



Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp.

[Cellular suspension and production of secondary metabolites in *in vitro* cultures of *Piper* sp.]

Guillermo E. DELGADO-PAREDES¹, Massuo J. KATO² & Consuelo ROJAS-IDROGO¹

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

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

Contactos / Contacts: Guillermo E. DELGADO-PAREDES - E-mail address: guidelg2001@yahoo.es

Abstract

Piperaceae is an important family from neotropical American in which many biologically active compounds were identified. A survey of structural diversity and bioactivity reveals that groups of species specialize in the production of amides, phenylpropanoids, lignans and neolignans, benzoic acids and chromenes, alkaloids, polyketides, and a plethora of compounds of mixed biosynthetic origin. With this in mind, several explants obtained from *in vitro* plantlets were cultured in the presence of different plant growth regulator combinations (IAA, NAA, 2,4-D, DICAMBA, BAP and KIN). The callus induction was depended of *Piper* species, explant type and plant growth regulator combinations. From a callus culture, cell suspension cultures were established and their growth and metabolite accumulation studied. The achieve results may be useful for further characterization of the activated secondary metabolites pathways in *in vitro* systems of various *Piper* species.

Keywords: Callus induction, cell suspension culture, plant growth regulators

Resumen

Piperaceae es una familia importante de la América neotropical en la que muchos compuestos biológicamente activos han sido identificados. Un estudio general sobre la diversidad estructural y bioactividad reveló que grupos de especies se especializan en la producción de amidas, fenilpropanoides, lignanos y neolignanos, ácidos benzoicos y cromenes, alcaloides, policétidos y una diversidad de compuestos de origen biosintético mixto. Con este conocimiento, diversos explantes obtenidos de plántulas *in vitro* se cultivaron en presencia de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (AIA, ANA, 2,4-D, DICAMBA, BAP y KIN). La inducción de callos dependió de la especie de *Piper*, tipo de explante y las combinaciones de los reguladores de crecimiento. Suspensiones celulares se establecieron a partir de callos y estudiadas en su crecimiento y acumulación de metabolitos. Los resultados alcanzados pueden utilizarse para caracterizar rutas de producción de metabolitos secundarios, en sistemas *in vitro*, en varias especies de *Piper*.

Palabras Clave: Inducción de callos, reguladores de crecimiento, suspensiones celulares.

Recibido | Received: 15 de Mayo de 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 15 de Noviembre de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2013.

Declaración de intereses | Declaration of interests: GE Delgado agradece a la Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por la bolsa de Pós-doutorado en el Instituto de Química de la Universidad de São Paulo, Brasil.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: GE Delgado-Paredes, MJ Kato, C Rojas-Idrogo. 2013. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de *Piper* sp. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 12(3): 269 – 282.

INTRODUCCIÓN

La familia Piperaceae, junto a otros miembros del orden Piperales tales como las Aristolochiaceae, Saururaceae y Lactoridaceae, ha sido clasificada entre las más primitivas y diversas, por lo tanto, entre las angiospermas basales y para muchos autores su taxonomía es una de las más complejas entre las plantas con flores (Jaramillo y Manos, 2001; Jaramillo et al., 2004). Entre los 10 géneros y alrededor de 2000 especies reportadas para el mundo (Brummitt, 1992), para el Perú se reportan únicamente los géneros *Peperomia*, *Piper* y *Sarcorrhachis* y 811 especies, de las cuales 528 son consideradas endémicas (Brako y Zarucchi, 1993) y para el Brasil los géneros *Ottonia*, *Peperomia*, *Piper*, *Pothomorphe* y *Sarcorrhachis* y 479 especies, sin precisarse el número de endémicas (Yuncker, 1972).

A lo largo del mundo numerosas especies de *Piper* han sido tradicionalmente utilizadas para combatir diversas plagas. Por ejemplo, la especie amazónica *Piper rotundistipulum* se utiliza como insecticida y veneno de peces; *P. guineense* y *P. nigrum* son usadas como insecticidas y moluscicidas en diversas regiones de África; las especies de la India, *P. longum*, *P. betle*, *P. peepuloides* y *P. cubeba* han demostrado actividad insecticida contra mosquitos y piojos (Bernard et al., 1995). En los últimos años, investigaciones realizadas por varios grupos de trabajo han demostrado el enorme potencial biocida de *P. tuberculatum* sobre los mosquitos vectores *Aedes atropalpus* (Scott et al., 2002) y *A. aegypti* y *Anopheles pseudopunctipennis* (Bazán-Calderón et al., 2011); los insectos-plaga *Diatraea saccharalis* (Soberón et al., 2006) y *Anticarsia gemmatalis* (Navickiene et al., 2007) y los hongos dermatofitos *Microsporium* y *Tricophyton* (Palacios et al., 2009).

La química de las especies del género *Piper* está basada en la presencia de diversos metabolitos secundarios (Parmar et al., 1997; Kato y Furlan, 2007); sin embargo, el compuesto más significativo, entre otros, es la piperamida piperina, el principio activo picante de la pimienta negra (*P. nigrum*) (Parmar et al., 1997). Conjuntamente con las amidas, otras clases de compuestos se han aislado de diversas especies de *Piper*, destacando entre estos los cromonas (Lago et al., 2004), fenilpropanoides, lignanos y neolignanos (Martins et al., 2000), alcaloides (Parmar et al., 1998) y diversos compuestos de origen biosintético mixto (Parmar et al., 1997).

La aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos como la propagación clonal, la inducción de callos y el establecimiento de suspensiones celulares, en especial en plantas medicinales, tiene la ventaja de producir compuestos bajo condiciones controladas puesto que las células pueden multiplicarse fácilmente y producir metabolitos secundarios específicos (Vanisree et al., 2004). En algunas especies de *Piper* los cultivos *in vitro* se han establecido con algunas dificultades, debido a problemas de oxidación y contaminación (Mathews y Rao, 1984; Fitchet, 1990), e investigado su potencial morfogénico. Así tenemos la inducción de diversas respuestas morfogénicas en *P. betle*, *P. longum* y *P. nigrum* (Philip et al., 1992; Bhat et al., 1992; Bhat et al., 1995), *P. betle* (Aminuddin-Johri et al., 1993), *P. longum* (Soniya y Das, 2002), *P. colubrinum* (Kelkar y Krishnamurty, 1998), *P. methysticum* (Smith et al., 2002) y *P. solmsianum* (Balbuena et al., 2009; Vásquez et al., 2010). Asimismo, se reportó la inducción de embriogénesis somática en alta frecuencia en *P. nigrum* y *P. colubrinum* (Yusuf et al., 2001; Nair y Gupta, 2006). Recientemente, Delgado et al. (2002), en *P. aduncum*, y Danelutte et al. (2005), en *P. cernuum* y *P. crassinervium*, realizaron estudios orientados al establecimiento de suspensiones celulares asociados con la producción de metabolitos secundarios.

