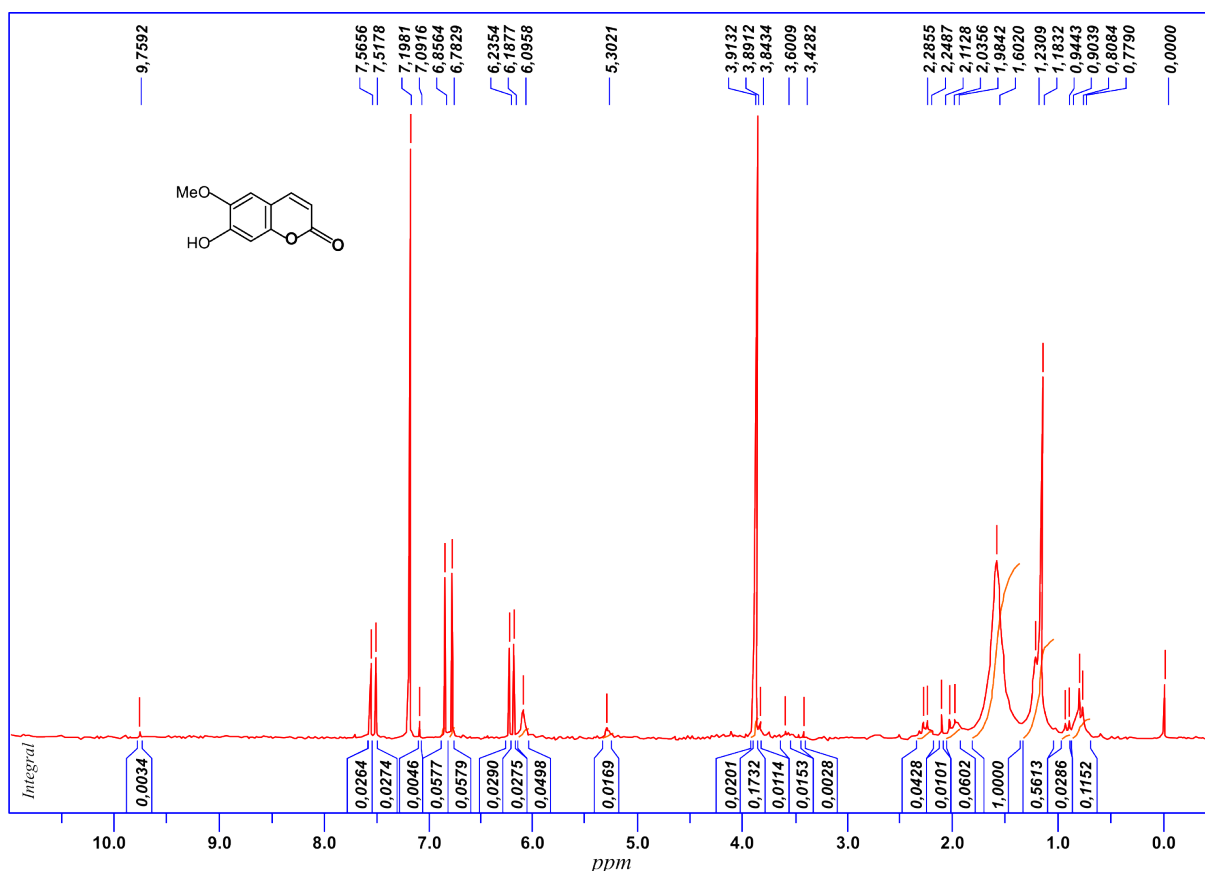
sentó dos dobletes en 7,54 y 6,21  $\delta$  (9, 6 Hz) correspondiendo a los protones H7 y H8; dos singletes en 6,86 (1H) y 6,78  $\delta$  (1H) que se atribuyen a los hidrógenos H2 y H5, respectivamente. Se observó, también, la absorción de un singlete largo en 6,10  $\delta$  (1H) y otro en 3,89  $\delta$  (3H), atribuidos al hidrógeno fenólico y metoxílico.

La escopoletina posee interesantes efectos biológicos, comportándose como espasmolítico, antiinflamatorio, y antioxidante, inductor de apoptosis, inhibidor de la acetilcolinesterasa y actividad hipouricémica. En las especies de *Ipomoea* no se conocen reportes sobre la biosíntesis de escopoletina en cultivo de tejidos, pero la literatura la reporta en suspensiones celulares de numerosas especies vegetales, por ejemplo, en *Archangelica officinalis* Hoffm. (Apiaceae) su producción fue influenciada por diversas concentraciones de 2,4-D, ANA y AIA, incrementándose hasta en dos veces con la eliciación de varias especies de hongos, en especial *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen (Siatka & Kasparová

2008) y en *N. tabacum* suspensiones celulares de células inmovilizadas, con cubiertas de alginato de calcio y aceite de coco, se incrementó hasta en 16 veces la producción de escopoletina respecto al control (Lizuka et al. 2005).

