



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

CULTIVO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Peumus boldus*

Mol. PARA LA PRODUCCIÓN DE BOLDINA

Proyecto de Título presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

POR: Vicente Aguilera Soto

Profesor Guía: Rodrigo Hasbún Zaror

Concepción, Chile 2022

© 2022

Vicente Aguilera Soto

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

CULTIVO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Peumus boldus*

Mol. PARA LA PRODUCCIÓN DE BOLDINA



Profesor Guía

Rodrigo Hasbún Zaror
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal, PhD



Profesor Guía

Lubia Guedes García
Colaboradora académica
Bióloga, Dra.

Calificación del Proyecto de Título

Rodrigo Hasbún Zaror: 7,0

Lubia Guedes García: 7,0

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	7
II. CUERPO	9
2.1 Importancia de productos naturales y el caso de <i>Peumus boldus</i> (Mol.)	9
2.2 Cultivos de tejidos para la producción de metabolitos secundarios <i>in vitro</i>	13
2.3 Líneas celulares a partir de células meristemáticas cambiales	15
2.4 Otras fuentes meristemáticas para iniciar líneas celulares	18
III. CONCLUSIONES	20
IV. BIBLIOGRAFÍA	21

RESUMEN

Peumus boldus Mol. es un árbol nativo que crece en el centro y sur de Chile. El alcaloide más conocido del boldo es la boldina, debido a que posee una alta actividad antioxidante. El producto más exportado para lograr la extracción corresponde a las hojas, las cuales contienen la menor concentración de boldina. El boldo posee varias limitaciones que dificultan la obtención de material vegetal a escala industrial, por lo que se necesitan alternativas tecnológicas para la obtención de boldina. La búsqueda por literatura indica que se han utilizado desde cultivos convencionales, síntesis química, hasta cultivos en suspensión a partir de tejidos vegetales para la obtención de metabolitos especializados, sin embargo, presentan varias limitaciones. Últimamente, se ha utilizado el aislamiento de células meristemáticas del cambium vascular obteniendo resultados óptimos para la producción de algunos productos naturales. Otra alternativa para la producción de metabolitos secundarios es el cultivo de células meristemáticas del brote y de la raíz, sin embargo, el aislamiento, cultivo y manejo de dichas fuentes meristemáticas se complica debido a que su densidad está limitada a una pequeña porción apical.

ABSTRACT

Peumus boldus Mol. is a native tree that grows in the center and south of Chile. Boldo's most important alkaloid is the boldine, due to its high antioxidant activity. The most exported product to achieve extraction is the leaves, which contain the least concentration of boldine. Boldo possesses several limitations that make it difficult to obtain vegetal matter in a conventional way, therefore, it is necessary to find new biotechnological alternatives to get boldine. Literature indicates that conventional cultures, chemical synthesis, and suspension cultures from vegetal tissue have been used to the obtention of specialized metabolites, however, they show various restrictions. Lately, the isolation of meristematic cells from vascular cambium has been used achieving optimal results to produce some natural products. Another alternative to produce secondary metabolites is the culture of meristematic cells from the sprout and the root, yet the isolation, culture and management of these meristematic sources become challenging since the density is limited to a small apical portion.

I. INTRODUCCIÓN

Peumus boldus Mol. es un árbol nativo que crece principalmente en el centro y sur de Chile, se conoce por sus propiedades medicinales otorgadas por el alcaloide boldina, esta se caracteriza por ser una sustancia benéfica para el ser humano debido a que tiene un alto poder antioxidante, como consecuencia se ha utilizado para el tratamiento de varios tipos de enfermedades (Speisky y Cassels 1994). Este alcaloide está presente en la corteza y en menor concentración en las hojas, siendo este último el mayor producto exportado para la obtención de extractos con fines farmacológicos (Barros y Benedetti 2011). La demanda internacional de boldina es permanente, pero las exportaciones desde Chile son marginales. A causa de diversas limitaciones de la especie en cuanto a crecimiento lento, además de que la recolección de hojas se realiza en bosques silvestres, debido a la falta de plantaciones forestales, provocan la sobreexplotación, poniendo en riesgo la conservación de la especie y condicionando su uso sostenible (Roach y Bascur 2001). Por lo descrito anteriormente, es fundamental buscar nuevas alternativas de producción de forma sostenible. Se requiere resolver esta problemática debido a que el alcaloide tiene una gran importancia económica y nuevas

técnicas se podrían utilizar para el resto de las especies nativas que posean compuestos bioactivos, con el objetivo de desarrollar, producir y empaquetar ingredientes activos de alto valor añadido

Se realizó una búsqueda bibliográfica que abarcó distintas técnicas para la obtención de productos naturales y especialmente alcaloides. La información recopilada es fundamental para proporcionar al proyecto FONDEF ID21I10386 “Implementación de una plataforma biotecnológica para la producción sostenible de boldina.”

