



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado * Facultad de Ciencias Forestales
Programa Magister en Ciencias Forestales

**Cultivos celulares meristemáticos de *Peumus boldus*
Mol. obtenidos a partir de discos de capa fina
procedentes de internodos y de genotipos distintos
cultivados *in vitro***

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales

VICENTE AGUILERA SOTO

Profesor Guía: Dr. Rodrigo Hasbún Zaror
Depto. de Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

CONCEPCIÓN-CHILE
Julio de 2024

Cultivos celulares meristemáticos de *Peumus boldus* Mol. obtenidos a partir de discos de capa fina procedentes de internodos y de genotipos distintos cultivados *in vitro*

Rodrigo Hasbún Zaror (Profesor guía)
Ingeniero Forestal, Dr.

Lubia Guedes García (Profesora co-guía)
Bióloga, Dra.

Adrián Garrido Bigotes (Comisión de Evaluación)
Biólogo, Dr.

Vicente Hernández Castillo (Comisión de Evaluación)
Ingeniero en maderas, Dr.

Martha Hernández (Comisión de Evaluación)
Ingeniero Químico, Dra.

Manuel Sánchez Olate (Comisión de Evaluación)
Ingeniero Forestal, Dr.

DEDICATORIA

*A mi madre,
quien me enseñó que equivocarse es inevitable, y
la obligación es aprender y continuar.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi madre, Ximena Soto, por todo el amor y la educación que me ha brindado, y por ser mi principal motivación para seguir adelante. Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Profesor Rodrigo Hasbún, por su confianza, dedicación a la enseñanza, comprensión y apoyo constante durante mi vida universitaria. Desde 2019, ha sido un honor trabajar en su laboratorio y, en 2022, ser considerado para el proyecto Fondef ID ID21I10386 “Implementación de una plataforma biotecnológica para la producción sostenible de boldina”, el cual me permitió obtener el grado de Magíster.

También quiero agradecer a la Profesora Lubia Guedes por su apoyo, comentarios y consejos durante mi desarrollo en el Laboratorio de Epigenética Vegetal y Laboratorio de Semioquímica Aplicada. Agradezco al equipo del Instituto Forestal de Chile, especialmente a Jorge González, Tamara Vera y Laura Koch, por brindar los recursos necesarios, así como por su acompañamiento durante el transcurso de esta investigación desde mi práctica profesional en la institución. Quisiera también agradecer a la Profesora Rosy Isaias y a su equipo del Laboratorio de Anatomía Vegetal de la Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, por darme la oportunidad de realizar mi pasantía en su laboratorio. Valoré enormemente su colaboración y la cálida acogida que recibí.

Quiero hacer un agradecimiento especial al Doctor Adrián Garrido, quien fue mi Profesor Co-guía durante gran parte de mi investigación y mi tutor durante el pregrado en el Laboratorio de Epigenética Vegetal. Sus consejos, comprensión y orientación fueron fundamentales para mi crecimiento profesional. Finalmente, doy gracias a todos los que me han apoyado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE DE CONTENIDOS	5
INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE TABLAS	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	15
Capítulo 1. Introducción general.....	17
1.1. Importancia de productos naturales y el caso de <i>Peumus boldus</i> (Mol.).....	17
1.2. Cultivos de tejidos para la producción de metabolitos secundarios <i>in vitro</i>	19
1.3. Principales factores que afectan la iniciación y mantenimiento de cultivos celulares vegetales.....	20
1.4. Líneas celulares a partir de células meristemáticas cambiales	21
1.5. Otras fuentes meristemáticas para iniciar líneas celulares.....	23
PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
Capítulo 2. EFFECT OF THIN LAYER DISCS OBTAINED FROM DIFFERENT INTERNODES AND GENOTYPES OF <i>Peumus boldus</i> MOL. GROWN <i>in vitro</i> FOR CELL CULTURE ESTABLISHMENT	27
ABSTRACT	27
Keywords.....	27
Key message	27
2.1. INTRODUCTION	28

2.2. MATERIALS AND METHODS	31
2.2.1. Origin of plant material.....	31
2.2.2. Anatomy of shoots	31
2.2.3. Histological characterization of internodes	31
2.2.4. Histometric measurement of internodes	31
2.2.5. Statistical analysis.....	32
2.2.6. Selection of a hormone balance for cell proliferation and establishment of cell cultures from thin layer disc	32
2.2.7. Sample preparation	32
2.2.8. Growing conditions.....	32
2.2.9. Macromorphological analysis of cell proliferation responses	33
2.2.10. Establishment of cell cultures from thin layer discs	33
2.2.11. Morphological characterization of cell cultures	34
2.3. RESULTS	35
2.3.1. Anatomy of shoots	35
2.3.2. Macromorphological analysis of thin layer discs	41
2.3.3. Cytological characterization of cell cultures.....	49
2.4. DISCUSSION AND CONCLUSION.....	52
2.5. CONFLICT OF INTEREST	56
2.6. ACKNOWLEDGMENTS	56
2.7. DATA AVAILABILITY	56
2.8. FUNDS.....	56
Capítulo 3. PERFIL HISTOQUÍMICO DE CULTIVOS CELULARES OBTENIDOS A PARTIR DE DISCOS DE CAPA FINA DE <i>Peumus Boldus</i> MOL. CULTIVADO <i>IN VITRO</i>	57
3.1. INTRODUCCIÓN	57

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	60
3.2.1. Origen del material vegetal.....	60
3.2.2. Preparación de las muestras.....	60
3.2.3. Condiciones de cultivo.....	60
3.2.4. Análisis macromorfológico de las respuestas de proliferación celular.....	60
3.2.5. Establecimiento de cultivos celulares a partir de discos de capa fina.....	61
3.2.6. Análisis histoquímicos de los cultivos celulares.....	61
3.3. RESULTADOS.....	64
3.3.1. Análisis histoquímicos de los cultivos celulares.....	64
3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	70
4. REFERENCIAS.....	74

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imagen representativa de una célula meristemática cambial (CMC) y una célula desdiferenciada (DDC) obtenidas a partir de un tallo de <i>Taxus cuspidata</i> . Izquierda: CMC teñida con rojo neutro, indicando la presencia de vacuolas. Las flechas negras señalan dos de las muchas vacuolas teñidas. Escala: 10 µm. Derecha: DDC teñida con rojo neutro. La flecha negra indica la presencia de una única vacuola. Escala: 10 µm. Extraída de Lee et al. (2010).	22
Figure 2. Comparison of the histology of each internode of a boldo shoot of genotype 2. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode 10X. D. First internode. E. Second internode. F. Third internode 40X. Scale 100 µm. Staining with toluidine blue. Fa fascicular cambium, In interfascicular cambium, Cx cortex, Pi pith, Ph phloem, Va vascular zone, Xy xylem	36
Figure 3. Comparison of the histology of each internode of a boldo shoot of genotype 7. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode 10X. D. First internode. E. Second internode. F. Third internode 40X. Scale 100 µm. Staining with toluidine blue. Fa fascicular cambium, In interfascicular cambium, Cx cortex, Pi pith, Ph phloem, Va vascular zone, Xy xylem	37
Figure 4. Comparison of the histology of each internode of a boldo shoot of genotype 8. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode 10X. D. First internode. E. Second internode. F. Third internode 40X. Scale 100 µm. Staining with toluidine blue. Fa fascicular cambium, In interfascicular cambium, Cx cortex, Pi pith, Ph phloem, Va vascular zone, Xy xylem	38
Figure 5. Pith measurements in genotypes 2, 7 and 8, in the first, second and third internode. Results of the two-way ANOVA for Pith evaluating the factor Genotype, Internode, and their interaction. A Emmeans test was performed to evaluate differences between genotype levels and internode levels, respectively, in relation to the Pith variable.	39

Figure 6. Cortex measurements in genotypes 2, 7 and 8, in the first, second and third internode. Results of the two-way ANOVA for Cortex evaluating the factor Genotype, Internode, and their interaction. A Emmeans test was performed to evaluate differences between genotype levels and internode levels, respectively, in relation to the Cortex variable.....40

Figure 7. Ratio measurements in genotypes 2, 7 and 8, in the first, second and third internode. Results of the two-way ANOVA for Ratio evaluating the factor Genotype, Internode, and their interaction. A Emmeans test was performed to evaluate differences between genotype levels and internode levels, respectively, in relation to the Ratio variable.....41

Figure 9. Photographs of thin layer discs of the first internode from genotype 2 after 21 days of treatment with 2 mg L⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ of Kn. A. Friable proliferation originating from the vascular cylinder. B. Friable proliferation originating from the epidermis.43

Figure 10. Thin layer disc development with globular response in genotype 2 with 2 mg L⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ of Kn treatment, at 28 and 35 days. A. Thin layer disc of the first internode. B. Thin layer disc of the third internode. Arrows indicate cell proliferation. 44

Figure 11. Thin layer disc of the first internode with a semi-transparent friable response proliferation of genotype 7 and treatment 2 mg L⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ of Kn at 28 days.45

Figure 12. Evolution of friable and non-friable responses in treatment 2 mg L⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ of Kn, in genotypes 2, 7 and 8, during the 5 evaluations (0=0 days, 1=7 days, 2=14 days, 3=28 days, 4=35 days and 5=45 days)45

Figure 13. Photographs of different shoots used in the trial, most of which thin layer discs showed a response, regardless of genotype and internode used at 35 days46

Figure 14. Evolution of friable and non-friable responses in treatment 0.1 mg L⁻¹ of 2,4-D + 2 mg L⁻¹ of Kn, in genotypes 2, 7 and 8, during the 5 evaluations (0=0 days, 1=7 days, 2=14 days, 3=28 days, 4=35 days and 5=45 days)47

Figure 15. Effect of hormonal balance of an explant of the first internode (A), second internode (B) and third internode (C) of genotype 8 for 0 days (0 d), 7 days (7 d), 14 days (14 d), 28 days (28 d) and 35 days (35 d), with 2 mg L ⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L ⁻¹ of Kn...	48
Figure 16. Photographs of cell proliferation of thin layer discs of the first internode (A), second internode (B) and third internode (C) of genotypes 2, 7 and 8 in the two hormonal balances used of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin at 45 days.....	48
Figure 17. Microscopy photographs of an aliquot of cell cultures from each flask with thin layer discs of the first internode, second internode, and third internode at 4 weeks in shaking and darkness at 22 ± 2°C of genotype 2. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode. Scale 100 µm	50
Figure 18. Microscopy photographs of an aliquot of cell cultures from each flask with thin layer discs of the first internode, second internode, and third internode at 4 weeks in shaking and darkness at 22 ± 2°C of genotype 7. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode. Scale 100 µm	51
Figure 19. Microscopy photographs of an aliquot of cell cultures from each flask with thin layer discs of the first internode, second internode, and third internode at 4 weeks in shaking and darkness at 22 ± 2°C of genotype 8. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode. Scale 100 µm	51
Figura 20. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación A1 y A2, control y elicidadas, teñidas con reactivo Dragendorff para visualización de alcaloides. Escala 50 µm. Flechas señalan el color positivo.....	67
Figura 21. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación B4, B5 y B6, control y elicidadas, teñidas con reactivo Dragendorff para visualización de alcaloides. Escala 50 µm. Flechas señalan el color positivo.....	68
Figura 22. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación G7, G8 y G9, control y elicidadas, teñidas con reactivo Dragendorff para visualización de alcaloides. Escala 50 µm. Algunas flechas señalan el color positivo.	69
Figura 23. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación A1 del primer internodo, B4 del segundo internodo y G7 del tercer internodo, control y	

elicitadas, teñidas con reactivo Lugol y Sudán III para visualización de almidón y
sustancias lipídicas69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares	63
Tabla 2 Resultados de pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares del primer internodo. + reacción positiva, -reacción negativa	64
Tabla 3 Resultados de pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares del segundo internodo. + reacción positiva, -reacción negativa	65
Tabla 4 Resultados de pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares del tercer internodo. + reacción positiva, -reacción negativa	66

RESUMEN

Peumus boldus Mol. (boldo) es un árbol nativo que crece en el centro y sur de Chile, que durante años se ha utilizado con fines farmacológicos. La boldina es su principal alcaloide, ampliamente usado por su alta actividad antioxidante. Para su obtención se utiliza la recolección de hojas o corteza en bosques mixtos, lo que ha llevado a la sobreexplotación de la especie. Recientemente, se ha recurrido al cultivo de células meristemáticas del cámbium vascular (CMC) en plantas silvestres para la producción de metabolitos secundarios o especializados. Una alternativa para las plantas cultivadas *in vitro* es el cultivo de células meristemáticas del brote y de la raíz. Sin embargo, el aislamiento y cultivo de estas fuentes meristemáticas es complejo debido a que su presencia está limitada a una pequeña porción apical. Una posible solución es la utilización de discos de capa fina (*Thin cell layer*, en inglés), transversales y proximales al meristema apical para iniciar cultivos celulares. Debido a esto, el objetivo de esta investigación es obtener y caracterizar cultivos celulares de *P. boldus* obtenidos a partir de discos de capa fina desde internodos y genotipos distintos cultivados *in vitro*. Mediante 3 objetivos específicos: 1. Comparar la morfología y el crecimiento de cultivos celulares obtenidos de discos de capa fina de diferentes internodos de microplantas de tres genotipos de *P. boldus*. 2. Caracterizar cito-histológicamente las respuestas de los cultivos celulares obtenidos de discos de capa fina de diferentes internodos de microplantas de tres genotipos de *P. boldus*. 3. Contrastar a nivel histoquímico la respuesta a la elicitación de los cultivos celulares obtenidos de discos de capa fina de diferentes internodos de microplantas de tres genotipos de *P. boldus*.

Los principales resultados de la investigación establecieron que los discos de capa fina del primer internodo de genotipos específicos desarrollan una proliferación friable, óptima para iniciar cultivos celulares, de forma más rápida y con un tamaño incluso mayor que los discos iniciales. Seguidos por el segundo y, finalmente, por el tercer internodo, que requiere más tiempo para desarrollarse. Posteriormente, se realizaron cultivos celulares con los diferentes tipos de internodos y se observaron células globulares con tendencia a

la aglomeración, así como células alargadas, ambas con acumulación de diversos metabolitos secundarios. Los resultados histoquímicos muestran una acumulación de alcaloides en todos los cultivos, no hubo presencia de fenoles ni proteínas, además que la acumulación de algunos metabolitos depende del tipo de proliferación celular del cultivo. Mientras que, en otros, el uso de metil jasmonato y tirosina podría influir en la competencia entre rutas metabólicas.