La ocurrencia de flavonoides y escopoletina en *I. carnea* spp. *carnea* estaría relacionada con el mecanismo de defensa de la planta, que como se ha indicado, habita ambientes ecológicos muy secos y es, además, atacada por insectos que utilizan hojas y frutos para depositar sus huevos; la escopoletina estaría relacionada con la inhibición de la AIA-oxidasa y consecuentemente modificando el desarrollo morfogénico (Kefeli 1987).

El presente estudio reveló que es posible la inducción de callos, el cultivo de raíces y el establecimiento de suspensiones celulares de *I. carnea* spp. *carnea*, una importante especie nativa del BES de Perú y Ecuador, con la finalidad de inducir la biosíntesis de metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides y coumarinas. Este estudio constituye, asimismo, el primer reporte realizado



**Figura 5.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CHCl<sub>3</sub>) de escopoletina, en cultivo de raíces de *Ipomoea carnea* spp. *carnea* en medio de cultivo suplementado con AIB 1,0 mg l<sup>-1</sup> y sacarosa 8%.

**Figure 5.** <sup>1</sup>H NMR spectrum (200 MHz, CHCl<sub>3</sub>) of scopoletin in roots culture of *Ipomoea carnea* spp. *carnea* in culture medium supplemented with 1.0 mg l<sup>-1</sup> IBA and 8% sucrose.

en la especie, tanto en cultivo de tejidos como en la producción de metabolitos secundarios *in vitro*.

## Agradecimientos

C. Rojas-Idrogo agradece a la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por la beca de Maestría en el Instituto de Biociências de la Universidade de São Paulo, Brasil. Asimismo, se agradece a Luciana Alarcón Bravo y Gabriela Torres Reaño por la preparación de las figuras.

## Referencias

- Abd El-Baky HH, El Baz F& El-Baroty GS. 2009. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects *in vitro* toward hepatotoxicity model. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3: 133-139.
- Abdel Khalik K, Osman G& Al-Amoudi W. 2012. Genetic diversity and taxonomic relationships of some *Ipomoea* species based on analysis of RAPD-PCR and SDS-PAGE of seed proteins. *Australian Journal of Crop Science* 6: 1088-1093.
- Austin DF. 1977. *Ipomoea carnea* Jacq. vs. *Ipomoea fistulosa* Mart. Ex-Choisy. *Taxon* 26(2/3): 235-238.
- Austin DF. 1988. The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potatoes and related wild species. In: *Exploration, Maintenance, and Utilization of Sweet Potato Genetic Resources*. International Potato Center. Lima. Pp. 27-59.
- Austin DF & Huamán Z. 1996. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. *Taxon* 45: 3-38.
- Austin DF. 2007a. Water Spinach (*Ipomoea aquatica*, Convolvulaceae) a food gone wild. *Ethnobotany Research & Applications* 5: 123-146.
- Austin DF. 2007b. *Merremia dissecta* (Convolvulaceae): Condiment, medicine, ornamental, and weed—A review. *Economic Botany* 61: 109-120.
- Boonsnonongcheep P, Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P & Prathanturug S. 2010. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 101: 119-126.
- Brako L & Zarucchi JL. 1993. *Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA.
- Danphitsanuparn P, Boonsnonongcheep P, Boriboonsakset T, Chintapakorn Y & Prathanturug S. 2012. Effects of *Agrobacterium rhizogenes* strains and other parameters on production of isoflavonoids in hairy roots of *Pueraria candollei* Grah. Ex benth. var. *candollei*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 315-322.
- El Far MMM, El Mangoury K & Elazab MHE. 2009. Novel plant regeneration for Egyptian sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam. ) Abees cultivar via indirect organogenesis stimulated by initiation medium and cytokinin effects. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3: 543-551.
- Górniak S, Gotardo A&Pfister J. 2010. The effects of *Ipomoea carnea* on neonate behavior: A study in goats. *Toxicology Letters* 196: S186.
- Haraguchi M, Górniak SL, Ikeda K, Minami Y, Kato A, Watson AA, Nash RJ, Molyneux RJ & Asano N. 2003. Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4995-5000.
- Hasançebî S, Turgut Kara N, Çakir Ö & Ari Ş. 2011. Micropropagation and root culture of Turkish endemic *Astragalus chrysochlorus* (Leguminosae). *Turkish Journal of Botany* 35: 203-210.
- Hironori M, Ogasawara F, Sato K, Higo H & Minobe Y. 2007. Isolation of a regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in tuberous roots of purple-fleshed sweet potato. *Plant Physiology* 143: 1252-1268.
- Hueza IM & Górniak SL. 2011. The immunomodulatory effects of *Ipomoea carnea* in rats vary depending on life stage. *Human & Experimental Toxicology* 30: 1690-1700.
- Ionkova I. 2009. Optimization of flavonoid production in cell cultures of *Astragalus missouriensis* Nutt. (Fabaceae). *Pharmacognosy Magazine* 5: 92-97.
- Kefeli VI. 1987. Some phenolics as plants growth and morphogenesis regulators. En: *Hormonal Regulation of Plant Growth and Development* (Purohit SS, ed.). Vol. 2. Martinus Nijhoff Publishers. pp. 89-101.
- Khalafalla MM, Daffalla HM, El-Shemy HA & Abdellate E. 2009. Establishment of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina*- a potent African medicinal plant. *African Journal of Biotechnology* 8: 5952-5957.
- King P. 1984. Induction and maintenance of cell suspension cultures. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* (Vasil IK, ed. ). Vol. 1. Academic Press. Pp. 130-138.
- Konczak-Islam I, Okuno S, Yoshimoto M & Yamakawa O. 2003. Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochemical Engineering Journal* 14: 155-161.
- Konczak-Islam I, Yoshinaga M, Nakatani M, Terehara N & Yamakawa O. 2000. Establishment and characteristics of an anthocyanin-producing cell line from sweet potato storage root. *Plant Cell Reports* 19: 472-477.
- Linsmaier EM & Skoog F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 18: 100-127.
- Lei DF, Feng Y & Jiang DZ. 2004. Characterization of polyphenol oxidase from plants. *Progress in Natural Science* 14: 553-561.
- Liu CZ & Saxena PK. 2009. *Saussurea medusa* cell suspension cultures for flavonoid production. *Methods in Molecular Biology* 547: 53-59.
- Liu QC, Zhai H, Wang Y & Zhang DP. 2001. Efficient plant regeneration from embryogenic suspension cultures of sweet potato. *In Vitro Cellular & Development Biology – Plant* 37: 564-568.
- Lizuka Y, Kato R, Shibasaki-Kitakawa N & Yonemoto T.