La presente memoria estará constituida por un capítulo llamado Cuerpo, el que a su vez está formado por distintas secciones y otro capítulo de Conclusiones. El Cuerpo parte con la importancia de los productos naturales para el ser humano y el caso del boldo, luego continúa con la utilización de cultivo de tejidos para la producción de metabolitos secundarios. La siguiente sección del cuerpo incluye información sobre la generación de líneas celulares a partir de células meristemáticas cambiales, y finalmente se aborda la búsqueda de otras fuentes meristemáticas para iniciar líneas celulares.

II. CUERPO

2.1 **Importancia de productos naturales y el caso de *Peumus boldus* (Mol.).**

La industria farmacéutica, a través de los años, ha utilizado distintos compuestos producidos por plantas debido a sus propiedades medicinales. Dichos compuestos denominados metabolitos secundarios o especializados forman parte del metabolismo secundario de las plantas y se pueden dividir en tres grupos químicamente distintos: terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno tales como alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y aminoácidos no proteicos (Taiz y Zeiger 2002). La obtención de metabolitos secundarios ha tenido un desarrollo importante a medida que se van necesitando nuevos compuestos para producir artículos de interés comercial, así como productos farmacológicos, cosméticos, biopesticidas agroquímicos, saborizantes o aditivos alimentarios, fragancias y pigmentos naturales (Chiang y Abdullah 2007). En principio, la obtención de compuestos naturales se ha realizado mediante cultivos convencionales los cuales presentan limitantes. Generalmente son métodos que suelen ser

muy costosos, demoran tiempo, requieren mucha cantidad de material vegetal, además de producir contaminación ambiental (McCoy y O'Connor 2008). Estas limitantes se ven reflejadas directamente en *Peumus boldus* Mol. el cual es un árbol nativo que crece en el centro y sur de Chile, y que durante años se ha utilizado con fines farmacológicos (Speisky y Cassels 1994, Luebert y Pliscoff 2006).

P. boldus se ha utilizado desde 1875 por británicos y estadounidenses como tratamiento para malestares leves del sistema digestivo (Bastien 1987). Se han descrito una amplia gama de tratamientos contra enfermedades en los cuales el boldo podría actuar, principalmente relacionados a aterosclerosis, daño por isquemia-reperfusión, hepatotoxicidad inducida por fármacos, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, ciertos tipos de cáncer y algunas enfermedades neurodegenerativas (Speisky y Cassels 1994). En Chile, es común la automedicación mediante infusiones para aliviar dolores estomacales. La boldina, principal alcaloide del boldo para la industria farmacéutica, corresponde a una sustancia sólida, de color amarillento pardo, de sabor amargo, inestable y fotosensible oxidándose por la luz solar (Barros y Benedetti 2011). Posee una alta actividad antioxidante, a la que se le

atribuye sus propiedades farmacológicas antes mencionadas. Es por esto que la boldina se sitúa como una sustancia potencialmente benéfica para la prevención de varias condiciones patológicas (Speisky y Cassels 1994). En el árbol, esta se encuentra localizada principalmente en hojas y en mayor concentración en la corteza, conteniendo un 6% del alcaloide en comparación con las hojas que es tan solo de 0,02% a 1% (Cassels 2004). El producto más exportado corresponde a hojas secas, enteras o trituradas con las que se producen extractos y/o aceites esenciales. Los principales países en donde se logra el valor agregado son España, Francia, México y Alemania, puesto que se usa íntegramente en la industria medicinal (Barros y Benedetti 2011). Los reportes de exportación de productos no madereros sitúan a las hojas de boldo como un producto muy valioso, en 2017 se reportaron ingresos por exportaciones de aproximadamente cinco millones de dólares estadounidenses al año (Caselli y González 2018).