Las principales conclusiones son que la proliferación friable obtenida de los primeros internodos se debe a una mayor presencia de células indiferenciadas procedentes del cámbium fascicular e interfascicular, las cuales provienen de discos de capa fina de brotes de 4 cm de altura con un tamaño de médula pequeño en relación con la corteza del brote inicial. En relación con los cultivos celulares, se determinó que las células globulares corresponden a células meristemáticas, mientras que las células alargadas corresponden a células desdiferenciadas del córtex. Respecto a los análisis histoquímicos, la acumulación de alcaloides no se ve influenciada por ningún patrón hormonal evaluado, lo que sugiere que la producción se debe a las múltiples funciones de los alcaloides en respuesta al estrés. Además, la elicitación con metil jasmonato y tirosina tiende a causar una inhibición o estimulación en la síntesis de ciertos compuestos. Esta investigación constituyó un estudio exploratorio de pruebas histoquímicas en cultivos celulares meristemáticos.

ABSTRACT

Peumus boldus Mol. (*boldo*), a tree native to Chile, has been used for years for pharmacological purposes due to its main alkaloid, boldine, known for its high antioxidant activity. However, collecting leaves and bark in mixed forests has led to overexploitation of the species. Recently, the cultivation of vascular cambium meristematic cells (CMC) in wild plants has been explored as an alternative to produce secondary metabolites. Although the cultivation of shoot and root meristematic cells in plants grown *in vitro* is another option, their isolation and culture are complicated due to their presence limited to a small apical portion. A possible solution is the use of thin layer discs, extracted transversely and close to the apical meristem, to initiate cell cultures. Due to this, the objective of this research is to obtain and characterize cell cultures of *P. boldus* obtained from thin layer discs from internodes and different genotypes grown *in vitro*. Which was addressed through 3 specific objectives: 1. Compare the morphology and growth of cell cultures obtained from thin layer discs of different internodes of microplants of three genotypes of *P. boldus*. 2. Cyto-histologically characterize the responses of cell cultures obtained from thin layer discs of different internodes of microplants of three genotypes of *P. boldus*. 3. Contrast at a histochemical level the response to elicitation of cell cultures obtained from thin layer discs of different internodes of microplants of three genotypes of *P. boldus*.

The main results of the research established that the thin layer discs of the first internode of specific genotypes develop a friable proliferation, optimal for starting cell cultures, more quickly and with an even larger size than the initial discs. Followed by the second and finally the third internode, which requires more time to develop. Subsequently, cell cultures were carried out with the different types of internodes and globular cells with a tendency to agglomeration, as well as elongated cells, both with accumulation of various secondary metabolites, were observed. The histochemical results show an accumulation of alkaloids in all cultures, there was no presence of phenols or proteins, and the

accumulation of some metabolites depends on the type of cell proliferation of the culture. While, in others, the use of methyl jasmonate and tyrosine could influence the competition between metabolic pathways.

The main conclusions are that the friable proliferation obtained from the first internodes is due to a greater presence of undifferentiated cells from the fascicular and interfascicular cambium, which come from thin layer discs of buds 4 cm high with a small pith size in relation to the cortex of the initial shoot. In relation to the cell cultures, it was determined that the globular cells correspond to meristematic cells, while the elongated cells correspond to dedifferentiated cells of the cortex. Regarding histochemical analyses, alkaloid accumulation is not influenced by any hormonal pattern evaluated, suggesting that production is due to the multiple functions of alkaloids in response to stress. Furthermore, elicitation with methyl jasmonate and tyrosine tends to cause an inhibition or stimulation in the synthesis of certain compounds. This research constituted an exploratory study of histochemical tests in meristematic cell cultures.

Capítulo 1. Introducción general

1.1. 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 farmacológico, cosméticos, bioplaguicidas, 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 y requieren mucha cantidad de material vegetal (McCoy y O'Connor 2008). Estas limitantes se ven reflejadas directamente en *Peumus boldus* Mol. (*Monimiaceae*) el cual es una especie arbórea nativa 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).

El boldo, como se le conoce comúnmente, ha sido 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 en los cuales el boldo podría ser eficaz, incluyendo el alivio del dolor de cabeza, dolor de oído, reumatismo, dolor menstrual e inflamación del tracto urinario. También se ha afirmado su capacidad como sedante e hipnótico suave, así como su potencial para contrarrestar el daño causado por isquemia-reperfusión, hepatotoxicidad inducida por fármacos, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, ciertos tipos de cáncer y algunas enfermedades neurodegenerativas

(Magistretti 1980, Speisky y Cassels 1994). En Chile, es común la automedicación mediante infusiones de hojas de boldo para aliviar dolores estomacales (Poblete *et al.* 2023). La boldina se considera el principal alcaloide del boldo, ya que representa hasta un 19% del contenido total de alcaloides. Este alcaloide es una sustancia sólida, de color amarillento pardo, de sabor amargo y fotosensible, oxidándose por la luz solar (Hulle 1983, Barros y Benedetti 2011). La boldina posee una alta actividad antioxidante, a la que se le atribuyen las propiedades farmacológicas antes mencionadas. Es por esto por lo que la boldina se sitúa como una sustancia potencialmente benéfica para la prevención de varias condiciones patológicas (Speisky y Cassels 1994, Rodríguez *et al.* 2018). La boldina se encuentra principalmente en las hojas del árbol, con concentraciones que oscilan entre el 0,02% y el 1%. Sin embargo, su mayor concentración se encuentra en la corteza, donde puede llegar hasta un 6% del alcaloide en peso seco (Urzúa y Acuña 1983, Gotteland *et al.* 1995, Quezada *et al.* 2004). El producto más exportado corresponde a hojas secas, enteras o trituradas con las que se producen extractos y/o aceites esenciales. Los reportes de exportación de productos no madereros sitúan a las hojas de boldo como un producto muy valioso, y en 2022 se reportaron ingresos por exportaciones de aproximadamente doce millones de dólares estadounidenses al año (Poblete *et al.* 2023).

El boldo corresponde a una especie leñosa endémica de Chile 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). La extracción de hojas se realiza por cosecha en bosques silvestres jóvenes, lo que conduce a un producto muy heterogéneo, resultado del crecimiento particular de cada planta y del tiempo de acopio que se necesita (Roach y

Bascur 2001). Además, aunque el establecimiento de plantaciones forestales podría ser rentable para pequeños propietarios en espacios reducidos, a alta densidad y bajo ambientes controlados en invernaderos, siguen existiendo factores externos como el cambio climático, los incendios forestales y la expansión de las fronteras agrícolas y urbanas que desmotivan la inversión privada en el establecimiento de bosques de boldo (Benedetti y Barros 2018). El resultado de estas limitaciones provocan que la exportación de boldina sea marginal, además de la sobreexplotación de este recurso forestal (Barros y Benedetti 2011). Por todo lo anterior, se requieren métodos para la producción sostenible de boldina y con un mayor valor agregado.

1.2. 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). Con el uso del 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). A través del cultivo *in vitro* de brotes de boldo se ha obtenido un protocolo para la obtención de extractos que contienen fenoles y alcaloides. En el caso de la fracción de alcaloides, solo un 12% corresponden a boldina¹.

1

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

Los cultivos de células vegetales se inician a partir de explantes, los cuales pueden incluir tallos, nodos, segmentos de hojas y raíces, entre otros. Los explantes se colocan en un medio de cultivo sólido o líquido, donde se promueve la formación de nuevas células. En algunos casos, se forma un callo, que corresponde a una masa desorganizada de células que han sufrido una desdiferenciación 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). Los cultivos en suspensión han logrado superar la mayoría de las desventajas que poseen los cultivos convencionales y la síntesis química para la obtención 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 renovable de productos naturales vegetales (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).

1.3. Principales factores que afectan la iniciación y mantenimiento de cultivos celulares vegetales.

A pesar de que los cultivos de células vegetales en suspensión han sido de gran utilidad para la industria farmacéutica, presentan varias limitaciones en cuanto a rendimientos y crecimiento deficiente, además de la inestabilidad en los productos naturales producidos, lo que a menudo limita su utilidad comercial (Roberts 2007). Esto se debe a una reprogramación mitótica que conduce a cambios genéticos y epigenéticos en las células especializadas, desencadenados por las condiciones de cultivo (Ketchum *et al.* 1999, Baebler *et al.* 2005, Grafi *et al.* 2007). Se ha documentado que el rendimiento del producto

natural puede variar hasta diez veces con el tiempo para una misma línea celular. Además, hay marcadas diferencias en la acumulación de metabolitos entre diferentes líneas celulares dentro de una misma especie (Ketchum y Gibson 1996).

Otro factor que limita las aplicaciones comerciales de los cultivos de células vegetales es su tendencia a formar agregados celulares cuando las células se cultivan en biorreactores. El tamaño de estos agregados celulares establece un microambiente heterogéneo donde el oxígeno y los nutrientes no se distribuyen uniformemente. Debido a esto, las células que se encuentran en el centro de un agregado tienen una fisiología y metabolismo distinto a las células ubicadas en la periferia (Naill y Roberts 2004). El desarrollo de estos distintos entornos celulares puede ser un factor importante en la variabilidad que se describe a menudo para la producción de productos naturales a partir de cultivos celulares (Yun *et al.* 2012). Otro desafío en la aplicación de los sistemas de cultivo celular es su sensibilidad al estrés por cizallamiento, que se convierte en un factor significativo durante su crecimiento a escala industrial, especialmente cuando hay agregación celular. Esto limita considerablemente el potencial de crecimiento de las células durante el cultivo a gran escala (Joshi *et al.* 1996). Finalmente, el rendimiento de los cultivos celulares reside en la producción de metabolitos secundarios de una especie, que puede variar según el origen, la temporada de cosecha y las condiciones ambientales predominantes en las que se encuentra la planta. En *P. boldus*, la producción de los metabolitos secundarios puede variar dependiendo del órgano, sexo, edad y origen geográfico del árbol (Vogel *et al.* 2005, Fuentes-Barros *et al.* 2018).

1.4. Líneas celulares a partir de células meristemáticas cambiales

Alternativamente al callo como explante para iniciar cultivos celulares en suspensión, se han 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 cambiales (CMC) fue a partir de tallo de *Taxus cuspidata* silvestre, para la producción de paclitaxel, un alcaloide de importancia farmacológica debido a su capacidad antitumoral. La aplicación 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 *T. cuspidata*, separando el xilema junto a la zona cambial, del floema, corteza y epidermis. Posteriormente, el tejido se cultivó y las CMC en proliferación se separaron de las células vegetales desdiferenciadas (DDC), obteniendo dos tipos de células morfológicamente distintas (Fig. 1). La evaluación microscópica de las CMC mostró abundantes vacuolas pequeñas, características de células del cámbium 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).

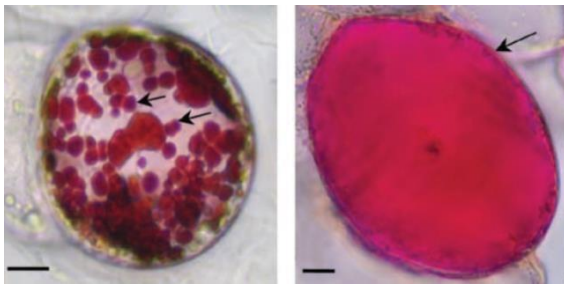


Figura 1. Imagen representativa de una célula meristemática cambial (CMC) y una célula desdiferenciada (DDC) obtenidas a partir de un tallo de *Taxus cuspidata*. Izquierda: CMC teñida con rojo neutro, indicando la presencia de vacuolas. Las flechas negras señalan dos de las muchas vacuolas teñidas. Escala: 10 μ m. Derecha: DDC teñida con rojo neutro. La flecha negra indica la presencia de una única vacuola. Escala: 10 μ m. Extraída de Lee *et al.* (2010).

Para el cultivo de células en suspensión se prefiere usar células indiferenciadas, con el fin de lograr mayores tasas de multiplicación celular y respuesta a tratamientos de elicitación y permeabilización (Partap *et al.* 2022). Dado esto, se determinaron los niveles de

producción de paclitaxel de suspensiones celulares iniciadas a partir de distintos tipos celulares y elicidadas, lo cual indicó que los cultivos de CMC fueron los 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 en un crecimiento lento luego de 30 días de subcultivo. Moon *et al.* (2015) establecieron condiciones de cultivo óptimas para la inducción de CMC de *C. roseus*, logrando una mayor acumulación de alcaloides indolterpenoides. Por estas razones, la utilización de CMC puede ser una estrategia importante para la producción sostenible de alcaloides y así evitar el bajo rendimiento de los cultivos en suspensión tradicionales.

1.5. Otras fuentes meristemáticas para iniciar líneas celulares

El cultivo de tejidos se ha convertido en una herramienta fundamental en la biotecnología debido a la propiedad de totipotencialidad innata de las plantas. La totipotencialidad se refiere a la capacidad de una célula vegetal para desarrollarse en una planta completa. Las células meristemáticas son un ejemplo de totipotencialidad, ya que tienen la capacidad de autorrenovarse y producir una progenie celular capaz de diferenciarse en diversos tipos celulares (Laux 2003). La diferenciación del meristema fundamental corresponde al crecimiento primario de la planta, 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 cámbium vascular y el cámbium suberoso (Stewart y Dermen 1970, Taiz y Zeiger 2002, Morús *et al.* 2014). Como otra alternativa a la utilización de meristemas del cámbium vascular para cultivos celulares, se suele utilizar el meristema apical del brote y el 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 o capa de células delgadas (*thin cell layer*, TCL) fue descrita 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 varía desde 100 μm hasta 1-2 mm dependiendo el tipo de tejido u órgano. De esta forma, se obtienen 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 mantener un mínimo de interacción entre tejidos y órganos distintos (Duong Tan *et al.* 2003). Los cortes de capa fina longitudinal son la técnica más utilizada; sin embargo, cortan varios tipos de tejidos simultáneamente. Por el contrario, los cortes de capa fina transversales se dirigen a una capa más específica de células o de tejido (Teixeira da Silva y Dobránszki 2014). Es por esto por lo que la utilización de discos de capa fina transversales próximos al meristema apical podría solventar la limitación de densidad celular, ya que corresponden a una fuente de células meristemáticas más amplia, específica y de más fácil manipulación (Miyashima *et al.* 2013, Campbell y Turner 2017, Loake y Ochoa-Villarreal 2017, Partap *et al.* 2022). Además, el estudio de este tipo de células meristemáticas utilizadas como explante primario para iniciar cultivos celulares y su aprovechamiento para obtener metabolitos secundarios aún no ha sido investigado.

PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

A partir de los antecedentes descritos se formuló la siguiente pregunta de investigación: Con respecto a los discos de capa fina transversales a partir de microtallos ¿qué efecto tiene la posición del internodo y el genotipo de *P. boldus* en la obtención de cultivos celulares a partir de discos de capa fina?

HIPÓTESIS

Los cultivos celulares iniciados a partir de discos de capa fina del primer internodo generan células meristemáticas en menor tiempo que internodos inferiores y de forma independiente del genotipo de *P. boldus*.

OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar cultivos celulares de *P. boldus* obtenidos a partir de discos de capa fina desde internodos y genotipos distintos cultivados *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar la morfología y el crecimiento de cultivos celulares obtenidos de discos de capa fina de diferentes internodos de microplantas de tres genotipos de *P. boldus*.
2. Caracterizar cito-histológicamente las respuestas de los cultivos celulares obtenidos de discos de capa fina de diferentes internodos de microplantas de tres genotipos de *P. boldus*.
3. Contrastar a nivel histoquímico la respuesta a la elicitación de los cultivos celulares obtenidos de discos de capa fina de diferentes internodos de microplantas de tres genotipos de *P. boldus*.

Capítulo 2. EFFECT OF THIN LAYER DISCS OBTAINED FROM DIFFERENT INTERNODES AND GENOTYPES OF *Peumus boldus* MOL. GROWN *in vitro* FOR CELL CULTURE ESTABLISHMENT

ABSTRACT

In this study, the effect of transverse thin layer discs of *Peumus Boldus* Mol. was evaluated. Internodes grown *in vitro* in cell culture production were reported to be a source of boldine alkaloid production by meristematic cells. According to the macromorphological analysis of cell proliferation, the optimal conditions of clones 2, 7 and 8 were the following: thin layer discs were cultured in culture medium containing ½ of MS and concentrations of 2 mg L⁻¹ of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 0,1 mg L⁻¹ of Kinetin. Under these conditions, the thin layer discs of the first internode showed greater growth of friable cells, followed by the second and third internodes. Histological analysis of the internodes showed that cell proliferation after 5 weeks in thin layer discs of the first internode was mainly due to the multiplication of procambial meristematic cells (CMC), provided by genotypes with a smaller pith size. Microscopy of cell cultures in liquid media after 4 weeks showed a greater presence of agglomerated globular cells in the first internode and a greater presence of elongated cells in lower internodes. Therefore, the use of transverse thin layer discs with the presence of undifferentiated cells and a culture medium supplemented with auxins and cytokinins could be used as a viable and alternative method to the use of other types of initial explants to initiate cell cultures.

Keywords: Secondary metabolites 1; Alkaloid 2; Boldine 3; Cambial meristem cells 4; Dedifferentiated cells 5; Cell suspensions 6; Industrial biotechnology 7.

Key message: The effect of cell proliferation on *Peumus boldus* transverse thin layer discs was studied to provide a starting point for boldine production in cell culture.

2.1. INTRODUCTION

The pharmaceutical industry has used different compounds produced by plants called secondary or specialized metabolites. These natural compounds have been obtained mainly through conventional cultivation, which has great limitations, since they are generally very expensive, require time, labor, and a large amount of plant biomass (McCoy y O'Connor 2008). There are several methods for obtaining natural products, being cell suspension culture the most used technique in the pharmaceutical sector (Neumann *et al.* 2020). This technique has worked for a wide range of species; however, only a fraction of secondary metabolites can be produced industrially (McCoy y O'Connor 2008). Suspension cultures provide homogeneous growth conditions achieving protocol optimization, accelerating production and providing a source of renewable plant material (McCoy y O'Connor 2008, Fischer *et al.* 2015, Sood 2020). However, suspension cultures present several limitations in terms of low yield and growth, in addition to the inconsistency of the natural products formed (Roberts 2007). This is due to genetic and epigenetic changes triggered by culture conditions (Baebler *et al.* 2005, Grafi *et al.* 2007, Roberts 2007).

It has been possible to isolate and multiply cambium meristematic cells, which corresponds to a biotechnological tool for obtaining natural products (Lee *et al.* 2010, Yun *et al.* 2012). The first-time meristematic cambium cells (CMC) were isolated from a stem of *Taxus cuspidata*, for the production of paclitaxel, an alkaloid of great medicinal importance for its antitumor properties, this resulted in greater biosynthesis in the region containing these cells (Strobel *et al.* 1993). Undifferentiated cells are preferred for the establishment of suspension cell cultures to achieve higher rates of cell multiplication, response to elicitation treatments, and permeabilization (Partap *et al.* 2022). Lee *et al.* (2010) determined paclitaxel production levels and elicitation treatments in cell cultures started from different types of *T. cuspidata* cells, resulting in CMC cell cultures synthesizing more alkaloid than any other cell line DDC (dedifferentiated cells). The same results have been reported for the species *Catharanthus roseus*, in addition to showing

greater production of indole-terpenoid alkaloids by CMC, they also showed much faster growth after 3 months of subculture (Moon *et al.* 2015). However, the method proposed by Lee *et al.* (2010) involves the use of a horizontal cut in wild tissues, which is not replicable in tissues cultured *in vitro* and is unfeasible in species with thin stems.

As an alternative to using vascular cambium meristems for cell culture from wild adult tissue, the shoot apical meristem and root apical meristem are often used. However, the isolation, culture and management of these meristematic cells is complicated by the fact that their density is limited to a small apical portion (Lee *et al.* 2010, Yun *et al.* 2012, Greb y Lohmann 2016, Ochoa-Villarreal *et al.* 2016, Loake y Ochoa-Villarreal 2017). The thin cell layer technique could be an alternative to isolate and multiply cambium meristematic cells. This was first described in *Nicotiana tabacum* (Tran Thanh Van 1973). This technique corresponds to a method of initial explant selection used mainly in the field of micropropagation. The technique aims to reduce the interaction between tissue and cells other than plant material, as well as allow more uniform contact of the culture medium with the explant. The cell discs can be extracted longitudinally (ITCL) or transversely (tTCL) from different sections of the plant. The size can vary from 100 µm to 1-2 mm depending on the type of tissue (Duong Tan *et al.* 2003). Longitudinal cuts in a thin layer are the most used because they are easier to make, although they cover more types of fabrics; On the other hand, thin layer cross sections are more specific sections of cells or tissues (Teixeira da Silva y Dobránszki 2014). Thin layer discs transverse and proximal to the apical meristem could solve the limitations that exist when using the apical meristem, since it corresponds to a larger area that is easier to manipulate, which is replicable in tissue cultured *in vitro* (Miyashima *et al.* 2013, Campbell y Turner 2017, Loake y Ochoa-Villarreal 2017, Partap *et al.* 2022).

Peumus boldus Molina (*Monimaceae*), is a native tree of the central and southern Chile. *Boldo*, as it is commonly known, is widely used for its medicinal properties (Speisky y Cassels 1994, Luebert y Plissock 2006). Boldine is the main alkaloid of *boldo* and most

important for the pharmaceutical industry, it corresponds to a solid substance of brownish yellow color, with a bitter taste, unstable and photosensitive, oxidizing in the presence of sunlight (Barros y Benedetti 2011). Boldine is found mainly in the leaves (1%) and in higher concentrations in the bark (6%) (Urzúa y Acuña 1983, Gotteland *et al.* 1995, Quezada *et al.* 2004). Despite this, the most exported product is whole dried or crushed leaves, which are used to produce extracts or essential oils (Barros y Benedetti 2011). Reports on exports of non-timber products place *boldo* leaves as a very valuable product, with export earnings of approximately US\$12 million per year reported in 2022 (Poblete *et al.* 2023). The leaves contain the lowest percentage of alkaloids, so too much plant matter is needed to meet the commercial need. The commercialized leaves are obtained by harvesting young wild forests, resulting in a very heterogeneous product (Roach y Bascur 2001). Furthermore, although the establishment of forest plantations could be profitable for small landowners in small spaces, with high density and under controlled environments in greenhouses, there are still external factors such as climate change, forest fires and the expansion of agricultural and urban frontiers. affecting these plantations, discouraging private investment in the establishment of *boldo* forests (Benedetti y Barros 2018). Due to the limitations of the species, alternative methods are required to produce boldine in a sustainable manner. A favorable alternative is the use of thin layer discs. However, this technique has not yet been investigated for the generation of cell cultures and the subsequent production of secondary metabolites. The objective of this study is to investigate the effect of transverse thin layer discs of different internodes and genotypes of *P. boldus* *in vitro* for the establishment of cell cultures.

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. Origin of plant material

The plant material was provided by the Laboratorio de Micropropagación of the Instituto Forestal de Chile (INFOR), Biobío, Chile. It consisted of 3 genotypes of *P. boldus* grown *in vitro* by one year (genotypes 2, 7, and 8), and previously selected by their capacities to produce boldine in the field (Benedetti y Barros 2018). The explants for each genotype were obtained from the first 3 internodes.

2.2.2. Anatomy of shoots

2.2.3. Histological characterization of internodes

For the histological characterization of each internode, three shoots of each genotype grown *in vitro*, with a height of 4 cm, were used. The shoots were cut at the level of the first 3 internodes, excluding the apical bud, in segments of approximately 0.3 cm³. Each internode was fixed in FAA (formaldehyde, acetic acid in 50% ethanol) (Johansen 1940) for 48 h. Samples were then dehydrated in ethanol series (50%-100%) and infiltrated in historresin (Leica Historresin Kit). The assembly was wrapped in film and was kept at -10°C in the freezer for at least 48 h. The samples were then removed from the freezer and for the film solution and were placed in an oven at 60 °C for polymerization (Paiva *et al.* 2011). Once hardened, the blocks were cut on a rotary microtome (Leica Biocut 2030) with a thickness of 6 µm, and then placed on slides. Subsequently, the samples were stained with 0.05% toluidine blue, pH 4.7 (O'Brien *et al.* 1964). The sections were examined and photographed using a Leica photomicroscope (Leica DM500, Leica Biosystems, Nussloch, Germany).

2.2.4. Histometric measurement of internodes

Three linear measurements were made at three points on each internode per genotype three times. The averages of cortex and pith thickness were measured in microns and the pith/cortex ratio was also calculated using Image J software.

2.2.5. Statistical analysis

Linear measurements were made at 3 points of the first, second and third internode in 3 shoots for each genotype (2, 7 and 8). The response variables correspond to the thickness of the pith, cortex and the pith/cortex ratio, while the predictor variables correspond to the genotype with three levels and the internode with three levels. A linear regression model was fitted with the response variables for each predictor variable with its interaction. Shapiro-Wilk normality tests and Levene's homogeneity of variance tests were performed. Subsequently, for each response variable, a two-way Analysis of Variance (ANOVA) was performed to evaluate the influence of the predictor variables on the response variables. Estimated Marginal Means (Emmeans) tests were performed to contrast the differences between the levels of the predictor variables in terms of the response variables, adjusted using the Bonferroni method. All statistical analyzes and graph generation were performed using the RStudio software environment version 2023.12.1+402 Ocean Storm for Windows.

2.2.6. Selection of a hormone balance for cell proliferation and establishment of cell cultures from thin layer disc

2.2.7. Sample preparation

The experimental unit corresponded to 4 cm long shoots of genotypes 2, 7, and 8. Transverse thin layer discs made with a sharp blade were used as explants, arranged horizontally in the culture medium, maintaining their orientation. The plates for each assay contained three types of explants with three replicates each, divided into: first, second, and third internode. This process was performed in a laminar flow cabinet disinfected with 70% ethanol and sterilized for 1 h under UV light; all the materials used were sterilized in an autoclave at 1 atm and 121°C for 30 min.

2.2.8. Growing conditions

Two hormonal conditions were tried. For treatment 1, explants were arranged in culture medium consisting of ½ of MS (Murashige y Skoog 1962), with a hormonal balance 2 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) + 0.1 mg L⁻¹ kinetin (Kn), in addition to 30 g

L⁻¹ sucrose, 500 mg L⁻¹ PVP, 0.35% (w/v) agar and pH 5.7. For treatment 2, a hormone balance of 0.1 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 2 mg L⁻¹ kinetin was used. It began with the preparation of 12 plates for each genotype, 6 plates were assigned for each treatment. Of the 6 plates per treatment, 3 were used for establishing cell cultures. Each plate contained the 3 levels of internode, with 3 thin layer discs of each. The plates were pretreated for 3 days at 4°C. After pretreatment, the 12 replicates for each genotype were transferred to a growth chamber at 22 ± 2°C and 24 h dark for 6 weeks.

2.2.9. Macromorphological analysis of cell proliferation responses

Macromorphological analyses were performed at 0, 7, 14, 28, 35, and 45 days after the start of growth in darkness, evaluating the three types of explants in each replicate. This evaluation involved of a visual analysis using a magnifying glass (Olympus SZ61) in which the type of cell proliferation response was associated to a coding level. Associating the type of cell proliferation response with a specific code, as follows: no response type "0"; non-friable "1"; friable "2".

2.2.10. Establishment of cell cultures from thin layer discs

To establish cell cultures, 18 glass flasks were prepared: 9 for the initial culture and another 9 for subculture. Liquid culture medium was used consisting of ½ of MS (Murashige y Skoog 1962), with hormone balance 3 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 0.1 mg L⁻¹ kinetin, in addition to 30 g L⁻¹ sucrose, 500 mg L⁻¹ PVP, and pH 5.7 was used. The 3 plates from both treatments were used as inoculum, 6 plates in total for each genotype. For each level of the internode, a 50 mL flask was used with 20 mL of liquid culture medium and 2 µL of pectinase was added. The thin layer discs were placed in the flask corresponding to the level of the internode, without separating the cell proliferation. The flasks were sealed with aluminum and kept shaking at 80 rpm in the dark at 22 ± 2°C. After 2 weeks, subculturing was performed by transferring the fine cell culture by pour-over to fresh culture medium with the same characteristics.