2005. Combination of extractive solvent addition and immobilization culture for continuous production of scopoletin by tobacco cells. *Biotechnology Progress* 21: 603-607.
- Mabberley DJ. 1989. *The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Higher Plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- McDonald JA & Mabry TJ. 1992. Phylogenetic systematics of New World *Ipomoea* (Convolvulaceae). *Plant Systematics and Evolution* 180: 243-259.
- Meira M, Pereira da Silva E, David JM & David JP. 2012. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22: 682-713.
- Mungole A, Awati R, Dey S, Chaturvedi A & Zanwar P. 2009. In-vitro callus induction and shoot regeneration in *Ipomoea obscura* (L.): potent Indian medicinal plant. *Indian Journal of Science and Technology* 2: 24-26.
- Prasad KN, Prasad MS, Shivamurthy GR & Aradhya SM. 2006. Callus induction from *Ipomoea aquatica* Forsk. leaf and its antioxidant activity. *Indian Journal of Biotechnology* 5: 107-111.
- Sefasi A, Kreuze J, Ghislain M, Manrique S, Kiggundu A, Semakula G & Mukasa SB. 2012. Induction of somatic embryogenesis in recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 11: 16055-16064.
- Siatka T & Kasparová M. 2008. Effects of auxins on growth and scopoletin accumulation in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. *Czech Slovak Pharmacy* 57: 17-20.
- Sinha T & Bandyopadhyay A. 2011. Induction of callus in *Ipomoea obscura* (L.) Ker Gawl., a little known medicinal plant. *African Journal of Biotechnology* 10: 19161-19166.
- Smith RA, Drummond S, Haines A, Porter JR & Hock RS. 2001. Induction of umbelliferone in sweet potato cell suspension culture using mercuric chloride. *Biotechnology Letters* 23: 1397-1400.
- Sultana RS & Rahman MDM. 2011. Cell proliferation and cell aggregate development in suspension culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *International Journal of Biosciences* 1: 6-13.
- Syklowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Gawron A, Kawiak A, Lojkowska E, Jeziorek M & Chinou I. 2012. Enhanced production of antitumour naphthoquinones in transgenic hairy roots lines of *Lithospermum canescens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 213-219.
- Tan SH, Musa R, Ariff A & Maziah M. 2010. Effect of plant growth regulators on callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. Urban). *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6: 284-299.
- Tayung K, Sarkar M & Baruah P. 2012. Endophytic fungi occurring in *Ipomoea carnea* tissues and their antimicrobial potentials. *Brazilian Archives of Biology and Biotechnology* 55: 653-660.
- Terahara N, Konczak-Islam I, Nakatani M, Yamakawa O, Goda Y & Honda T. 2000. Anthocyanins in callus induced from purple storage root of *Ipomoea batatas* L. *Phytochemistry* 54: 919-922.
- Westcott RJ & Henshaw GG. 1976. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta* 131: 67-73.
- Woradulayapinij W, Soonthornchareonnon, N & Wiwat C. 2005. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. *Journal of Ethnopharmacology* 101: 84-89.
- Zar JH. 2009. *Biostatistical Analysis*. 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 960 p.
- Zhao B, Agblevor FA, Ritesh KC & Jelesko JG. 2013. Enhanced production of the alkaloid nicotine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 113: 121-129.