El boldo corresponde a una especie endémica forestal que posee un gran valor dentro del mercado nacional e internacional. Las hojas corresponden a la biomasa seca que contiene menor porcentaje del alcaloide por lo que se requiere demasiado material vegetal para proveer de boldina a la industria

farmacéutica. Además, el boldo es una especie de crecimiento lento, similar al peumo y al quillay, demorando alrededor de dos años en alcanzar los 50 cm de altura (Roach y Bascur 2001), por lo que se requiere de varios años para que un individuo consiga llegar a la edad adulta. Se ha descrito que, en bosques abiertos con baja densidad, el crecimiento medio anual en diámetro a la altura del pecho (DAP) es de 0,36 cm (Durán 2005). Las hojas comercializadas se obtienen a partir de bosques silvestres debido a que no es rentable el establecimiento de plantaciones forestales o agrícolas (Vogel et al. 2011). La extracción de hojas se realiza por cosecha en bosques jóvenes lo que conduce a un producto recolectado muy heterogéneo resultado del tiempo de acopio que se necesita (Roach y Bascur 2001). El resultado de las limitaciones de la especie provoca que la exportación de boldina sea marginal, además de la sobreexplotación del recurso (Barros y Benedetti 2011). Por todo lo anterior, se requieren métodos para la producción de manera sostenible de boldina y con un mayor valor agregado.

2.2 Cultivos de tejidos para la producción de metabolitos secundarios *in vitro*

Existen varios métodos alternativos para la producción de compuestos naturales, y uno de estos es la síntesis química o quimiosíntesis para producir moléculas de estructura simple. Sin embargo, muchos compuestos naturales tienen múltiples centros quirales lo que resulta en una síntesis química compleja o no rentable (Wu y Chappell 2008). Como alternativa para sortear estas restricciones, se ha optado por el cultivo de células y tejidos vegetales, el cual ha funcionado para un amplio rango de especies, sin embargo, sólo una fracción reducida de compuestos naturales se pueden producir a una escala industrial (McCoy y O'Connor 2008). Usando el cultivo de tejidos se puede lograr la producción de metabolitos secundarios, lo que ha sido de gran utilidad para la industria medicinal (Neumann et al. 2020). Se ha descrito un protocolo mediante cultivo *in vitro* de brotes de boldo para la obtención de extractos que contienen fenoles y alcaloides. En el caso de la fracción alcaloides, solo un 12% corresponden a boldina.¹

¹ <https://patentimages.storage.googleapis.com/b8/d4/1f/2c63cda4d87948/WO2013056386A1.pdf>

Los cultivos de células vegetales se inician a través del uso de explantes, los cuales se disponen en un medio de cultivo sólido o líquido en el cual se produce la formación de nuevas células. En algunos casos se forma un callo, que corresponde a una masa desorganizada de células que han sufrido una dediferenciación o reprogramación celular, que en medios de cultivo y condiciones de crecimiento adecuados se diferencian (Fehér 2019). Los cultivos en suspensiones celulares se originan a partir del cultivo de callos en medio líquido y en agitación, lo que da como resultado la formación de grupos de células en la periferia del explante (Neumann et al. 2020). A través de los años, los sistemas de cultivos de células vegetales han tenido un avance considerable debido a la experiencia que se ha obtenido gracias a cultivos de células animales. Los cultivos en suspensión han logrado superar la mayoría de las desventajas que poseen los cultivos convencionales junto con la síntesis química para la producción de productos naturales. Los cultivos celulares en suspensión proporcionan condiciones de crecimiento homogéneas logrando la optimización de procesos, acelerando la producción y proporcionando una fuente de material vegetal renovable de productos naturales (McCoy y O'Connor 2008, Fischer et al. 2015). Además, permiten la producción de metabolitos vegetales de estructura química más compleja,

la producción en cualquier temporada del año, fuera de los hábitats naturales de las especies, la producción en forma aséptica y controlada, así como también, la producción de compuestos a partir de especies que se encuentran en peligro de extinción (Sood 2020). Sin embargo, presentan varias limitaciones en cuanto a rendimientos y crecimiento deficiente, además de la inconsistencia de los productos naturales producidos (Roberts 2007), esto debido a cambios genéticos y epigenéticos desencadenados por las condiciones de cultivo (Baebler et al. 2005, Grafi et al. 2007).