El presente trabajo, resultado de investigaciones iniciadas en Piperaceas en 1998 y que continúan en la actualidad, tuvo como objetivos la inducción de callos y el establecimiento de suspensiones celulares, a utilizar en posteriores investigaciones sobre biosíntesis de metabolitos secundarios, que sustenten su producción a gran escala en sistemas *in vitro* para las especies de *Piper*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal estuvo conformado por espigas, con frutos y semillas maduros, de varias especies de *Piper*, colectadas en diferentes localidades de Perú y Brasil y únicamente en el caso de *P. cernuum* y *P. regnellii* de hojas jóvenes de 5 cm de largo de plantas adultas sembradas en invernadero. Las especies fueron identificadas por el Dr. Guillermo E. Delgado Paredes, en base a las descripciones realizadas por Trelease (1936), Yuncker (1972, 1973) y Tebbs (1993), conservándose las muestras en los Herbarios PRG, de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque (Perú) e IQ/USP, Instituto de Química de

la Universidade de São Paulo (Brasil). Los cultivos *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de IQ/USP y el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Recursos Genéticos de la UNPRG.

Germinación de semillas, propagación clonal y organogénesis

En el laboratorio, una semana después de colectadas, las semillas se separaron de los frutos, y desinfectaron en grupos de 50 unidades. El medio de cultivo se conformó con las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y B5 (Gamborg *et al.*, 1968), las vitaminas m-inositol 100 mg/L y tiamina.HCl 1 mg/L, sacarosa 2% y agar 0,8%. El medio de cultivo de germinación de semillas no fue suplementado con reguladores de crecimiento, el de propagación clonal con ácido indol-3-acético (AIA) y ácido giberélico (AG₃) 0,02 mg/L, respectivamente y el de organogénesis con benzilaminopurina (BAP) 0,5 – 2 mg/L. El proceso de desinfección de semillas, el ajuste del pH del medio de cultivo, las condiciones de esterilización y las condiciones ambientales de incubación se detallan en trabajos previos (Soberón *et al.*, 2006; Palacios *et al.*, 2009; Bazán-Calderón *et al.*, 2011). En la inducción de respuestas organogénicas de *P. cernuum* y *P. regnellii* se utilizaron segmentos de hojas (limbos) de 10 mm por lado, provenientes de plantas adultas en crecimiento activo en condiciones de invernadero realizándose la desinfección siguiendo el protocolo utilizado para el caso de semillas.

Inducción de callos

En la inducción de callos se utilizaron diversos explantes como peciolas, entrenudos y ocasionalmente raíces, de 10 mm de largo y segmentos de hojas de 10 mm por lado, provenientes de plantas *in vitro* de 45 - 60 días de edad. Los explantes se cultivaron horizontalmente y en el caso de las hojas con la superficie abaxial en contacto con el medio de cultivo, el cual estuvo conformado por las sales minerales MS, vitaminas, sacarosa 3% y diversas interacciones entre auxinas y citocininas. Entre las auxinas se utilizó AIA, ANA, DICAMBA y 2,4-D y entre las citocininas BAP. En algunos tratamientos a las interacciones auxinas - citocininas se suplementó AG₃ 0,5 mg/L. Se utilizó 15 explantes por tratamiento y cada tratamiento se repitió dos veces. Los cultivos se incubaron en oscuridad total.

Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares, iniciadas a partir de callos friables, se establecieron con varios tratamientos de auxinas y auxinas-citocininas, suplementados con caseína hidrolizada (CH) 250 mg/L, utilizando frascos erlenmeyer de 125 mL conteniendo un volumen de 25 mL de medio de cultivo, en agitación rotatoria permanente a 100 rpm. Una vez iniciado el proceso de división celular, las suspensiones celulares se transfirieron a erlenmeyers de 250 mL para la elaboración de la curva de crecimiento celular. Después de 24 a 27 días de cultivo, se transfirieron a medio de cultivo fresco para su mantenimiento utilizando el sistema de “cultivos cerrados” (Szabados *et al.*, 1991). Se utilizaron cinco erlenmeyers por tratamiento. Los cultivos se incubaron entre 8 - 10 W.m⁻² de irradiación durante las 24 h del día.

Determinación de la curva de crecimiento de suspensiones celulares de *P. cernuum*

En la determinación de la curva de crecimiento [masa celular (g/50 mL) x tiempo (días)] se escogieron 9 puntos de la curva y el experimento se realizó por triplicado. Se utilizaron 27 erlenmeyers de 250 mL conteniendo cada uno 50 mL de medio de cultivo conformado por las sales minerales MS suplementadas con 2,4-D 0,2 mg/L, AG₃ 0,5 mg/L y CH 250 mg/L, ajustándose el pH a 5,4. En condiciones asépticas células frescas de *P. cernuum* se obtuvieron de suspensiones celulares de 14 días de cultivo y después de filtradas al vacío, para separar el material celular del medio de cultivo, se inocularon en 27 erlenmeyers de 250 mL, a razón de 30 mg, en agitación rotatoria permanente a 100 rpm. Cada tres días, 3 erlenmeyers fueron retirados del experimento para la determinación del peso seco, después de la filtración de las suspensiones celulares y del secado en estufa a 50 °C, así como la medición del pH del medio de cultivo (utilizando un pH-metro desinfectado con alcohol etílico 70%) y la determinación de la actividad PAL (fenilalanina amonio liasa).

Determinación de la actividad específica de PAL de suspensiones celulares de *P. cernuum*

Se utilizó 0,5 g de células frescas para la extracción de la enzima PAL con tampón borato 0,1 M (pH 8,8) (Heide *et al.*, 1989). La solución sobrenadante se utilizó para el ensayo enzimático de PAL.

En el ensayo enzimático de PAL, para cada muestra se prepararon ensayos en duplicado y un ensayo blanco como control negativo. Se utilizaron

1000 μL de tampón borato 0,1 M (pH 8,8), 300 μL de fenilalanina 10 mM y 200 μL de la preparación enzimática de células de *P. cernuum*. Después de la incubación a 29 °C durante 30 min la reacción enzimática fue interrumpida con la adición de 100 μL de HCl 12 N. En el análisis del ácido cinámico, formado a través de la conversión de la fenilalanina por la enzima PAL, se adicionó 50 μL de metilumbeliferona 1 mM (patrón interno), se centrifugó a 9000 g durante 10 min y el sobrenadante fue analizado por cromatografía líquida de alta

eficiencia (CLAE) utilizando el siguiente sistema: columna C18 Econosil 5 μ (Altech) 250 x 4 mm, mezcla de disolventes conteniendo agua:metanol:ácido acético (40:60:1), con detección a 275 nm, flujo de 1 mL/min y volumen de inyección de muestra de 20 μL . La actividad enzimática se expresó en Katal/mL del homogenizado (1 Katal es definido como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 mol de sustrato en 1 mol de producto). La actividad se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{nKatalPAL}}{\text{mL}} = \frac{[(\text{ac} / \text{pi}) - (\text{ac} / \text{pi}) \times \text{blanco}] \times \text{nmolpi}}{\text{R} \times \text{min. inc.} \times 60 \times \text{mL de extracto inc.}}$$

donde:

ac, área del ácido cinámico

pi, área del patrón interno

inc, incubado

R, factor de corrección para el ensayo = 3,9155.