2.2.11. Morphological characterization of cell cultures

After 2 weeks of subculture, a 30 μ L aliquot was extracted from each flask and deposited on a slide, without staining, with its respective coverslip for observation and photographed using a Leica photomicroscope (Leica DM2500, Germany).

2.3. RESULTS

2.3.1. Anatomy of shoots

The three internodes show clear differences in tissue differentiation for the three genotypes. The first internode is in primary growth, where only portions of fascicular and interfascicular cambium are observed around the entire disc. This aspect is more evident in genotype 2, where a lower number of linearly adjacent cambium cells is observed, unlike genotypes 7 and 8 (Fig. 2 A and D). In the second internode, a vascular ring composed of a more defined cambium and a higher level of cellular differentiation is observed. For genotype 2, a smaller interfascicular cambium and larger xylem areas are observed (Fig. 2 B and E). In the third internode, the cambium is completely differentiated, with a cambium zone composed of at least three cell layers. Periclinally divided cells and cell wall thickening in the xylem cells are seen in all three genotypes, being less clear in genotype 2 (Fig. 2 C and F). In relation to the shoot morphology, genotype 2 is characterized by having thicker shoots compared to genotypes 7 and 8. In genotype 7, for the first internode, portions of fascicular and interfascicular cambium are observed around the entire disc (Fig. 3 A and D). In the second internode, a more defined cambium is observed with a decrease in interfascicular cambium and a greater number of lignified xylem cells (Fig. 3 B and E). In the third internode, the vascular cambium is present surrounding the vascular ring (Fig. 3 C and F). In genotype 8, for the first internode, the morphological differences are preserved with the previous genotypes (Fig. 4 A and D). This early stage of development in the first internode shows limited secondary growth activity compared to sections closer to the base. In the second internode, greater cell wall thickening is observed in the xylem cells, and more fascicular and interfascicular cambium cells compared to genotypes 2 and 7 (Fig. 4 B and E). For the third internode, the characteristics are maintained with the previous genotypes (Fig. 4 C and F).

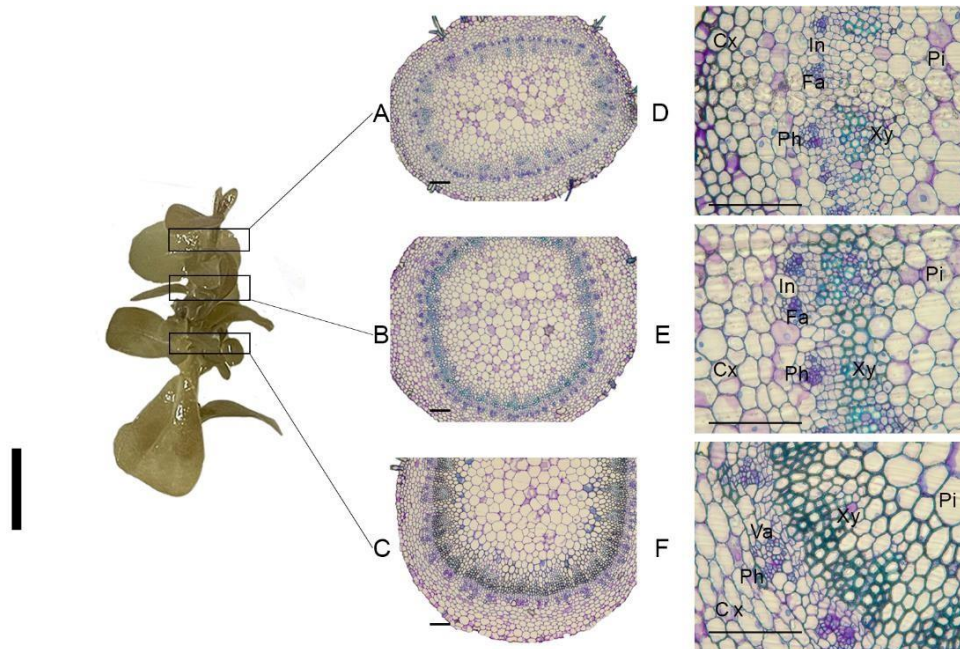


Figure 2. Comparison of the histology of each internode of a *boldo* shoot of genotype 2. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode 10X. D. First internode. E. Second internode. F. Third internode 40X. Scale 100 μ m. Staining with toluidine blue. Fa fascicular cambium, In interfascicular cambium, Cx cortex, Pi pith, Ph phloem, Va vascular zone, Xy xylem.

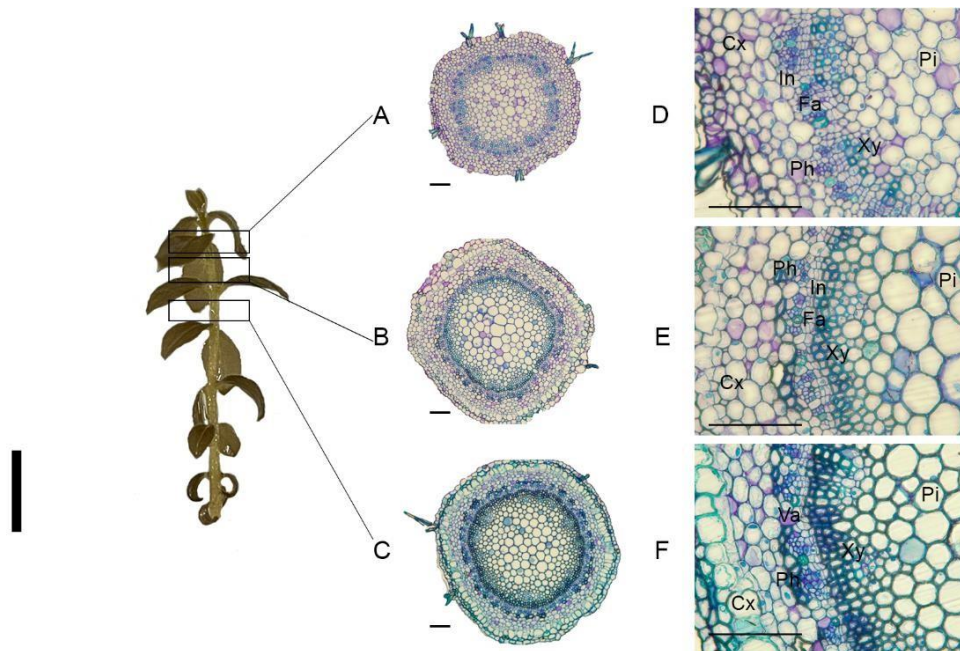


Figure 3. Comparison of the histology of each internode of a *boldo* shoot of genotype 7. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode 10X. D. First internode. E. Second internode. F. Third internode 40X. Scale 100 μ m. Staining with toluidine blue. Fa fascicular cambium, In interfascicular cambium, Cx cortex, Pi pith, Ph phloem, Va vascular zone, Xy xylem.

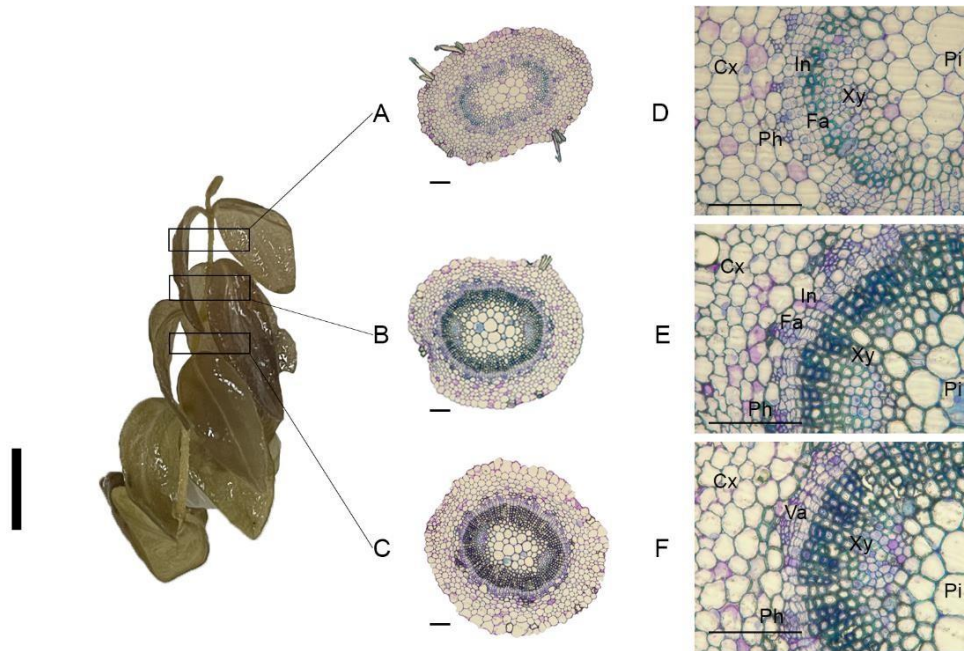


Figure 4. Comparison of the histology of each internode of a *boldo* shoot of genotype 8. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode 10X. D. First internode. E. Second internode. F. Third internode 40X. Scale 100 μ m. Staining with toluidine blue. Fa fascicular cambium, In interfascicular cambium, Cx cortex, Pi pith, Ph phloem, Va vascular zone, Xy xylem.

The results reveal differences in the anatomical characteristics of the internodes between the different genotypes. Two-way analysis of variance indicates that there is no significant interaction between internal level and genotype for all response variables (Fig. 5, 6 and 7). The main factor that shows a significant difference is the genotype (p : 4.00e-10). For the pith variable there is a greater difference between genotypes 2 and 7 (p : 1.65e-9), and between genotypes 2 and 8 (p : 2.79 e- 12), with genotype 2 showing the greatest difference (Fig. 5). For the cortex variable, a significant difference is observed between genotypes 7 and 8 (p : 0.00530), with genotype 7 having a lower cortex thickness unlike genotype 8, which has a greater difference in the cortex for the first internode (Fig. 6). While, for the ratio variable, all genotypes present a highly significant difference (p < 0.001), with

genotype 8 being the one with the lowest ratio value, followed by genotype 7, with genotype 2 being the one with the most heterogeneous values (Fig. 7).

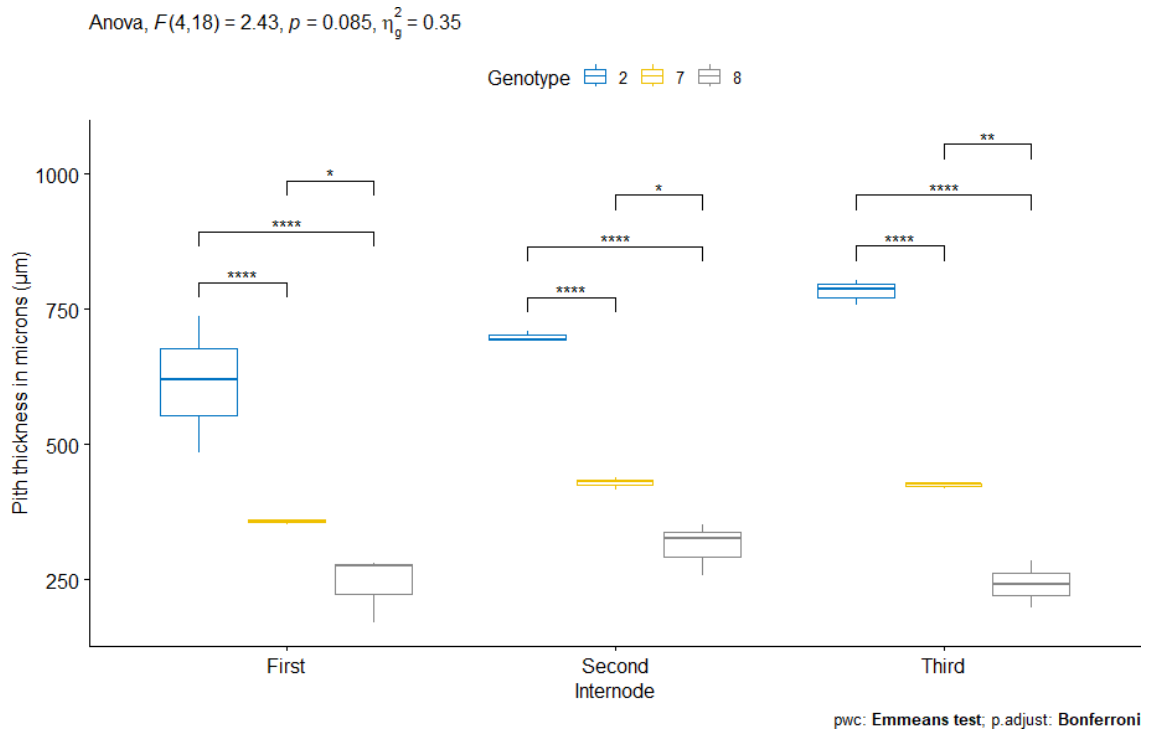


Figure 5. Pith measurements in genotypes 2, 7 and 8, in the first, second and third internode. Results of the two-way ANOVA for Pith evaluating the factor Genotype, Internode, and their interaction. A Emmeans test was performed to evaluate differences between genotype levels and internode levels, respectively, in relation to the Pith variable.