2.3 Líneas celulares a partir de células meristemáticas cambiales

Alternativamente al callo como explante para iniciar cultivos celulares en suspensión, se ha logrado aislar y multiplicar células meristemáticas cambiales a partir del sistema vascular de plantas superiores, lo que supone una herramienta biotecnológica avanzada para obtener productos naturales (Lee et al. 2010, Yun et al. 2012). La primera vez que se aislaron células meristemáticas del cambium (CMC) fue de *Taxus cuspidata*, para la producción de paclitaxel, un alcaloide de importancia farmacológica debido

a su capacidad antitumoral, lo que resultó en una biosíntesis más notoria dentro de la región que contiene estas células (Strobel et al. 1993). Lee et al. (2010) aislaron CMC a partir de un tallo de *Taxus cuspidata*, separando xilema que contenía cambium, del floema, corteza y epidermis. Posteriormente, el tejido se cultivó y las CMC en proliferación se separaron de las células de callo o desdiferenciadas (DDC), obteniendo dos tipos de células morfológicamente distintas. La evaluación microscópica de las CMC mostró abundantes vacuolas pequeñas, características de células del cambium vascular, mientras que las DDC poseían una sola vacuola típica de células parenquimáticas (Lee et al. 2010). Las CMC poseen paredes celulares primarias delgadas, además de un tamaño celular pequeño y compacto. Las DDC, por otro lado, son de mayor tamaño y poseen paredes celulares secundarias gruesas (Moon et al. 2015). Retomando el estudio Lee et al. (2010), se expusieron CMC a radiación ionizante resultando en un alto porcentaje de muerte celular en comparación con DDC, y una respuesta similar se obtuvo en presencia del antibiótico zeocina en ambos tipos celulares (Chankova et al. 2007).

Se prefiere usar células indiferenciadas para el establecimiento de cultivos celulares en suspensión, con el fin de lograr mayores tasas de multiplicación celular y respuesta a tratamiento de elicitación y permeabilización (Partap et al. 2022). Se determinaron los niveles de producción de paclitaxel de suspensiones celulares iniciadas a partir de distintos tipos celulares y elicidadas, siendo CMC las que sintetizaron más paclitaxel que cualquier otra línea celular de DDC (Lee et al. 2010). De la misma manera, CMC de *Catharanthus roseus* mostraron un crecimiento rápido después de 3 meses de subcultivo, mientras que DDC resultaron con un crecimiento lento luego de 30 días de subcultivo. En el mismo estudio, se establecieron condiciones de cultivo óptimas para la inducción de CMC, logrando una mayor acumulación de alcaloides indol-terpenoides (Moon et al. 2015). Es por esto por lo que, la utilización de CMC puede ser una estrategia importante para la producción sostenible de alcaloides y así evitar el bajo rendimiento de los cultivos tradicionales en suspensión.

2.4 Otras fuentes meristemáticas para iniciar líneas celulares

El concepto de totipotencia es la capacidad de una célula vegetal para convertirse en una planta completa y las células meristemáticas de los brotes cumplen con la definición de totipotencialidad, debido a que tienen la capacidad de autorrenovarse y producir una progenie celular que puede experimentar diferenciación (Laux 2003). La elongación del meristema fundamental corresponde al crecimiento primario e incluye los denominados meristemas primarios, que se dividen en meristemas apical caulinar, radicular, intercalar y germinal. Una vez que se completa la elongación de una sección de la planta puede ocurrir el crecimiento secundario que incluye dos tipos de meristemas, el cambium vascular y el cambium del corcho (Stewart y Dermen 1970, Taiz y Zeiger 2002, Moruś et al. 2014). Como otra alternativa a la utilización de meristemas del cambium vascular para cultivos celulares, se suele utilizar meristema apical del brote y meristema apical de la raíz. No obstante, el aislamiento, cultivo y manejo de dichas fuentes meristemáticas se complica debido a que su densidad está limitada a una pequeña porción apical (Yun et al. 2012, Greb y Lohmann 2016, Ochoa-Villarreal et al. 2016, Loake y Ochoa-Villarreal 2017).