Extracción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *P. aduncum* y *P. umbellatum*

Una vez alcanzada la fase estacionaria, después de 24 a 27 días de cultivo, fueron separadas la fracción celular de la fracción medio de cultivo mediante filtración al vacío utilizando un embudo Buchner; luego fueron congeladas por 24 h a -80 °C antes de molerlas en mortero de porcelana, bajo nitrógeno líquido. La extracción fue con solución de diclorometano:metanol (2:1) durante una hora por tres veces consecutivas, para luego concentrar el extracto en rotaevaporador. La separación de los metabolitos

secundarios en la fracción medio de cultivo se realizó en una ampolla de separación, con acetato de etilo, cada 24 h por tres veces consecutivas y el disolvente fue removido al vacío utilizando el rotaevaporador. Los extractos crudos fueron pasados a través de una columna de fase reversa Sep-Pak C18 antes del análisis CLAE.

Análisis CLAE

En el análisis CLAE de las muestras almacenadas (alícuotas de 20 μl) fue utilizado el cromatógrafo Shimadzu LC-10AD; columna C-18 (5 μm) 250 x 4 mm Econosil-Altech, en las siguientes condiciones:

MeOH:H₂O (1:1) → MeOH:H₂O (1:1) (10 min) → MeOH:H₂O (1:0) (30 min) → MeOH:H₂O (1:0) (10 min) flujo 1 ml/min; concentración 1 mg/ml; inyección 5 μl y λ de detección 254 + 280 nm.

Extracción y determinación de fenoles totales en suspensiones celulares

En la extracción de fenoles totales, tanto de suspensiones celulares en desarrollo, cada 6 días, como de suspensiones celulares oxidadas de 7, 15, 25 y 33 días, después de realizado el último subcultivo, las muestras fueron previamente secadas en estufa a 50 °C durante 12 h en cantidades de 0,1 – 1 g, trituradas

con arena lavada y sometidas en baño de María a 60 °C por tres veces consecutivas con alcohol etílico 70% (v/v) durante 15 min. Los fenoles totales fueron estimados utilizando el reactivo Folin-Denis y ácido gálico, como reactivo patrón (Westcott y Henshaw, 1976). La determinación fue realizada en un espectrofotómetro Shimadzu con tres lecturas a 725 nm de absorbancia en 1 mL de muestra y los valores fueron expresados en mg/mL.

Cuadro 1
Inducción de callos en hojas, peciolo y entrenudos en varias especies de *Piper* en medio de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, después de 45 días de cultivo.

Especie	Reguladores de crecimiento (mg/L)				Explantos			
	2,4-D	ANA	DICAMBA	BAP	Hoja	Peciolo	Entrenudo	
<i>P. aduncum</i>	0,2				+	+		
			0,5		0,2			+++
			1,0		0,2	+	++	+++
				0,05		+	+++/R	
				0,5		+	-	
<i>P. cernuum</i>	0,2				++	+++		
			0,5		0,2			+++
			1,0		0,2	+	+	+++
				0,05		++	++/R	
				0,5		+++	+++	
<i>P. crassinervium</i>	0,2				R	+/R		
			0,5		0,2			++
			1,0		0,2	++/R	++	++
				0,05		++/R	-	
				0,5		++	-	
<i>P. regnellii</i>	0,2				-	-		
			0,5		0,2			-
			1,0		0,2	-	-	-
				0,05		-	+	
				0,5		+	+	

MS, vitaminas (m-inositol 100 mg/L y tiamina H.Cl 1 mg/L), sacarosa 3% y agar 0,8%
 -, 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.

RESULTADOS

La germinación de semillas *in vitro*, después de 4 semanas de cultivo, utilizando semillas de una semana de colectadas, registró tasas muy variables, desde tan altas como 98,9 y 98,1% en *P. umbellatum* y *P. solmsianum*, respectivamente, a tan bajas como 20 y 26% en *P. aduncum* y *P. cernuum*, respectivamente.

La elongación y desarrollo de brotes en medio de cultivo MS, suplementado con la interacción AIA – AG₃ 0,02 mg/L y sacarosa 3%, fue variable dependiendo de la especie; así tenemos que después de 2 meses de cultivo, *P. aduncum* y *P. crassinervium* mostraron la mayor elongación del brote con 5,1 y 4,1 cm de altura, respectivamente, en tanto que en *P. cernuum* solamente se alcanzó 0,8 de altura.

En el proceso de inducción de callos, se observó una amplia variedad de respuestas

dependiendo de la especie de *Piper*, el tipo de explante y la clase e interacción de hormonas utilizadas (Cuadro 1). Así tenemos que en *P. aduncum* una mayor formación de callos (+++) se observó en entrenudos en la interacción ANA 0,5 y 1 mg/L con BAP 0,2 mg/L así como en peciolo con DICAMBA 0,05 mg/L y una respuesta similar se observó en *P. cernuum* excepto que con DICAMBA 0,05 y 0,5 mg/L, los callos se formaron tanto en peciolo como en hojas; en *P. crassinervium* los callos (++) se formaron en entrenudos, peciolo y hojas en la interacción ANA 1 mg/L con BAP 0,2 mg/L así como en hojas con DICAMBA 0,05 y 0,5 mg/L y en *P. regnellii* apenas se observó una ligera formación de callos (+) en hojas y peciolo con DICAMBA 0,05 y 0,5 mg/L. En todos los casos los callos formados

fueron blancos y de consistencia friable y sólo ocasionalmente se observó la formación de raíces. En un experimento adicional realizado en *P. regnellii* y *P. solmsianum* (Cuadro 2) se observó la mayor inducción de callos (+++) en los tratamientos ANA 0,01 mg/L en hojas y DICAMBA 1 mg/L en peciolo; asimismo, se formaron brotes incipientes únicamente en hojas en los tratamientos ANA 0,01 y BAP 1 mg/L, respectivamente. En el caso de *P. solmsianum* únicamente se observó la mayor inducción de callos en el tratamiento DICAMBA 2 mg/L en peciolo; sin embargo, se formaron brotes incipientes en los tratamientos AIA 0,2 y 2 mg/L y DICAMBA 0,2 mg/L, tanto en hojas como en peciolo. En ambas

especies las raíces no mostraron ningún potencial en la inducción de callos ni respuestas morfogénicas.

Las suspensiones celulares fueron iniciadas a partir de callos friables inducidos en varias combinaciones de reguladores de crecimiento en diversas especies de *Piper*, en medios de cultivo de igual o similar formulación (Cuadro 3). En la mayoría de los casos se observó una larga fase lag o de reposo con una duración de 15 a 20 días; sin embargo, una vez establecido el cultivo la fase de reposo tuvo una duración de 24 a 48 h. La fase exponencial no fue claramente delimitada en tanto que la fase estacionaria se extendió hasta los 27 y excepcionalmente los 31 días de cultivo.

Cuadro 2

Inducción de callos en varios explantes de *P. regnellii* y *P. solmsianum* en medio de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, después de 60 días de cultivo.