Anova, $F(4,18) = 1.35, p = 0.29, \eta_g^2 = 0.23$

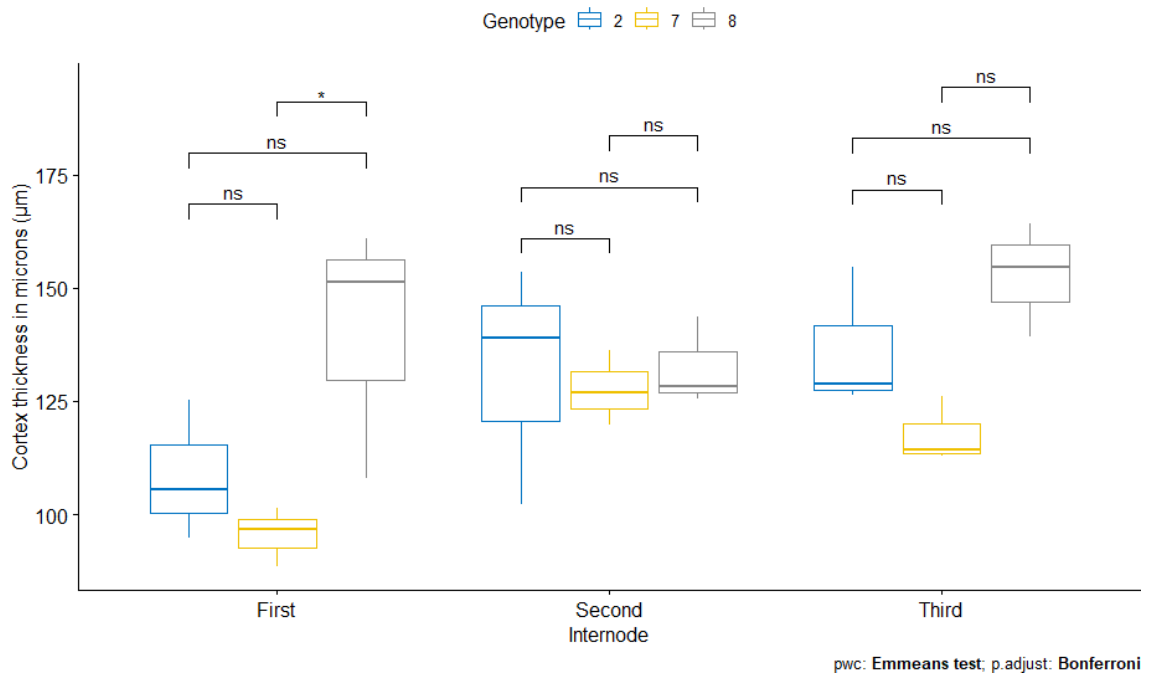


Figure 6. Cortex measurements in genotypes 2, 7 and 8, in the first, second and third internode. Results of the two-way ANOVA for Cortex evaluating the factor Genotype, Internode, and their interaction. A Emmeans test was performed to evaluate differences between genotype levels and internode levels, respectively, in relation to the Cortex variable.

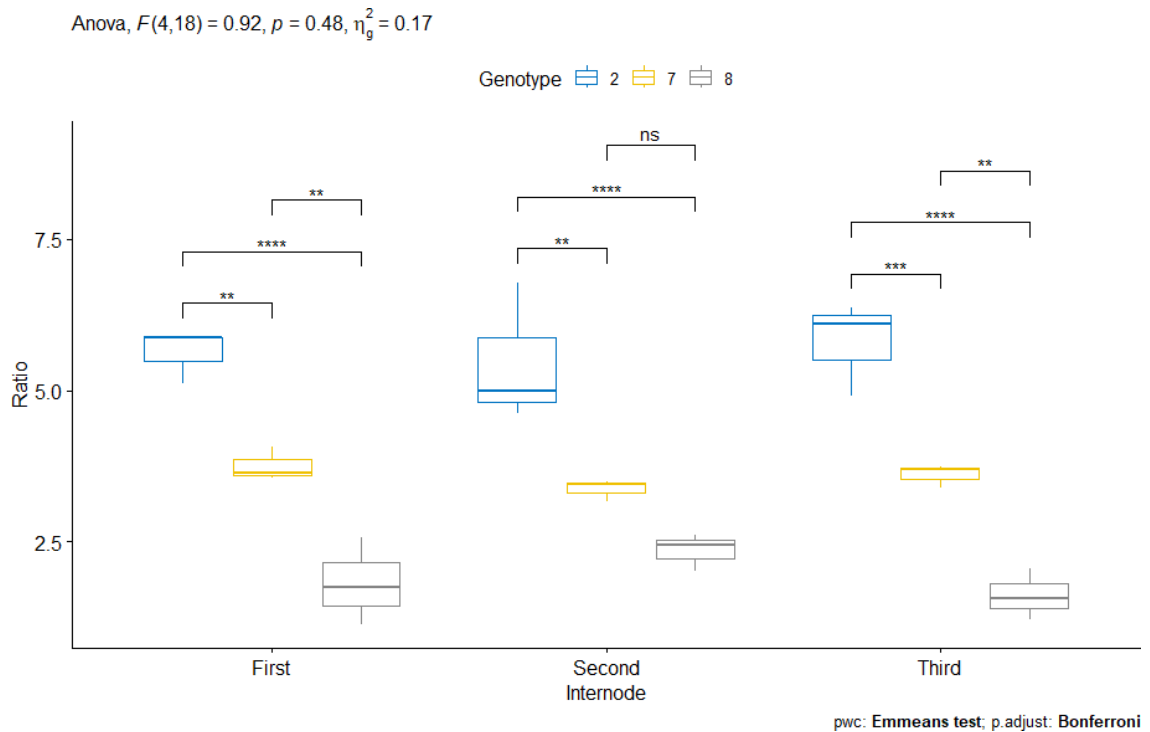


Figure 7. Ratio measurements in genotypes 2, 7 and 8, in the first, second and third internode. Results of the two-way ANOVA for Ratio evaluating the factor Genotype, Internode, and their interaction. A Emmeans test was performed to evaluate differences between genotype levels and internode levels, respectively, in relation to the Ratio variable.

2.3.2. Macromorphological analysis of thin layer discs

At 7 days after pretreatment, thin layer discs of genotypes 2 and 8 reacted rapidly, generating a globular response in clusters of small cells in the stem vascular cylinder zone, even with high variability. This variability was reflected in differences in the continuity of the vascular cylinder in the shoot (Fig. 8). The discs of the first internode presented discontinuity due to the interfascicular cambium, a discontinuity that decreased until it disappeared in the third internode, where there is a cambium zone. After 14 days of pretreatment, it was still not possible to clearly distinguish between friable and non-friable

responses, more time would be needed for friable cell proliferation to develop in most explants.

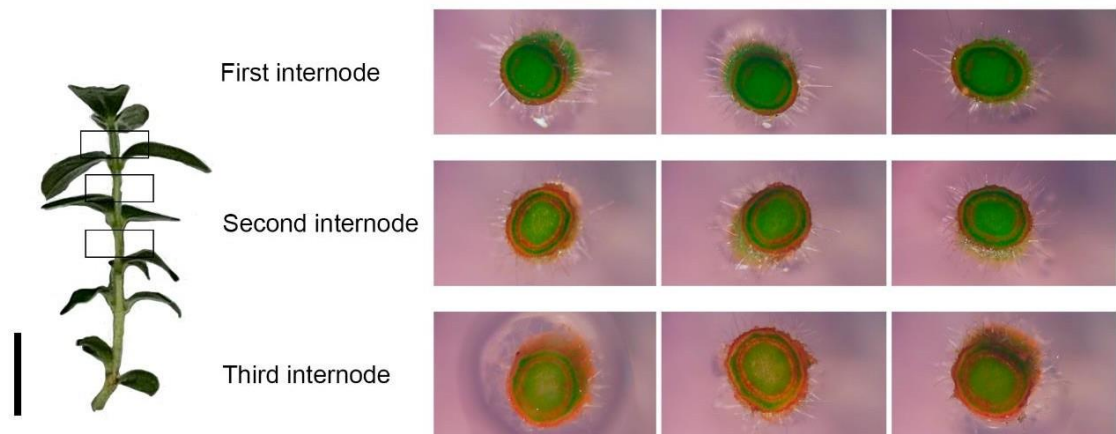


Figure 8. Shoot of genotype 8 and thin layer discs in treatment 2 mg L^{-1} of 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} of Kn in the evaluation on day 0. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode. Scale 1cm.

Genotype 2 showed the difference between friable and non-friable responses later, requiring up to 4 weeks after pretreatment. After this period, two different types of friable responses were observed: one with clusters of small cells forming a smaller globular mass in the parenchyma, and another with a larger mass composed of cells in the vascular cylinder, with a higher biomass (Fig. 9).

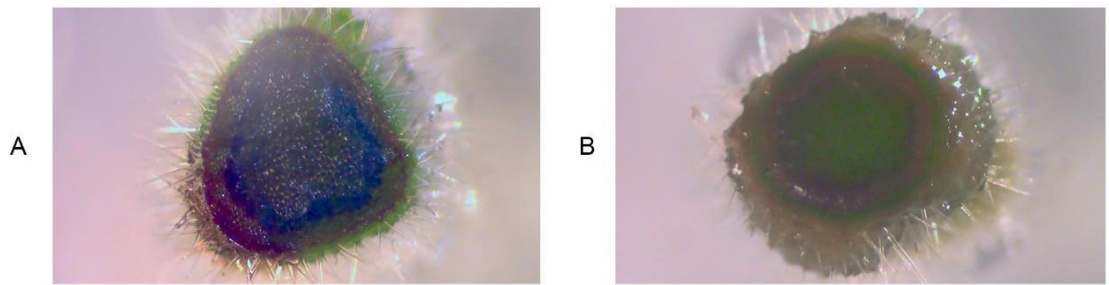


Figure 8. Photographs of thin layer discs of the first internode from genotype 2 after 21 days of treatment with 2 mg L^{-1} of 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} of Kn. A. Friable proliferation originating from the vascular cylinder. B. Friable proliferation originating from the epidermis.

At 28 days a marked increase in cell proliferation was observed in thin layer discs that had previously shown no response. After 28 days, in the third internode discs of genotype 2, a non-friable response was observed with cell growth in up to four points of the vascular cylinder, with smooth, spherical formations subsequently covered by non-friable proliferation of the cortex. At 35 days, there was an increase in this spherical proliferation in discs of the third internode, without being evident in discs of other shoot heights. Although this spherical response could trigger the friable response in the vascular cylinder, it was not evident in all discs that subsequently responded friably (Fig. 10).

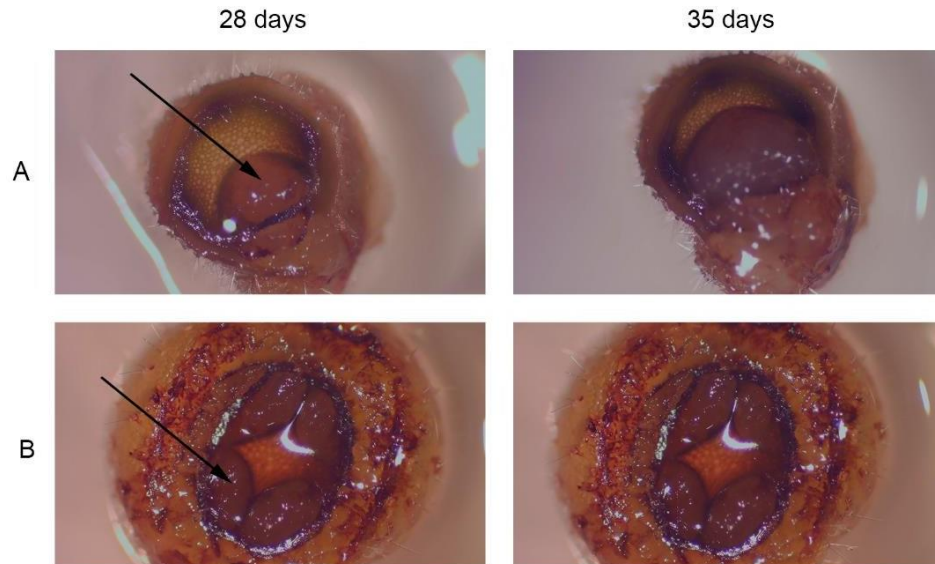


Figure 9. Thin layer disc development with globular response in genotype 2 with 2 mg L^{-1} of 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} of Kn treatment, at 28 and 35 days. A. Thin layer disc of the first internode. B. Thin layer disc of the third internode. Arrows indicate cell proliferation.

At 28 days, with the treatment 2 mg L^{-1} of 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} of Kn, a friable response was observed in more than 50% of the thin layer discs of the first internode of all genotypes. The first internode of genotype 7 stood out from the other genotypes by presenting an intense white color (Fig. 11 and 12). After 35 days, these discs maintained or increased their cell growth without losing their color. In this same evaluation, the thin layer friable discs of the first and second internodes of all genotypes outperformed the non-friable ones (Fig. 12). The presence of friable response in the different thin layer discs could not be associated with different variables such as the stage of shoot development, young growth, presence of expanding leaves, green coloration, and homogeneous internode length (Fig. 13).

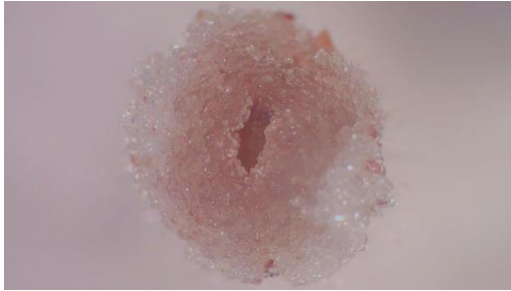


Figure 10. Thin layer disc of the first internode with a semi-transparent friable response proliferation of genotype 7 and treatment 2 mg L^{-1} of 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} of Kn at 28 days.

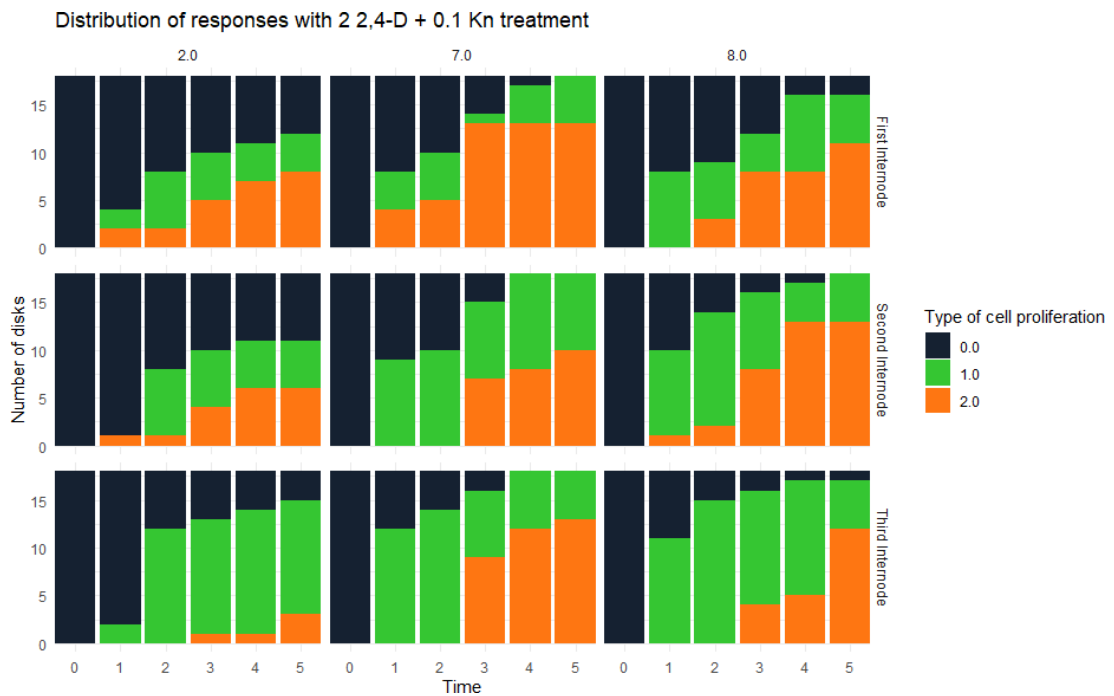


Figure 11. Evolution of friable and non-friable responses in treatment 2 mg L^{-1} of 2,4-D + 0.1 mg L^{-1} of Kn, in genotypes 2, 7 and 8, during the 5 evaluations (0=0 days, 1=7 days, 2=14 days, 3=28 days, 4=35 days and 5=45 days).