La técnica de capa fina, capa de células delgadas o thin cell layer (TCL) fue descrito por primera vez en *Nicotiana tabacum* (Tran Thanh Van 1973). Las capas de células delgadas se pueden extraer longitudinalmente (lTCL) o transversalmente (tTCL) de diferentes tipos de órganos vegetales, el tamaño varia desde 100 micrómetros hasta 1-2 milímetros dependiendo el tipo de tejido, obteniendo cortes compuestos por unas pocas capas de células. Además, el número reducido de células permite que estas estén expuestas de manera uniforme sobre el medio de cultivo. El objetivo de la técnica es disminuir la interacción entre órganos y mantener un mínimo de interacción entre tejido y célula (Duong Tan et al. 2003). Los cortes de capa fina longitudinal es la técnica más utilizada, sin embargo, cortan varios tipos de tejidos, por otro lado, los cortes de capa fina transversales se dirigen a una capa más específica de células o de tejido (Teixeira da Silva y Dobránszki 2014). A la fecha no se registran estudios relacionados con la utilización de discos de capa fina para iniciar cultivos celulares vegetal. Es posible que los discos de capa fina tomados desde zonas apicales, sean un potente explanto para generar cultivo de células meristemáticas.

III. CONCLUSIONES

El boldo es una especie nativa con alto valor comercial, principalmente dada por la boldina, alcaloide de importancia farmacológica. Actualmente, las investigaciones que abordan la obtención de productos naturales mediante cultivos celulares, presentan varias limitaciones en cuanto a crecimiento y rendimiento. Por otro lado, no se conocen estudios que utilicen técnicas de cortes en capa fina o células delgadas transversales para la obtención de metabolitos especializados, ya que su aplicación ha sido limitada a la micropropagación. Esta técnica de cortes en capa fina transversal, aplicada en *P. boldus* podría permitir la obtención de boldina de forma sostenible.

IV. BIBLIOGRAFÍA

Baebler Š., M. Hren, M. Camloh, M. Ravnikar, B. Bohanec, I. Plaper, R. Uzman, J. Žel. 2005. Establishment of cell suspension cultures of yew (*Taxus × media* Rehd. and assessment of their genomic stability. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2005 41:3 41(3): 338-343.

Barros S., S. Benedetti. 2011. Boldo (*Peumus boldus* Mol.) rescate de un patrimonio forestal chileno. Manejo sustentable y valorización de sus productos. Boldo (*Peumus boldus* Mol) rescate de un patrimonio forestal chileno Manejo sustentable y valorización de sus productos.

Bastien J.W. 1987. Healers of the Andes: Kallawaya herbalists and their medicinal plants. University of Utah Press.

Caselli A.J.G., V.A. González. 2018. Anuario Forestal 2018.

Cassels B. 2004. Investigaciones chilenas sobre la química del boldo. pp. In: Proceedings of the Encuentro reinvestigadores en especies medicinales nativas Organizado por FIA con colaboración de CYTED, Red RIPROFITO y CONICYT-Chile, 2004. Santiago, Chile.

Chankova S.G., E. Dimova, M. Dimitrova, P.E. Bryant. 2007. Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiation and environmental biophysics* 46(4): 409-416.

Chiang L., M.A. Abdullah. 2007. Enhanced anthraquinones production from adsorbent-treated *Morinda elliptica* cell suspension cultures in production medium strategy. *Process Biochemistry* 42(5): 757-763.

Duong Tan N., B. Le, K. Tran Van, T. Thorpe. 2003. Thin Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications.

Durán L. 2005. Evaluación de la producción y productividad en biomasa aérea de Boldo (*Peumus boldus* Mol.) en un bosque esclerófilo de la comuna de María Pinto, Provincia de Melipilla, Región Metropolitana. [Tesis]. Santiago.

Fehér A. 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science* 10: 536-536.

Fischer R., N. Vasilev, R.M. Twyman, S. Schillberg. 2015. High-value products from plants: the challenges of process optimization. *Current Opinion in Biotechnology* 32: 156-162.

Grafi G., H. Ben-Meir, Y. Avivi, M. Moshe, Y. Dahan, A. Zemach. 2007. Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Developmental biology* 306(2): 838-846.

Greb T., J.U. Lohmann. 2016. Plant Stem Cells. *Curr Biol* 26(17): R816-821.