Especie	Reguladores de crecimiento (mg/L)					Explantes		
	ANA	2,4-D	DICAMBA	AIA	BAP	Hoja	Peciolo	Raíz
<i>P. regnellii</i>	0,01				1,0	+++/B		
	1,0				0,1	-		-
			1,0			-	+++	
			1,0		1,0	+/B	++	-
					1,0	-	-	
					0,5			-
<i>P. crassivervium</i>		0,2				-	-	-
		0,2				-	+	-
		2,0				+	+	-
				0,2		-/R	-/B/R	-
				2,0		-/B/R	+/B/R	-
		0,2				++	++	-
	2,0				++	++	-	
			0,2			-/B/R	-/R	-
			2,0			+	+++	-

MS, vitaminas (m-inositol 100 mg/L y tiamina H.Cl 1 mg/L), sacarosa 3% y agar 0,8%
 -, sin formación de callo; +, callo cubre 1/3 del explante; ++, callo cubre 1/2 a 2/3 del explante;
 +++, callo cubre todo el explante; B, brotes; R, raíces

Por otro lado, en suspensiones celulares de *P. aduncum* numerosos metabolitos secundarios fueron detectados en extractos de células y de medios de cultivo (Figura 1) y en extractos de células de *P. umbellatum* (Figura 2), por lo tanto, las células en suspensión son capaces de excretar metabolitos secundarios al medio de cultivo, especialmente durante la fase estacionaria.

En la determinación de la curva de crecimiento, expresado como peso seco, de

suspensiones celulares de *P. cernuum*, en un ciclo que duró 24 días (Figura 3a), se estableció la típica curva S o sigmoidea, de crecimiento celular (Szabados *et al.*, 1991). Se observó una fase de retraso corta, de aproximadamente 3 días, al igual que la fase exponencial que se extendió hasta el día 12 del cultivo; la fase lineal se alcanzó en el día 18, iniciándose una muy corta fase de desaceleración progresiva hasta el día 21, para luego continuar la fase estacionaria hasta el día 24. Después de ese día se

inició la fase senescente, caracterizada por la oxidación progresiva de la suspensión celular que conllevó a la muerte inexorable de las células si no fueran subcultivadas.

Las variaciones de la actividad específica de PAL durante el ciclo de desarrollo de suspensiones celulares de *P. cernuum* se detallan en la figura 3b. Se

observó que durante las fases exponencial y estacionaria se alcanzaron los mayores valores de actividad específica de PAL con alrededor de 3,7 nKatal/mg proteína, en tanto que el menor valor se observó durante la fase de reposo con 1,7 nKatal/mg proteína; sin embargo, valores inferiores a 1 nKatal/mg proteína se observaron en la fase senescente.

Cuadro 3

Efecto de diferentes formulaciones de medio de cultivo en el establecimiento de suspensiones celulares en varias especies de *Piper*

Tratamiento (mg/L)	<i>P. adun.</i>	<i>P. cer.</i>	<i>P. crass.</i>	<i>P. reg.</i>	<i>P. solm.</i>	<i>P. umb.</i>
AK: B5 + ANA 1,0 + KIN 0,2					++	+++
AS-1: B5 + ANA 0,5 + BAP 0,1	+++		++	+++		+++
AS-2: B5 + AIA 0,5 + BAP 0,1	++		+++	+++		+
AS-3: B5 + 2,4-D 0,5 + BAP 0,1	++		-	+		++
AS-4: B5 + ANA 0,5 + KIN 0,1	+		+	-		++
AS-5: B5 + AIA 0,5 + KIN 0,1	++		+	-		+
AS-6: B5 + 2,4-D 0,5 + KIN 0,1	+++		-	-		+++
BC-1: B5 + ANA 1,0 + BAP 0,2	+++		+++			
EM: MS + 2,4-D 0,2 + AG ₃ 0,5	+++	+++				+++
LRM: B5 + ANA 0,1 + BAP 1,0	+++					
S1M: B5 + 2,4-D 0,2 + BAP 0,5	+++					
T1: MS + DICAMBA 1,0 mg				+++		
U1: MS + BAP 0,5	++			++		
W1: B5 + DICAMBA 0,05	+++					

^a*P. adun.* (*Piper aduncum*), *P. cer.* (*P. cernuum*), *P. crass.* (*P. crassinervium*), *P. reg.* (*P. regnellii*), *P. solm.* (*P. solmsianum*) y *P. umb.* (*P. umbellatum*).

^bEvaluación después de 21-25 días de cultivo

^cMS (Murashige & Skoog, 1962); B5 (Gamborg et al., 1968)

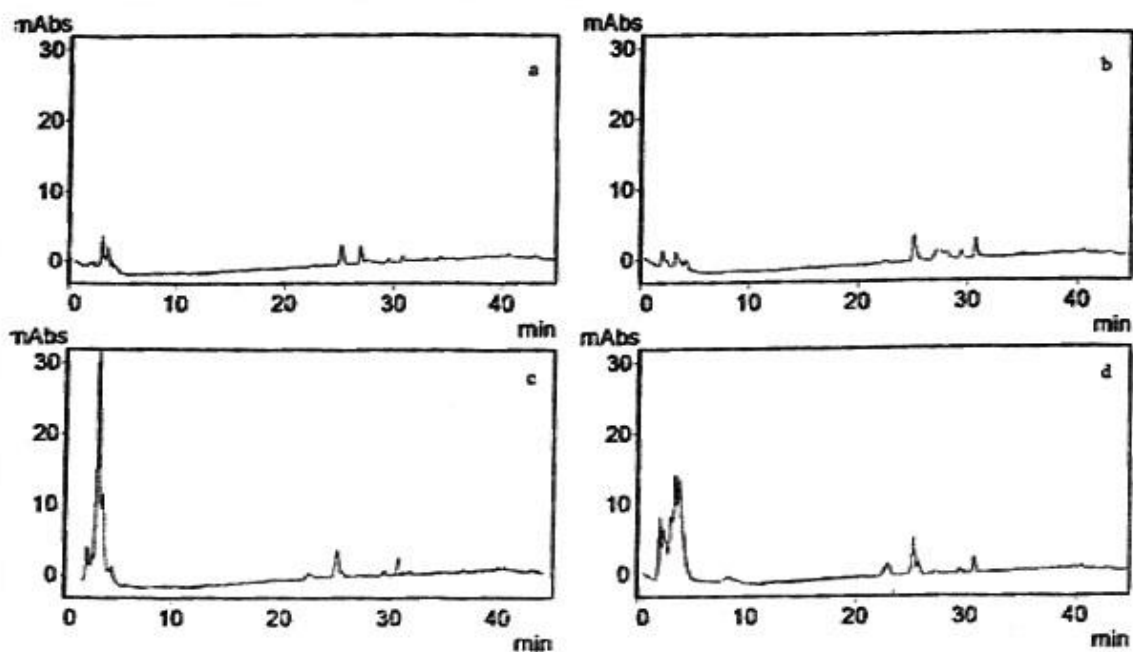
^dLos tratamientos están suplementados con m-inositol 100 mg/L, tiamina H.Cl 1 mg/L, piridoxina.HCl 0,5 mg/L, ácido nicotínico 0,5 mg/L, glicina 2,0 mg/l, sacarosa 3% y caseína hidrolizada (CH) 250 mg/L.