Figure 12. Photographs of different shoots used in the trial, most of which thin layer discs showed a response, regardless of genotype and internode used at 35 days.

At 35 days after pretreatment, in the 0.1 mg L^{-1} of 2,4-D + 2 mg L^{-1} of Kn treatment, genotype 7 had more non-friable responses in thin layered discs from the third internode compared to discs from the second internode. In general, for all genotypes, discs from the first internode did not react to the 0.1 mg L^{-1} of 2,4-D + 2 mg L^{-1} of Kn treatment (Fig. 14). At 45 days, it was observed that most of the responses observed at week 5 were maintained (Fig. 15). At the end of the experiment, it could be observed that thin layered discs from the first internode presented a faster response and a greater amount of biomass formed, even with a considerably smaller explant size compared to thin layered discs from other zones, regardless of the genotype and treatment used (Fig. 16).

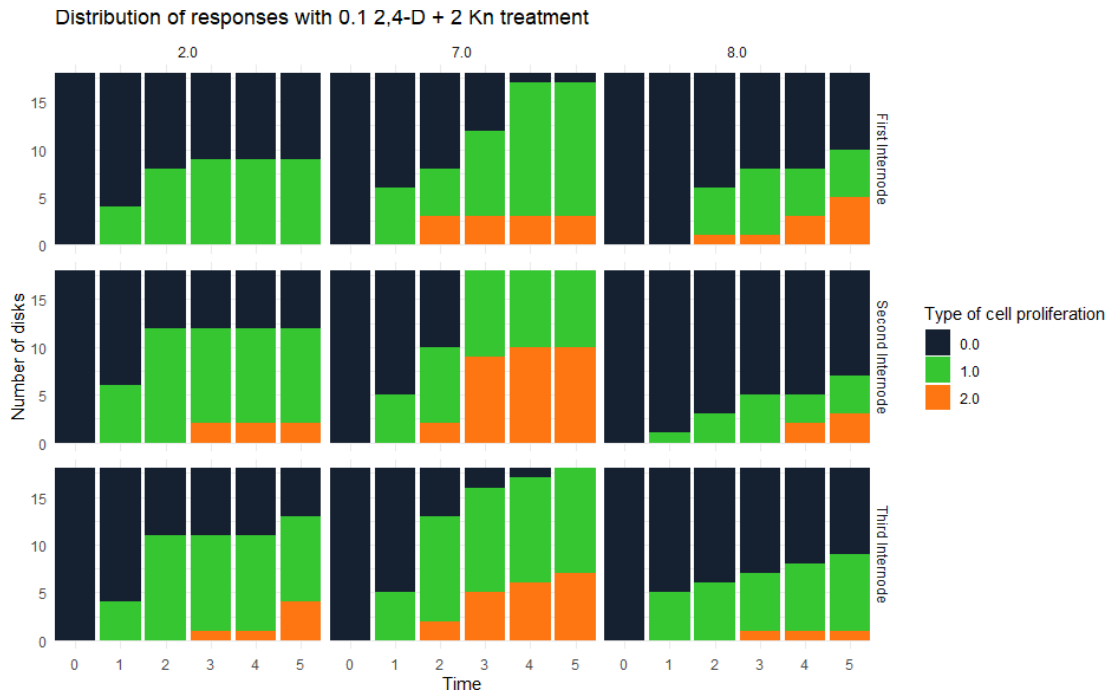


Figure 13. Evolution of friable and non-friable responses in treatment 0.1 mg L⁻¹ of 2,4-D + 2 mg L⁻¹ of Kn, in genotypes 2, 7 and 8, during the 5 evaluations (0=0 days, 1=7 days, 2=14 days, 3=28 days, 4=35 days and 5=45 days).

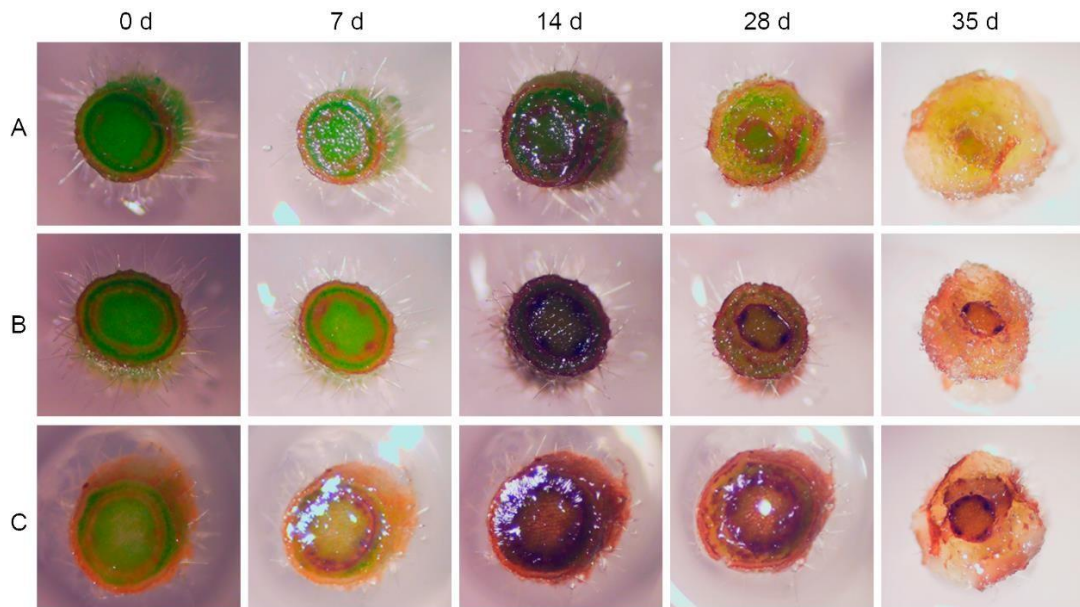


Figure 14. Effect of hormonal balance of an explant of the first internode (A), second internode (B) and third internode (C) of genotype 8 for 0 days (0 d), 7 days (7 d), 14 days (14 d), 28 days (28 d) and 35 days (35 d), with 2 mg L⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ of Kn.

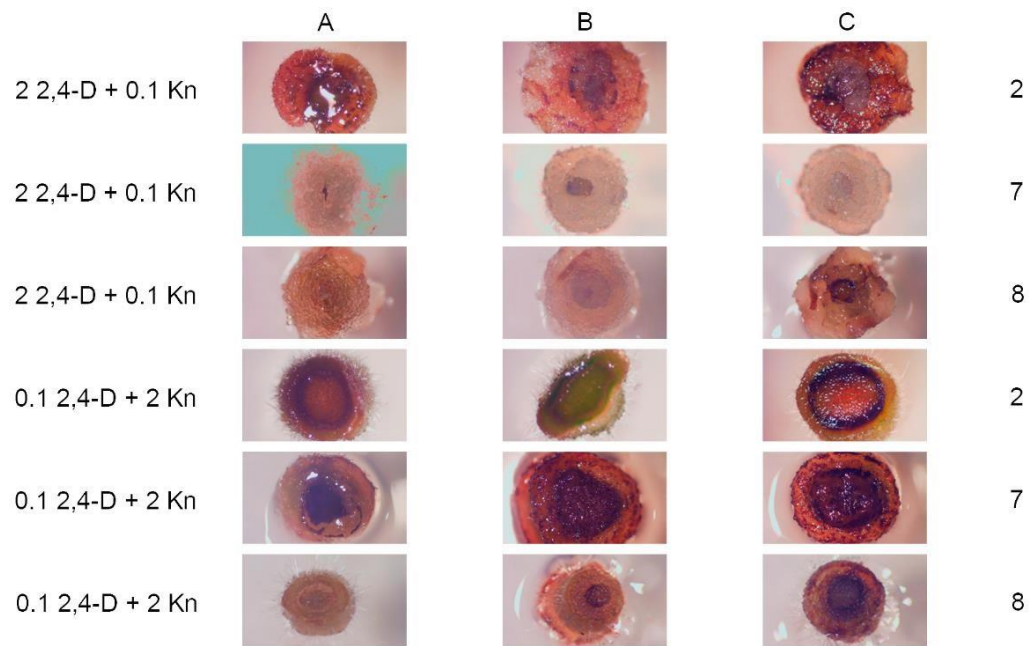


Figure 15. Photographs of cell proliferation of thin layer discs of the first internode (A), second internode (B) and third internode (C) of genotypes 2, 7 and 8 in the two hormonal balances used of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin at 45 days.

As for the treatment 2 mg L⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ of Kn (Fig. 12), it was observed that all explant types used reacted in greater quantity, showing both friable and non-friable response. However, it was observed that thin layered discs from the first internode showed the highest amount of friable responses, followed by discs from the second internode and, finally, from the third internode. With respect to the treatment 0.1 mg L⁻¹ of 2,4-D + 2 mg L⁻¹ of Kn (Fig. 14), it was observed that the thin layer discs of the second internode showed the highest number of friable responses for any genotype, while no clear trend was shown for non-friable response. In general, the pattern of non-friable or no response given by treatment remained constant for all genotypes.

2.3.3. Cytological characterization of cell cultures

Subsequently, 45 days after pretreatment, cell cultures were established. 2 weeks after subculture establishment and fine cell culture, different cellular structures were observed. In cell cultures of the first internode of genotype 2, elongated cells were observed. The cytoplasm was peripheral and there was evidence of cell lysis (Fig. 17 A1 and A3). On the contrary, in genotype 8, cultures from the first internode showed a greater presence of oval or circular cells, which tended to group together (Fig. 19 A). On the other hand, genotype 7 cultures showed a mixture of both types of cells, with the presence of some deformed cells (Fig. 18 A1 and A3). Cultures of the second internode of genotype 2 showed rounded cells with a tendency to group together and elongated cells forming chains. Cell lysis was also evident (Fig. 17 B2 and B3). This pattern was repeated in cultures of genotypes 7 and 8, with more defined cells and without cell lysis (Fig. 18 B and 19 B). Regarding the cultures of the third internode for genotype 2, an increase in the number of rounded cells and elongated cells in division was observed (Fig. 17 C1). The same for genotype 7 (Fig. 18 C). Finally, genotype 8 cultures showed cells with a greater tendency to agglomerate and divide and in greater quantity than the previous genotypes (Fig. 19 C).

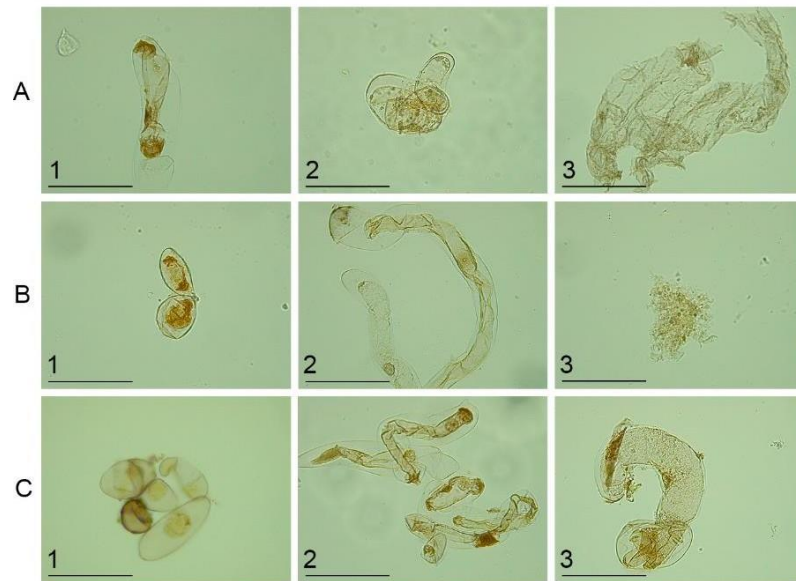


Figure 16. Microscopy photographs of an aliquot of cell cultures from each flask with thin layer discs of the first internode, second internode, and third internode at 4 weeks in shaking and darkness at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ of genotype 2. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode. Scale 100 μm .

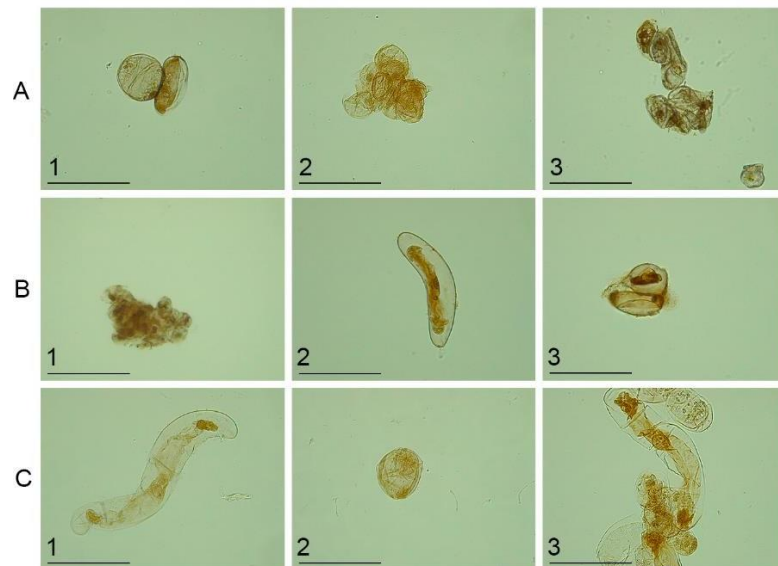


Figure 17. Microscopy photographs of an aliquot of cell cultures from each flask with thin layer discs of the first internode, second internode, and third internode at 4 weeks in shaking and darkness at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ of genotype 7. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode. Scale 100 μm .