Laux T. 2003. The Stem Cell Concept in Plants: A Matter of Debate. *Cell* 113(3): 281-283.

Lee E.K., Y.W. Jin, J.H. Park, Y.M. Yoo, S.M. Hong, R. Amir, Z. Yan, E. Kwon, A. Elfick, S. Tomlinson, F. Halbritter, T. Waibel, B.W. Yun, G.J. Loake. 2010. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nature Biotechnology* 28:11 28(11): 1213-1217.

Loake V.I.P., M. Ochoa-Villarreal. 2017. Cambial Meristematic Cells: A Sustainable Platform for the Production of Plant-Derived Anticancer Drugs. pp. 143-156. En: *Biotechnology and Production of Anti-Cancer Compounds*, (Malik S., ed) Springer International Publishing. Cham.

Luebert F., P. Pliscoff. 2006. Sinopsis bioclimática y vegetal de Chile. p.

McCoy E., S.E. O'Connor. 2008. Natural products from plant cell cultures. *Progress in Drug Research* 65: 329-370.

Moon S.H., J. Venkatesh, J.W. Yu, S.W. Park. 2015. Differential induction of meristematic stem cells of *Catharanthus roseus* and their characterization. *Comptes Rendus Biologies* 338(11): 745-756.

Moruś M., M. Baran, M. Rost-Roszkowska, U. Skotnicka-Graca. 2014. Plant stem cells as innovation in cosmetics. *Acta poloniae pharmaceutica* 71: 701-707.

Neumann K.H., K. Ashwani, J. Imani. 2020. Plant cell and tissue culture : a tool in biotechnology : basics and application. p.

Ochoa-Villarreal M., S. Howat, S. Hong, M.O. Jang, Y.W. Jin, E.K. Lee, G.J. Loake. 2016. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Rep* 49(3): 149-158.

Partap M., A.R. Warghat, S. Kumar. 2022. Cambial meristematic cell culture: a sustainable technology toward *in vitro* specialized metabolites production. *Crit Rev Biotechnol*: 1-19.

Roach F.A.s., F. Bascur. 2001. Análisis prospectivo del mercado de hojas de boldo (*Peumus boldus* Mol.) y sus posibilidades de desarrollo. Santiago: Tesis (ingeniero forestal)--Universidad de Chile, 2001.

Roberts S.C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology* 2007 3:7 3(7): 387-395.

Sood H. 2020. Production of Medicinal Compounds from Endangered and Commercially Important Medicinal Plants through Cell and Tissue Culture Technology for Herbal Industry. pp. En: *Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health*, (Sharma K., K. Mishra, K.K. Senapati, C. Danciu, eds). IntechOpen. Rijeka.

Speisky H., B.K. Cassels. 1994. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacological Research* 29(1): 1-12.

Stewart R.N., H. Dermen. 1970. Determination of number and mitotic activity of shoot apical initial cells by analysis of mericlinal chimeras. *American Journal of Botany* 57(7): 816-826.

Strobel G.A., A. Stierle, W.M. Hess. 1993. Taxol formation in yew — *Taxus*. *Plant Science* 92(1): 1-12.

Taiz L., E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd edn. 339-350 p.

Teixeira da Silva J.A., J. Dobránszki. 2014. Dissecting the Concept of the Thin Cell Layer: Theoretical Basis and Practical Application of the Plant Growth Correction Factor to Apple, Cymbidium and Chrysanthemum. *Journal of Plant Growth Regulation* 33(4): 881-895.

Tran Thanh Van M. 1973. *In vitro* Control of de novo Flower, Bud, Root, and Callus Differentiation from Excised Epidermal Tissues. *Nature* 246(5427): 44-45.

Vogel H., B. González, I. Razmilic. 2011. Boldo (*Peumus boldus*) cultivated under different light conditions, soil humidity and plantation density. *Industrial Crops and Products* 34(2): 1310-1312.

Wu S., J. Chappell. 2008. Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. *Current Opinion in Biotechnology* 19(2): 145-152.

Yun U.W., Z. Yan, R. Amir, S. Hong, Y.W. Jin, E.K. Lee, G.J. Loake. 2012. Plant natural products: history, limitations and the potential of cambial meristematic cells. *Biotechnol Genet Eng Rev* 28: 47-59.