^e-, sin desarrollo celular, +, pobre desarrollo celular; ++, moderado desarrollo celular y +++, óptimo desarrollo celular.

Un incremento significativo del pH de la suspensión celular hasta alcanzar un valor alrededor de 6 coincidió con el mayor valor de PAL detectado, lo que ocurrió durante la fase estacionaria (Figura 3c). Por otro lado, variaciones significativas en el contenido de fenoles totales se observaron a lo largo del ciclo de desarrollo de las suspensiones celulares (Figura 3d), así, alrededor de 8 000 mg/g se detectó en

la fase de retraso disminuyendo ostensiblemente hasta alcanzar un valor de 3 500 mg/g de fenoles totales durante la fase estacionaria. Un hecho similar ocurrió con el contenido de fenoles totales en suspensiones celulares oxidadas con 7, 15, 25 y 33 días después de transcurrido el cultivo; a los 7 días se detectó alrededor de 4 800 mg/g y a los 33 días 0,0 mg/g de fenoles totales (datos nos mostrados en figura).

Figura 1



Cromatogramas de suspensiones celulares de *Piper aduncum* después de 27 días de cultivo. Extractos obtenidos en el medio de cultivo LRM1: B5 + ANA 0,1 mg/L + BAP 1,0 mg/L a. Fracción células y b. Fracción medio de cultivo y extractos obtenidos en el medio de cultivo S1M: B5 + 2,4-D 0,2 mg/L y BAP 0,5 mg/L c. Fracción células y d. Fracción medio de cultivo.

DISCUSIÓN

Los resultados sobre germinación de semillas guardan cierta relación con los mostrados para *P. solmsianum* donde la tasa de germinación fue 35 y 80%, después de 4 y 8 semanas de cultivo, respectivamente, aunque en ese trabajo no se reportó la edad de las semillas sembradas después de colectadas (Balbuena *et al.*, 2009). Por otro lado, la tasa de contaminación de semillas fue 2 - 5%, resultados que concuerdan

ligeramente con el 10% de contaminación reportado para *P. solmsianum* (Balbuena *et al.* 2009); por el contrario, en otras especies de *Piper* como *P. nigrum* (Mathews y Rao, 1984; Fitchet, 1990; Philip *et al.*, 1992) y *P. colubrinum* (Kelkar *et al.*, 1996), la infección endógena por bacterias provocó severos contratiempos en el establecimiento del cultivo de semillas *in vitro*.

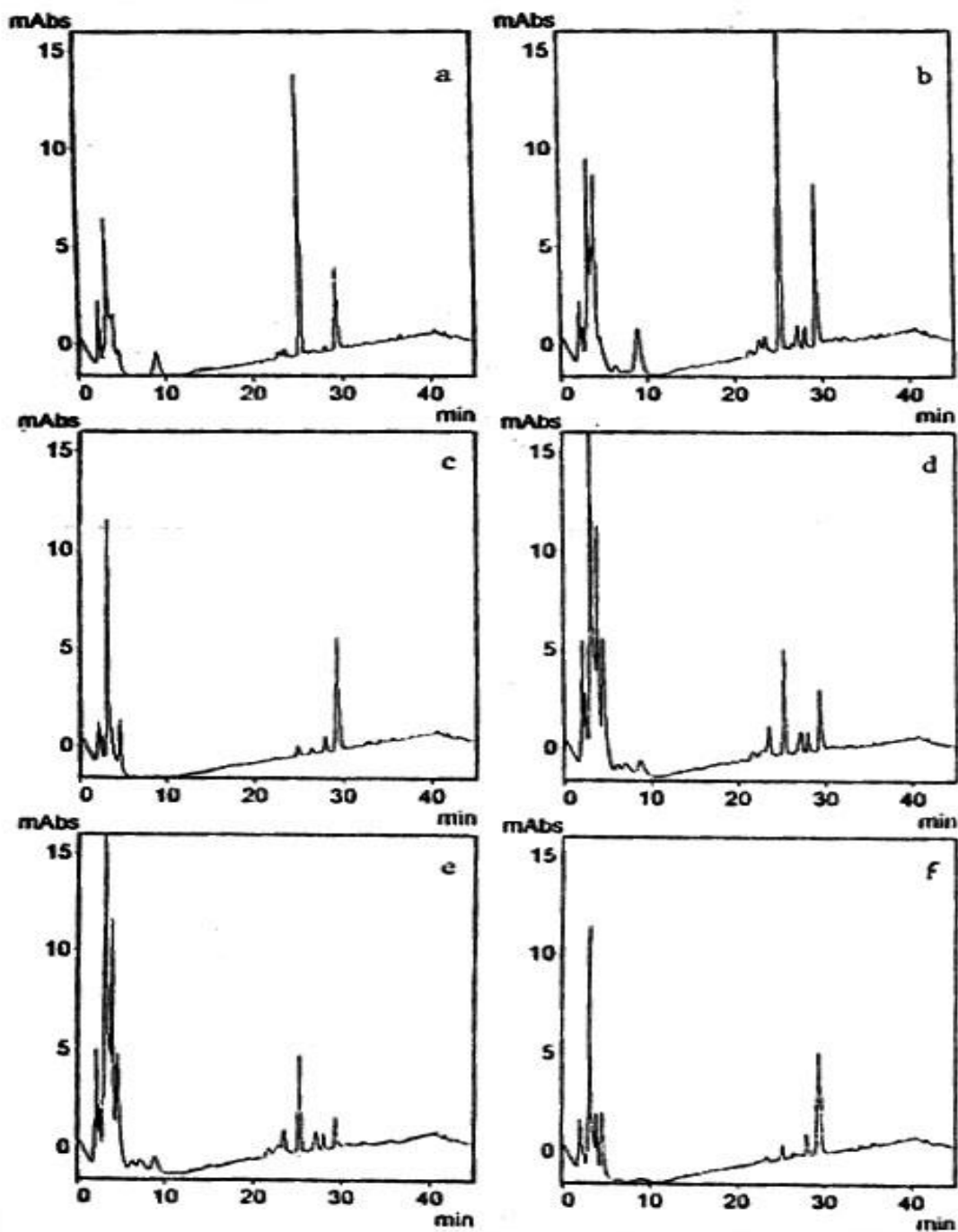


Figura 2

Cromatogramas de suspensiones celulares de *Piper umbellatum* después de 27 días de cultivo. Extractos obtenidos en la fracción células de los siguientes medios de cultivo: a. AS-1: B5 + ANA 0,5 mg/L + BAP 0,1 mg/L, b. AS-2: B5 + AIA 0,5 mg/L + BAP 0,1 mg/L, c. AS-3: B5 + 2,4-D 0,5 mg/L + BAP 0,1 mg/L, d. AS-4: B5 + ANA 0,5 mg/L + KIN 0,1 mg/L, e. AS-5: B5 + AIA 0,5 mg/L + KIN 0,1 mg/L y f. AS-6: B5 + 2,4-D 0,5 mg/L + KIN 0,1 mg/L.