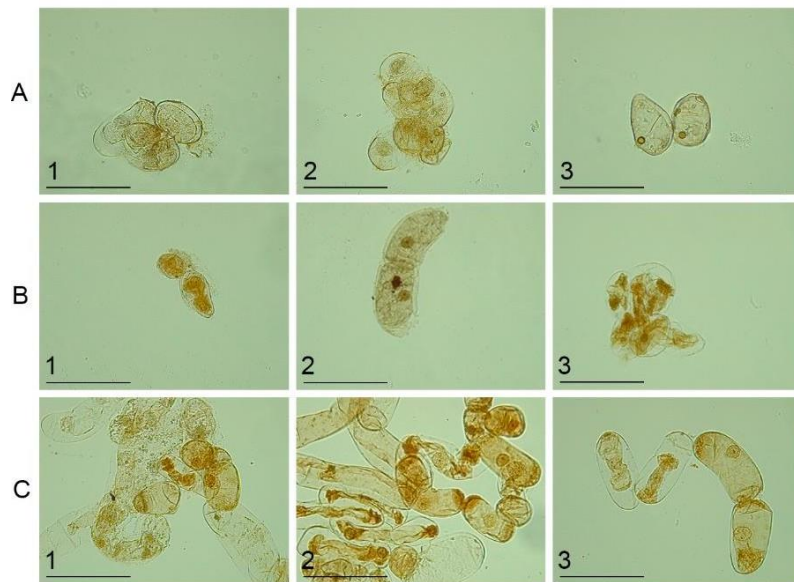


Figure 18. Microscopy photographs of an aliquot of cell cultures from each flask with thin layer discs of the first internode, second internode, and third internode at 4 weeks in shaking and darkness at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ of genotype 8. A. First internode. B. Second internode. C. Third internode. Scale 100 μm .

2.4. DISCUSSION AND CONCLUSION

This research allowed the characterization of the morphology of three different genotypes of *boldo* cultivated *in vitro*, to then establish a protocol for the optimal generation of cell proliferation to initiate cell cultures and identify the different cells that conform it by means of the thin cell layer technique. In this study, the thin cell layer technique is used to induce cell proliferation from *boldo* cambium meristematic cells (CMC) in semi-solid medium. This technique is characterized as more complicated than the common cut due to its diminutive size, between 1 and 2 mm; however, it is simpler than isolating an apical meristem. The cross section is preferable when the objective of the study is focused on observing the morphological characteristics of the species in different sections of the plant. In addition, it has the advantage that the explant is in direct contact with the culture medium and can be performed repeatedly on the same shoot. The thin layer technique has been used in several protocols being mainly used for multiplication in tissue culture (Teixeira da Silva y Dobránszki 2014).

The anatomy of the shoots of *boldo* genotypes allowed us to observe differences in tissular organization and differentiation among the three internodes. The first internode is characterized by little tissue differentiation and a greater proportion of interfascicular cambium. In the second internode, secondary growth begins to develop, evidenced by the decrease of the interfascicular cambium zone, the appearance of vascular cambium in isolated areas of the shoot and the thickening of the cell walls. In the third internode, the vascular cambium is in periclinal division around the entire shoot cylinder with lignified cells.

Based on shoot anatomy, the cell proliferation response in thin layer explants was explored, specifically in relation to the difference between friable and non-friable responses. At 7 days after pretreatment, the thin layer discs exhibit various color scales, initially attributed to the oxidation of the plant material in the intra- and interfascicular cambium zone. After 14 days, the responses of the thin layer discs progressively increase

and are similar, starting with non-friable responses that transformed into friable ones. At 28 days after pretreatment, a marked increase in proliferation of thin layered discs is observed. At 35 days after pretreatment, a less evident increase in explants with friable responses was observed, establishing this as a cutoff time suitable for further investigation. There is a common pattern in all three genotypes: thin layered discs from the first internode are the first to show a friable response with lighter coloration, followed by discs from the second internode and finally from the third internode.

The friable response showing characteristic transparent or whitish cell proliferation, colors and textures are attributed to cambium meristematic cells (CMC) (Ye 2002, Yun *et al.* 2012, Moon *et al.* 2015, Zhou *et al.* 2015, Ochoa-Villarreal *et al.* 2016, Trehan *et al.* 2017). Friable responses originate from the vascular cambium and extend to the epidermis. They originate from the cells of the interfascicular and fascicular cambium, which stain purple with toluidine due to the presence of primary walls. On the other hand, the non-friable response comes from parenchymal cells, which stain blue due to the presence of secondary walls using toluidine blue staining (Moon *et al.* 2015, Partap *et al.* 2022). The greatest CMC response is associated with initial explants with a small pith size for optimal vascular cilium cell reaction. In addition, the shoots of genotypes 7 and 8 that present greater friable responses are similar to those described by Guerra *et al.* (2023), who used treatments with 4.44 μM of BAP in *boldo* nodal explants for shoot regeneration, obtaining shoots of 5.9 cm in height. The use of BAP and/or some other cytokine could be a contributing factor to achieve greater growth of the initial shoot from which to extract the thin layer discs. The use of MS medium supplemented with BAP has already been tested in regeneration protocols in other species, proving to be superior to other cytokines (Khatri *et al.* 2019). Additionally, some *in vitro* shoot homogenization technique could be considered for established explants to reduce variability within growth chambers.

As for the treatments, the one that achieved the highest number of friable responses was the treatment 2 mg L⁻¹ of 2,4-D + 0.1 mg L⁻¹ of Kn. Thin layer discs from the first

internode had the highest number of friable responses, followed by discs from the second internode, and finally those from the third internode. Similar protocols have been reported for CMC induction in other woody species by auxin addition. CMC cell cultures of *Panax ginseng* have been successful using MS supplemented with 2.0 mg L⁻¹ IAA (Jang *et al.* 2012). Similarly, for *Tripterygium wilfordii*, induction and separation of CMC cells was achieved using concentrations of 2.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 2.0 mg L⁻¹ NAA and 3% sucrose (Song *et al.* 2019). The use of auxin is essential for CMC induction, as it regulates the formation of the cambial zone and the translocation of nutrients and minerals between the xylem and phloem (Smetana *et al.* 2019). Likewise, cytokinin utilization influences cambial cell division (Miller *et al.* 1955). The combined use of both hormones is essential for the correct induction and proliferation of CMCs. Similar studies have described that the response of CMCs could be more influenced by higher levels of auxins than cytokinins, while for DDCs it would be the opposite, needing more cytokinins than auxins. Similarly, it was observed that auxin and cytokinin levels could influence the physical characteristics of CMCs, such as their transparency and color (Moon *et al.* 2015). The possibility is raised that the response pattern may change when using different phytohormones and/or concentrations in the induction and multiplication medium, as well as varying response times.

In cell cultures of the first internode of genotype 2, elongated cells with a dominant vacuole were observed, causing displacement of the cytoplasm and evidence of cell lysis. In contrast, in genotype 8, the cells were oval and tended to clump together. Genotype 7 showed a mixture of both cell types, but the elongated cells appeared less susceptible to deformation. Similarly, the non-deformation of globular cells and their resistance to shearing in liquid culture seems to confirm the high resistance of CMCs described by Partap *et al.* (2022). In the second internode of genotype 2, agglomerated oval cells and elongated dividing cells were observed, with evidence of cell lysis. This pattern was repeated in genotypes 7 and 8, but with more defined cells. In the third internode of genotype 2, there was a decrease in circular cells and an increase in dividing elongated

cells. Genotype 7 maintained both cell types, while genotype 8 showed cells with a greater tendency to agglomerate and divide. It is important to know that cell morphology in suspension cultures can be altered by the auxins used in the liquid medium obtaining, for example, globular isometric cells in the presence of 2,4-D tending to cell division but not separation, or alternatively, more elongated cells using NAA (Reinert y Yeoman 2012). Characterization with other methods or in the presence of a broad spectrum of auxins in conjunction with cytokinins plays a fundamental role. Regarding the presence of cell aggregates, although pectinase was used as a strategy to avoid agglomeration and to obtain a fine and homogeneous cell culture, there was a high quantity in both cell types. It is important to remember that the presence of cell aggregates is necessary to achieve cell biomass growth and that, in some species such as strawberry, a greater amount of aggregates leads to a greater production of specialized metabolites (Hulst *et al.* 1989, Edahiro y Seki 2006).

In conclusion, this study provides a detailed understanding of the dynamics of friable and non-friable responses in thin shell explants, highlighting the influence of genetic and hormonal factors on this process, in addition to a macro-observation of the level of cellular organization. in shoots of different genotypes of *P. boldus*. A 3-day cold pretreatment of explants and culture medium based on ½ MS was used, with hormonal balance using 2 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 0.1 mg L⁻¹ of kinetin. Promotes cell proliferation initiated from undifferentiated cells identified as cambium meristematic cells (CMC), characterized by a globular morphology, color, texture and resistance to liquid culture. Being induced mainly and most efficiently from thin layer discs of the first and second internodes of shoots with lower marrow/cortex ratio values, without the presence of vascular cambium. Facilitating management and cultivation. Being optimal explants for the establishment of cell cultures and the sustainable extraction of specialized metabolites

2.5. CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

2.6. ACKNOWLEDGMENTS

The senior author is grateful for the support of postdoc Adrián Garrido Bigotes for his advice, as well as to Dr. Rosy Isaias and her team at the Plant Anatomy Laboratory of the Instituto de Ciências Biológicas of the Universidade Minas Gerais for their collaboration during the internship. Finally, the Instituto Forestal de Chile (INFOR) for providing the necessary resources during the research.

2.7. DATA AVAILABILITY

Not applicable

2.8. FUNDS

This research was carried out as part of the FONDEF project ID ID21I10386 “Implementación de una plataforma biotecnológica para la producción sostenible de boldina.” Under the Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnología (CONICYT) and jointly executed by the Instituto Forestal de Chile and the Laboratorio de Epigenética Vegetal of the University of Concepción, Chile.

Capítulo 3. PERFIL HISTOQUÍMICO DE CULTIVOS CELULARES OBTENIDOS A PARTIR DE DISCOS DE CAPA FINA DE *Peumus Boldus* MOL. CULTIVADO *IN VITRO*

3.1. INTRODUCCIÓN

La investigación en torno a la composición química y la producción de metabolitos secundarios en *Peumus boldus* Mol. (*Monimiaceae*), ha sido objeto de interés debido a sus propiedades medicinales (Speisky y Cassels 1994, Luebert y Pliscoff 2006, Rodriguez *et al.* 2018). Esta especie, originaria del centro y sur de Chile, ha sido ampliamente sobreexplotada debido a la boldina, un alcaloide con alto poder antioxidante al que se le atribuyen las propiedades medicinales del *boldo*, esta se encuentra principalmente en la corteza y las hojas, representando del 12 al 19% del contenido total de alcaloides (Hulle 1983, Benedetti y Barros 2018, Poblete *et al.* 2023). Otras investigaciones, debido a la importancia farmacológica del *boldo*, han identificado la presencia de diversos compuestos, como alcaloides, flavonoides, fenoles y terpenos en sus tejidos (Schmeda-Hirschmann *et al.* 2003, Quezada *et al.* 2004, O'Brien *et al.* 2006, Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann 2010). Para su identificación, se han empleado técnicas analíticas e histológicas, destacando la histoquímica como una herramienta para detectar la distribución de metabolitos en tejidos vegetales (Guedes *et al.* 2022, Guedes *et al.* 2024).

El cultivo de células vegetales se ha convertido en una herramienta fundamental para la industria farmacéutica y la biotecnología. Los cultivos de células desdiferenciadas (DDC) son especialmente convenientes para la producción a gran escala de productos naturales (Mustafa *et al.* 2011), ya que proporcionan condiciones de crecimiento homogéneas que permiten la optimización de procesos, acelerando la producción y ofreciendo una fuente renovable de material vegetal para productos naturales (McCoy y O'Connor 2008, Fischer *et al.* 2015, Sood 2020). Sin embargo, lograr este proceso de desdiferenciación impulsa cambios nocivos debido a modificaciones genéticas y epigenéticas en las células, lo que

resulta en cultivos en suspensión con bajas tasas de crecimiento y rendimientos deficientes (Ochoa-Villarreal *et al.* 2015).

Para superar estas limitaciones, se prefiere aislar y cultivar células meristemáticas cambiales (CMC), que han mostrado tasas de crecimiento superiores y una mejor respuesta a los elicitores (Lee *et al.* 2010). Los cultivos celulares compuestos por CMC se han convertido en un sistema de estudio para entender la biosíntesis y acumulación de metabolitos secundarios (Partap *et al.* 2022). Las investigaciones indican que la aplicación de elicitores como el metil jasmonato y la tirosina en cultivos de células vegetales puede aumentar la producción de una variedad de metabolitos secundarios, activando rutas metabólicas específicas (Croteau *et al.* 2006, Xiao *et al.* 2009, Sadeghnezhad *et al.* 2019). Sin embargo, la reacción de los cultivos celulares a los elicitores es compleja y puede variar según las condiciones de cultivo y los mecanismos metabólicos implicados.

Otra alternativa para generar cultivos celulares es utilizar células meristemáticas presentes en el meristemo apical del brote y de la raíz. Sin embargo, el aislamiento, cultivo y manejo de estas fuentes se dificulta debido a que su densidad se limita 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 o capa de células delgadas (*thin cell layer*, TCL) surge como solución a un método de extracción de un explante primario. Se puede realizar longitudinalmente (lTCL) o transversalmente (tTCL) en diferentes tipos de órganos vegetales. De esta manera, se obtienen cortes compuestos por pocas capas de células, lo que permite un mayor contacto con el medio de cultivo y reduce el contacto entre órganos, manteniendo así una mínima interacción entre tejidos y células (Duong Tan *et al.* 2003, Teixeira da Silva y Dobránszki 2014). Debido a esto, la utilización de discos de capa fina transversales cercanos al meristema apical podría resolver la limitación de densidad (Duong Tan *et al.* 2003, Teixeira da Silva y Dobránszki 2014).