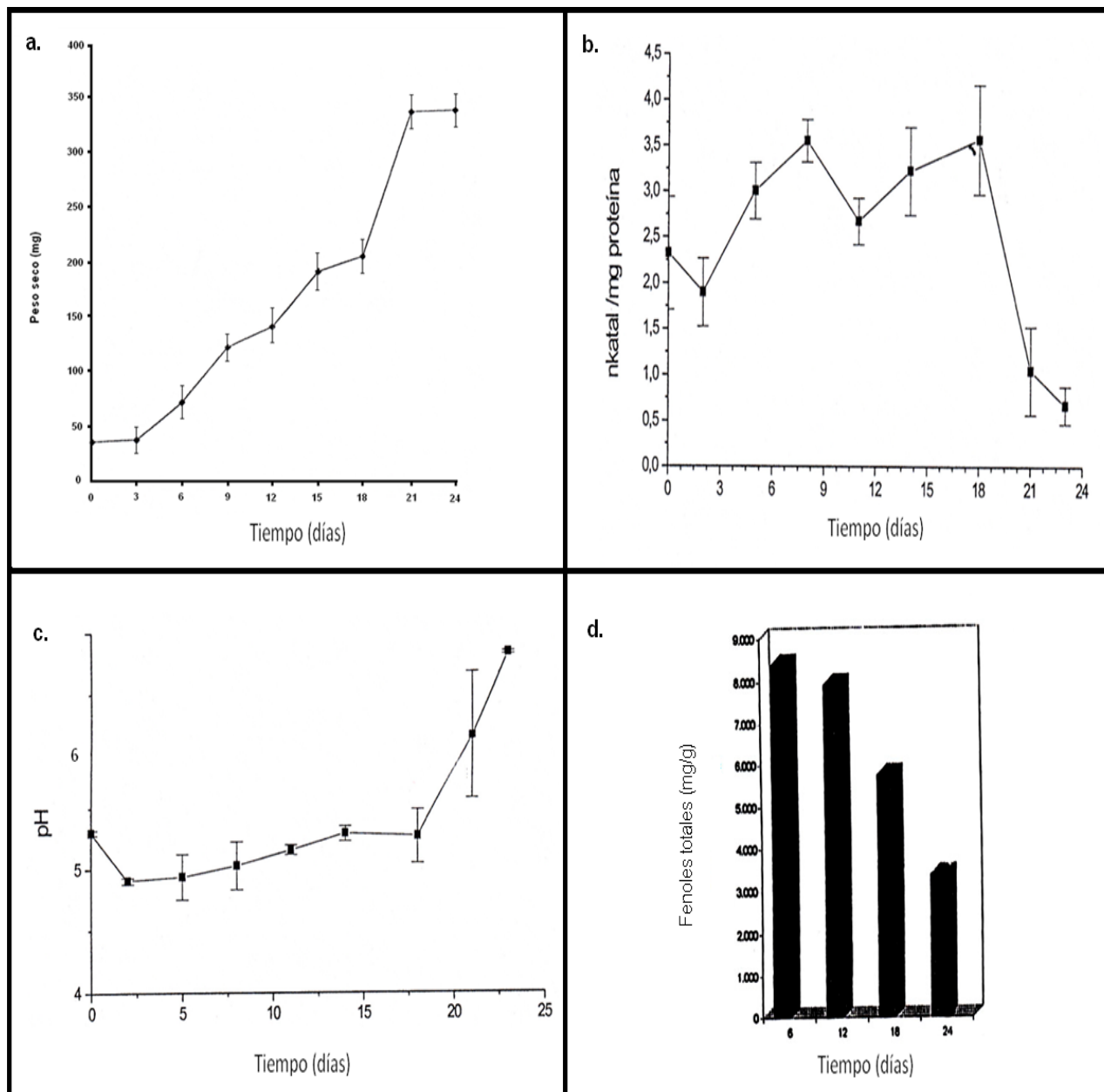


Figura 3a-d

Suspensiones celulares de *P. cernuum*. a. Variaciones en el ciclo de crecimiento; b. Variaciones de la actividad específica de PAL; c. Variaciones del pH y d. Variaciones en el contenido de fenoles totales.

Referente a la elongación y desarrollo de brotes los resultados concuerdan con los reportados para *P. aduncum* (Delgado et al., 2002) y *P. solmsianum* (Vásquez et al., 2010). En nuestro estudio, a diferencia del modelo general de propagación clonal establecido por Murashige (1974) y para *P. longum* por Bhat et al., (1992), ambas etapas: elongación del brote e inducción de raíces, fueron alcanzadas en un único medio de cultivo, lo que

permitió obtener tasas elevadas de plántulas a ser utilizadas en investigaciones sobre morfogénesis, inducción de callos, establecimiento de suspensiones celulares, conservación e intercambio de germoplasma y aclimatación de plantas a condiciones de campo.

En *P. longum* la inducción de callos en segmentos nodales fue observada en varias combinaciones de AIA, ANA y 2,4-D (0,5 a 5 mg/L) con BAP (0,0 y 0,2 mg/L), aunque callos friables

fueron obtenidos únicamente en el tratamiento ANA 1 – BAP 0,2 mg/L (Bhat *et al.*, 1992); asimismo, en *P. nigrum* fue observada la inducción de callos en entrenudos en tratamientos con BA o KIN (1 a 10 μ M) (Bhat *et al.*, 1995). Recientemente, en peciolo de *P. solmsianum* y escasamente en hojas se indujo la formación de callos en varios tratamientos de 2,4-D 0,2 y 2 mg/L con BAP 0,0 a 2 mg/L (Balbuena *et al.*, 2009).

Respecto a las suspensiones celulares, en trabajos previos se reportaron resultados similares a los obtenidos en nuestro trabajo como es el caso de *P. aduncum* donde se establecieron suspensiones celulares a partir de callos de peciolo y entrenudos en medio de cultivo con 2,4-D (0,2 y 0,5 mg/L) – BAP, AG₃ o DICAMBA (0,5 mg/L), alcanzando un máximo de crecimiento a los 24 días (Delgado *et al.*, 2002); asimismo, en *P. cernuum* se establecieron a partir de callos de hojas en medio de cultivo con 2,4-D 0,2 mg/L – AG₃ 0,5 mg/L y en *P. crassinervium* a partir de callos de ápices en medio de cultivo con ANA 1 mg/L – BAP 0,2 mg/L, alcanzando un máximo de crecimiento a los 24 y 36 días, respectivamente (Danelutte *et al.*, 2005). Recientemente, en *P. solmsianum*, se reportó el establecimiento de suspensiones celulares a partir de callos de peciolo y hojas en medio de cultivo con 2,4-D 0,2 mg/L – BAP 2 mg/L, alcanzando un máximo de crecimiento a los 36 días en 16 h de fotoperiodo (Balbuena *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, en suspensiones celulares de *P. aduncum* y *P. umbellatum*, numerosos metabolitos secundarios se detectaron en extractos de células y medios de cultivo, especialmente durante la fase estacionaria, tal como ha sido observado en suspensiones celulares de *P. solmsianum* (Balbuena *et al.*, 2009). En el caso de *P. umbellatum*, los principales constituyentes, con tiempos de retención entre 22 a 33 min, mostraron comportamiento cromatográfico diferente del 4-nerolidilcatecol, metabolito común en sistemas de esta naturaleza. En trabajos previos los metabolitos secundarios identificados en las suspensiones celulares de *P. aduncum* fueron safrol y grandisina (Delgado *et al.*, 2002), en tanto que en suspensiones celulares de *P. cernuum* se produjeron las feniletilaminas dopamina y tiramina y en *P. crassinervium* cuatro alcaloides, incluyendo las inéditas 2,3,4-trimetoxi-*N*-metil-aristolactama y 3-hidroxi-2-metoxi-*N*-metil-aristolactama (Danelutte *et al.*, 2005) lo que confirma la posibilidad de utilizar este sistema para la producción en gran escala de compuestos secundarios, en especial los relacionados

con la ruta de los fenilpropanoides y lignanos, que pueden ser fácilmente recuperados de los cultivos en suspensión sin interferir con el crecimiento celular.

Por lo general, solamente una pequeña cantidad de metabolitos secundarios son producidos durante la fase exponencial de crecimiento puesto que los nutrientes y precursores comunes están direccionados hacia el metabolismo primario, lo que conlleva a un incremento significativo de la biomasa (Bourgau *et al.*, 2001). Cuando ocurre una reducción en la tasa de crecimiento y las células alcanzan cierto grado de diferenciación, lo que suele suceder durante la fase estacionaria (George, 1993), el metabolismo se orienta hacia la biosíntesis de metabolitos secundarios, proceso que involucra la activación de numerosas enzimas (Bourgau *et al.*, 2001).

En lo referente a la fase de retraso, estos resultados fueron similares con los reportados por otros autores quienes indicaron que la fase de retraso no se presenta, o es muy corta, si se subcultivan suspensiones celulares que están en el periodo de crecimiento (Nover *et al.*, 1982), e incluso, también se acorta con la adición al medio de cultivo de ciertos extractos orgánicos como la CH (Larkin, 1982). En otras especies de *Piper*, como en *P. solmsianum*, los resultados fueron muy diferentes con los reportados en nuestro trabajo puesto que se reportó una fase de retraso o lag bastante extensa, con una duración aproximada de 20 días, una fase exponencial no bien delimitada y una fase estacionaria alcanzada a los 36 días del cultivo; el volumen de sedimento celular (SCV) de 0,6 a 2 mL, en 42 días de cultivo puede considerarse muy pobre (Balbuena *et al.*, 2009), lo que podría atribuirse a que el medio de cultivo no fue suplementado con aditivos orgánicos complejos.

La enzima PAL, al igual que la chalcona sintasa (CHS), es una enzima clave en el metabolismo de los fenilpropanoides y su inducción es considerada un mecanismo de defensa frente a diferentes estreses bióticos y abióticos (Haga *et al.*, 1988), presentando cambios en su actividad (Wang *et al.*, 2007) y en sus características cinéticas (Maldonado *et al.*, 2007). Como producto final de la ruta catalizada por la enzima PAL, se originan compuestos relacionados con la necrogénesis y con el pardeamiento de células y productos vegetales (Dangyang y Salveit, 1989), así como otros compuestos implicados en la coloración, textura y capacidad antioxidante de los mismos. El amarronamiento de las suspensiones celulares, observado en nuestro trabajo, resultaría como consecuencia de la degradación oxidativa de los

compuestos fenólicos la que es catalizada por enzimas como polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) (Lei et al., 2004). Por otro lado, es posible atribuir el alto contenido de fenoles presentados en los primeros días de establecida la suspensión celular a la condición de estrés que supone el inicio del proceso de división celular de las células en cultivo, la que va disminuyendo conforme progresa el proceso.

CONCLUSIONES

La inducción de callos, mayormente friables, fue fuertemente dependiente de la especie de *Piper*, la clase de explante y la interacción hormonal utilizada; sin embargo, una mayor formación de callos, se observó en entrenudos y en la interacción ANA (0,5 y 1 mg/L) – BAP 0,2 mg/L.

Se establecieron suspensiones celulares de todas las especies de *Piper* investigadas y en una amplia variedad de medios de cultivos, destacando las establecidas en *P. cernuum* y *P. crassinervium*; la suplementación al medio de cultivo de CH 250 mg/L resultó determinante.

En la mayoría de las suspensiones celulares establecidas el ciclo de crecimiento celular abarcó entre 24 – 27 días, determinándose la presencia de diversos metabolitos secundarios, la actividad de la enzima PAL y la producción de fenoles, responsables del amarronamiento de los cultivos.

AGRADECIMIENTOS

G.E. Delgado agradece a la Fundação do Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por la bolsa de Pós-doutorado en el Instituto de Química de la Universidade de São Paulo, Brasil. Asimismo, se agradece a Vilma Morante Alarcón, por la preparación de las figuras.

REFERENCIAS

- Aminuddin-Johri JK, Anis M, Balasubrahmanyam VR. 1993. Regeneration of *Piper betle* from callus tissue. **Curr Sci** 65: 793 - 796.
- Balbuena T, Santa-Catarina C, Silveira V, Kato MJ, Floh EIS. 2009. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). **Acta Bot Bras** 23: 274 - 281.
- Bazán-Calderón J, Ventura-Flores R, Kato MJ, Rojas-Idrogo C, Delgado-Paredes GE. 2011. Actividad insecticida de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Anopheles pseudopuntipennis* Tehobal (Diptera: Culicidae). **An Biol** 33: 135 - 147.
- Bernard CB, Krishnamurthy HG, Chauret D, Durst T, Philogène BJR, Sánchez-Vindas I, Hasbun C, Póveda L, San Román L, Arnason JT. 1995. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropical. **J Chem Ecol** 21: 801 - 814.
- Bhat SR, Kackar A, Chandel KPS. 1992. Plant regeneration from callus cultures of *Piper longum* L. by organogenesis. **Plant Cell Rep** 11: 523 - 528.
- Bhat SR, Chandel KPS, Malik SK. 1995. Plant regeneration from various explants of cultivated *Piper* species. **Plant Cell Rep** 14: 398 - 402.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Sci** 161: 839 - 851.
- Brako L, Zarucchi JL. 1993. **Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru**. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA.
- Brummitt RK. 1992. **Vascular Plant Families and Genera**. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Danelutte AP, Costantin MB, Delgado GE, Braz-Filho R, Kato MJ. 2005. Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*. **J Braz Chem Soc** 16: 1425 - 1430.
- Dangyang K, Salveit ME. 1989. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. **Physiol Plant** 76: 412 - 418.
- Delgado GE, Rojas C, Nunomura SM, Kato MJ. 2002. Análisis fitoquímico en suspensiones celulares de *Piper aduncum* L. (“matico”). **Avanc Cienc & Tec** (UNPRG, Lambayeque, Perú) 3: 15 - 26.
- Fitchet M. 1990. Establishment of *P. nigrum* *in vitro*. **Acta Hortic** 257: 285 - 291.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean roots cell. **Exp Cell Res** 50: 151 - 158.
- George EF. 1993. Plant tissue culture techniques. In: **Plant Propagation by Tissue Culture** (George EF., ed.). Edington, Exegetics

- Limited, Exegetics Limited, Edington, Wilts, England.
- Haga M, Haruyama T, Kano H, Sekisawa Y, Usushizaki S, Matsumoto K. 1988. Dependence on ethylene of the induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in rice leaf infected with blast fungus. **Agric Biol Chem** 2: 943 - 950.
- Heide L, Floss HG, Tabata M. 1989. Incorporation of shikimic acid into p-hydroxybenzoic acid in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. **Phytochemistry** 28: 2643 - 2645.
- Jaramillo MA, Manos PS. 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **Am J Bot** 88: 706 - 716.
- Jaramillo MA, Manos PS, Zimmer EA. 2004. Phylogenetic relationships of the periantless Piperales reconstructing the evolution of floral development. **Int J Plant Sci** 165: 403 - 416.
- Kato MJ, Furlan M. 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure Appl Chem** 79: 529 - 538.
- Kelkar SM, Deboo GB, Krishnamurthy KV. 1996. *In vitro* plant regeneration from leaf callus in *Piper colubrinum* Link. **Plant Cell Rep** 16: 215 - 218.
- Kelkar SM, Krishnamurthy KV. 1998. Adventitious shoot regeneration from root, internode, petiole and leaf explants of *Piper colubrinum* Link. **Plant Cell Rep** 17: 721 - 725.
- Lago JHG, Ramos CS, Casanova DCC, Morandim AA, Bergamo DCB, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Furlan M, Guimaraes EF, Young MCM, Kato MJ. 2004. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **J Nat Prod** 67: 1783 - 1788.
- Larkin PJ. 1982. Sugarcane tissue and protoplast culture. **Plant Cell Tiss Org Cult** 1: 149 - 164.
- Lei DF, Feng Y, Jiang DZ. 2004. Characterization of polyphenol oxidase from plants. **Prog Nat Sci** 14: 553 - 561.
- Maldonado R, Goni O, Escribano MI, Merodio C. 2007. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase enzyme in Annona fruit: Kinetic characteristics and inhibitory effect of ammonia. **J Food Biochem** 31: 161 - 178.
- Martins RCC, LaTorre LR, Sartorelli P, Kato MJ. 2000. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry** 55: 843 - 846.
- Mathews VH, Rao PS. 1984. *In vitro* responses in black pepper (*Piper nigrum*). **Curr Sci** 53: 183 - 186.
- Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. **Ann Rev Plant Physiol** 25: 135 - 166.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15: 473 - 497.
- Nair RR, Gupta SD. 2006. High-frequency plant regeneration through cyclic secondary somatic embryogenesis in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Plant Cell Rep** 24: 699 - 707.
- Navickiene HMD, Miranda JE, Bartoli SA, Kato MJ, Bolzani VS, Furlan M. 2007. Toxicity of extracts and isobutyl amides from *Piper tuberculatum*: potent compounds with potential for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Pest Manag Sci** 63: 399 - 403.
- Nover L, Kranz E, Scharf KD. 1982. Growth cycle of suspension culture of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. **Biochem Physiol Pfl** 177: 483 - 499.
- Palacios ZGF, Delgado GE, Moreno MC, Kato MJ, Rojas C. 2009. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos crudos de *Piper tuberculatum*. **Rev Peru Biol** 16: 209 - 214.
- Parmar VS, Jain SC, Bisht KS, Jain R, Taneja P, Jha A, Tyagi OD, Prasad AK, Wengel J, Olsen CE, Boll PM. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry** 46: 597 - 673.
- Parmar VS, Jain SC, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VK, Kumar R, Azim A, Malhotra S, Kumar N, Jain R, Sharma NK, Tyagi OD, Lawrie SJ, Errington W, Howarth OW, Olsen CE, Singh SK, Wengel J. 1998. Polyphenols and alkaloids from *Piper* species. **Phytochemistry** 49: 1069 - 1078.
- Philip VJ, Joseph D, Triggs GS, Dickinson NM. 1992. Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through tip cultures. **Plant Cell Rep** 12: 41 - 44.
- Scott IM, Puniani E, Durst T, Phelps D, Merali S, Assabgui RA, Sánchez-Vindas P, Poveda L, Philogène BJR, Arnason JT. 2002. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agr Forest Entomol** 4: 137 - 144.

- Smith MA, Kobayashi H, Gawienowski M, Briskin DP. 2002. An *in vitro* approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plants. **Plant Cell Tiss Org Cult** 70: 105 - 111.
- Soberón GV, Rojas C, Saavedra J, Kato MJ & Delgado GE. 2006. Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Rev Peru Biol** 13: 107 - 112.
- Soniya EV, Das MR. 2002. *In vitro* micropropagation of *Piper longum* – an important medicinal plant. **Plant Cell Tiss Org Cult** 70: 325 - 327.
- Szabados L, Mroginski LA, Roca WM. 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. In: **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones** (Roca WM, Mroginski LA., eds.). Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Cali, Colombia.
- Tebbs MC. 1993. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. 2. The taxonomy of *Piper* section *Lepianthes* and *Radula*. **Bull Nat Hist Mus** 23: 1 - 50.
- Trelease W. 1936. Piperaceae. In: **Flora of Peru** (MacBride JF., ed.). Field Museum of Natural History, Chicago, USA.
- Vanisree M, Lee CY, Lo SF, Nalawade SM, Lin CF, Tsay HS. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue culture. **Bot Bull Acad Sinica** 45: 1 - 22.
- Vásquez N, Kato MJ, Rojas C, Malquichagua K, Delgado G. 2010. Tissue culture and production of secondary metabolites from micropropagated plants of *Piper solmsianum*. **Cienc Tecnol Humanid UNPRG, Lambayeque (Perú)** 1: 15 - 21.
- Wang Y, Chen JY, Jiang YM, Lu WJ. 2007. Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase in relation to chilling tolerance in harvested banana fruit. **Postharvest Biol Tec** 44: 34 - 41.
- Westcott RJ, Henshaw GG. 1976. Phenolic synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. **Planta** 131: 67 - 73.
- Yuncker TG. 1972. The Piperaceae of Brazil: Piper – Group I, II, III and IV. **Hoehnea** 2: 23 - 366.
- Yuncker TG. 1973. The Piperaceae of Brazil II: Piper – Group V; Ottonia; Pothomorphe; Sarcorrhachis. **Hoehnea** 3: 29 - 284.
- Yusuf A, Thyagi RK, Malik SK. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. **Plant Cell Tiss Org Cult** 65: 255 - 258.