Los cultivos meristemáticos de *boldo* podrían contener una diversidad de metabolitos secundarios debido a la alta concentración de estos compuestos en el tejido del *boldo*,

incluyendo la boldina (Hulle 1983, Schmeda-Hirschmann *et al.* 2003, Quezada *et al.* 2004, Simirgiotis y Schmeda-Hirschmann 2010). No obstante, aún no se ha investigado la distribución de metabolitos en células meristemáticas bajo la influencia de elicitores en cultivos celulares, lo que representa un campo de investigación exploratorio para dilucidar la biosíntesis y las vías metabólicas de los metabolitos secundarios. Por ende, el objetivo de esta investigación es contrastar a nivel histoquímico la respuesta a la elicitación de los cultivos celulares obtenidos de discos de capa fina de diferentes internodos de microplantas de tres genotipos de *P. boldus*.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Origen del material vegetal

El material vegetal consistió en el genotipo 7 de *Peumus boldus* (Mol.) cultivados *in vitro*. Los explantes para cada sección se dividieron en: primer internodo, segundo internodo y tercer internodo.

3.2.2. Preparación de las muestras

La unidad experimental correspondió a brotes de longitud 4 cm del genotipo 7. Como explantes se utilizaron discos de capa fina realizados con una hoja de cuchilla afilada, dispuestos horizontalmente en el medio de cultivo manteniendo su orientación. Se establecieron 6 placas, estas contuvieron tres tipos de explantes con tres repeticiones cada uno, se dividieron en: primer internodo, segundo internodo y tercer internodo. Este proceso se realizó en cámara de flujo laminar desinfectada con etanol al 70% y esterilizada por 1 h bajo luz UV. Todos los materiales utilizados fueron esterilizados en autoclave a 1 atm y 121°C por 30 min.

3.2.3. Condiciones de cultivo

Los explantes fueron dispuestos en medio de cultivo que consistió en ½ de MS (Murashige y Skoog 1962), con un balance hormonal 2 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) + 0,1 mg L⁻¹ de kinetina (Kn), además de 30 g L⁻¹ de sacarosa, 500 mg L⁻¹ de PVP, 0,35% (p/v) de agar y pH 5,7. Las réplicas estuvieron bajo pretratamiento por 3 días a 4°C. Posteriormente al pretratamiento, las 6 réplicas se trasladaron a una cámara de crecimiento a 22 ± 2°C y fotoperiodo de 24 h de oscuridad por 6 semanas.

3.2.4. Análisis macromorfológico de las respuestas de proliferación celular

Se realizaron análisis macromorfológicos el día 0, 28 y 35 días después de iniciado el crecimiento en oscuridad, evaluando los tres tipos de explantes de cada réplica del ensayo. Esta evaluación consistió en un análisis visual en lupa (Olympus SZ61) en la cual se asoció

el tipo de respuesta de la proliferación celular a un nivel de codificación y se registró. No se consideraron discos sin respuesta. Las codificaciones corresponden a: respuesta friable en el primer internodo “A1”; respuesta no friable en el primer internodo “A2”; respuesta friable en el segundo internodo “B4”; respuesta no friable en el segundo internodo “B5”; respuestas friable y no friable en el segundo internodo “B6”; respuesta friable en el tercer internodo “G7”; respuesta no friable en el tercer internodo “G8”; respuestas friable y no friable en el tercer internodo “G9”.

3.2.5. Establecimiento de cultivos celulares a partir de discos de capa fina

Para establecer los cultivos celulares, se prepararon 8 matraces para el primer cultivo. Se usó un medio de cultivo líquido que consistió en ½ de MS, con un balance hormonal 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético + 0,1 mg L⁻¹ de kinetina, además de 30 g L⁻¹ de sacarosa, 500 mg L⁻¹ de PVP, y pH 5,7. Se utilizaron como inóculo las 6 réplicas. Se utilizó un matraz de 50 mL con 5 mL de medio de cultivo líquido para cada nivel de codificación. Se colocó el disco de capa fina en el matraz correspondiente al tipo de respuesta, sin separar la proliferación celular, y se agregaron 2 µL de pectinasa a cada matraz. Los matraces se sellaron con papel de aluminio y se mantuvieron en agitación a 80 rpm en oscuridad a 22 ± 2°C. Después de 2 semanas, se realizó un subcultivo transfiriendo 2,5 mL de medio a un medio fresco control. Otros 2,5 mL de medio se transfirieron a otro matraz para evaluar la respuesta a elicitación. En los matraces control, se agregó 2,5 mL de medio MS de las mismas características. Para el tratamiento de elicitación se agregaron 0,075 mL de la hormona L-tirosina 10nM, 0,075 mL de metil jasmonato 10 nM y 2,35 mL de medio de cultivo MS. Los matraces se sellaron con papel de aluminio y se mantuvieron en agitación a 80 rpm en oscuridad a 22 ± 2°C por 2 semanas.

3.2.6. Análisis histoquímicos de los cultivos celulares

Cada matraz con 5 mL de cultivos celulares control y elicitado se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL en frío por 2 semanas. Cada cultivo celular contenido en los tubos Falcon

se dividió en 100 μ L y se transfirieron a tubos cónicos de 2,5 mL. Se utilizó una alícuota de cada cultivo celular y se sometieron a diferentes pruebas histoquímicas (Tabla 1). Se compararon con alícuotas sin teñir usadas como blanco comparativo.

Tabla 1 Pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares

Metabolitos	Reactivo	Método	Color	Referencia
Alcaloides	Dragendorff	Reactivo de Dragendorff durante 15 min, lavar en nitrato sódico al 5%	Naranja	(Johansen 1940)
Almidón	Lugol	Solución de yoduro de potasio al 1% durante 5 min	Granos negros	(Johansen 1940)
Compuestos fenólicos	Cloruro de hierro	Solución de cloruro de hierro al 10% durante 5 min	Negro/marrón	(Johansen 1940)
Flavonoides	DMACA	Fijación: Benzoato sódico de cafeína al 0,5% en butanol al 90% durante 5 min Reacción: 1% p-dimetilaminocinamaldehído durante 2 h	Magenta o azul	(Feucht <i>et al.</i> 1986)
Sustancias lipofílicas	Sudan III	Solución saturada de sudán III en etanol 70% durante 5 min.	Naranja	(Brundrett <i>et al.</i> 1991)
Proteínas	Azul de mercurio de bromofenol	Solución de azul de bromofenol durante 15 min, lavado en ácido acético al 5% durante 20 min y lavado en agua destilada durante 15 min	Precipitados azules	(Baker 1958)
Terpenoides	NADI	1% de α -naftol y 1% de dimetil-p-fenilendiamina en solución tampón fosfato, pH 7,2 durante 1 h 30 min	Azul	(David y Carde 1964)

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Análisis histoquímicos de los cultivos celulares

No hubo diferencias entre el control y los cultivos celulares elicitados para el tratamiento A1. Tanto en el tratamiento A1 como en A2 no se detectaron compuestos fenólicos ni proteínas. Para el tratamiento A2, tanto el control como los cultivos elicitados resultaron positivos para alcaloides y flavonoides. Sin embargo, la elicitación promovió la acumulación de almidón y lípidos en los cultivos celulares, pero inhibió la acumulación de terpenoides (Tabla 2). Además, el almidón y los lípidos se detectaron en cultivos con proliferación friable, a diferencia de cultivos con respuesta no friable. Los metabolitos detectados se acumulan fundamentalmente en el citoplasma y núcleo (Fig. 20), excepto por los terpenoides que se detectaron en el citoplasma y la vacuola.

Tabla 2 Resultados de pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares del primer internodo. + reacción positiva, -reacción negativa

Prueba histoquímica	Matraz			
	A1		A2	
	Control	Elicitado	Control	Elicitado
Alcaloides	+	+	+	+
Almidón	+	+	-	+
Compuestos fenólicos	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+
Sustancias lipofílicas	+	+	-	+
Proteínas	-	-	-	-
Terpenoides	+	+	+	-

Cultivo A1 formado a partir de proliferaciones friables. Cultivo A2 formado a partir de proliferaciones no friables.

Para los cultivos celulares B4, B5 y B6, se observaron respuestas positivas de alcaloides (Tabla 3) y se detectaron en el núcleo y citoplasma (Fig. 21). No se detectó la presencia de compuestos fenólicos ni proteínas. Se detectó la presencia de almidón (Fig. 23) y flavonoides en el citoplasma, y para terpenoides la reacción fue positiva en las vacuolas y citoplasma. La elicitación inhibió la acumulación de terpenoides (Tabla 3). La presencia de almidón se repitió para los cultivos con proliferación friable (Tabla 3).

Tabla 3 Resultados de pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares del segundo internodo. + reacción positiva, -reacción negativa

Prueba histoquímica	Matraz					
	B4		B5		B6	
	Control	Elicitado	Control	Elicitado	Control	Elicitado
Alcaloides	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	-	-	+	-
Compuestos fenólicos	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	-	-
Sustancias lipofílicas	-	-	+	+	-	-
Proteínas	-	-	-	-	-	-
Terpenoides	+	-	+	-	+	-

Cultivo B4 formado a partir de proliferaciones friables. Cultivo B5 formado a partir de proliferaciones no friables. Cultivo B6 formado a partir de proliferaciones friables y no friables.

Los cultivos celulares identificados como G7, G8 y G9 comparten respuestas positivas para la presencia de alcaloides en el citoplasma y núcleo (Fig. 22), almidón (Fig. 23) y flavonoides solo en el citoplasma. La elicitación promovió la acumulación de almidón (Tabla 4). No se detectaron terpenoides, proteínas, ni compuestos fenólicos. Siendo, solo G7 control, positivo para terpenoides (Tabla 4) en vacuolas y citoplasma. En general, todos los cultivos celulares muestran resultados positivos para alcaloides, principalmente en el citoplasma y el núcleo (Fig. 20, 21 y 22).

Tabla 4 Resultados de pruebas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de metabolitos en los cultivos celulares del tercer internodo. + reacción positiva, -reacción negativa

Prueba histoquímica	Matraz					
	G7		G8		G9	
	Control	Elicitado	Control	Elicitado	Control	Elicitado
Alcaloides	+	+	+	+	+	+
Almidón	+	+	-	+	-	+
Compuestos fenólicos	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	+	+
Sustancias lipofílicas	-	-	+	+	-	+
Proteínas	-	-	-	-	-	-
Terpenoides	+	-	-	-	-	-

Cultivo G7 formado a partir de proliferaciones friables. Cultivo G8 formado a partir de proliferaciones no friables. Cultivo G9 formado a partir de proliferaciones friables y no friables.

Los cultivos celulares elicitados muestran un leve aumento de intensidad de color referente a los cultivos control (Fig. 20, 21 y 22). Se identificaron la presencia de núcleo, vacuola, citoplasma, membrana plasmática y pared celular. No se observó la presencia de mitocondrias ni de retículo endoplasmático, ni de otros orgánulos más especializados. Sin embargo, se confirmó la presencia de diferentes tipos de plastos: leucoplastos, cloroplastos y cromoplastos (Fig. 23).

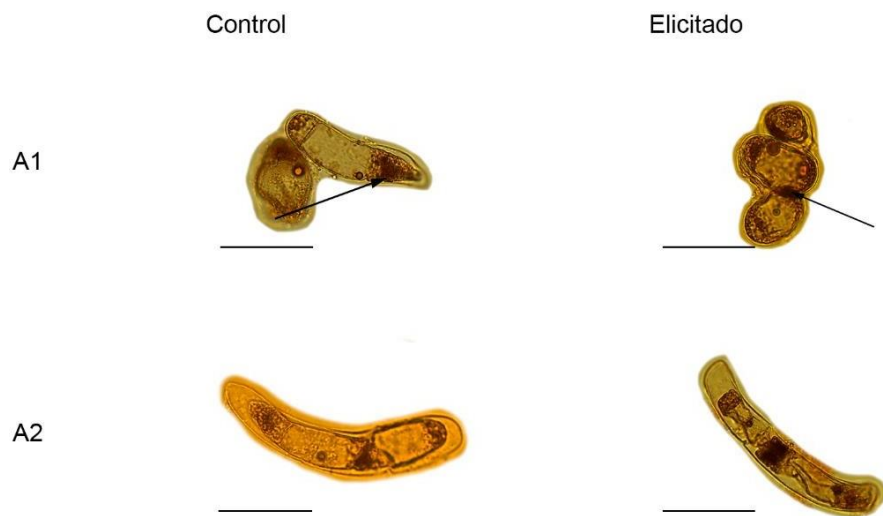


Figura 19. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación A1 y A2, control y elicitadas, teñidas con reactivo Dragendorff para visualización de alcaloides. Escala 50 μ m. Flechas señalan el color positivo.

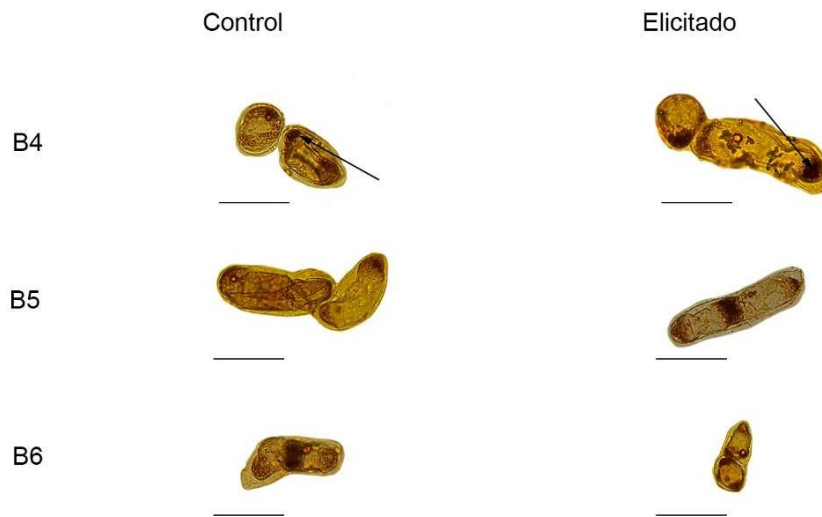


Figura 20. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación B4, B5 y B6, control y elicidadas, teñidas con reactivo Dragendorff para visualización de alcaloides. Escala 50 μ m. Flechas señalan el color positivo.

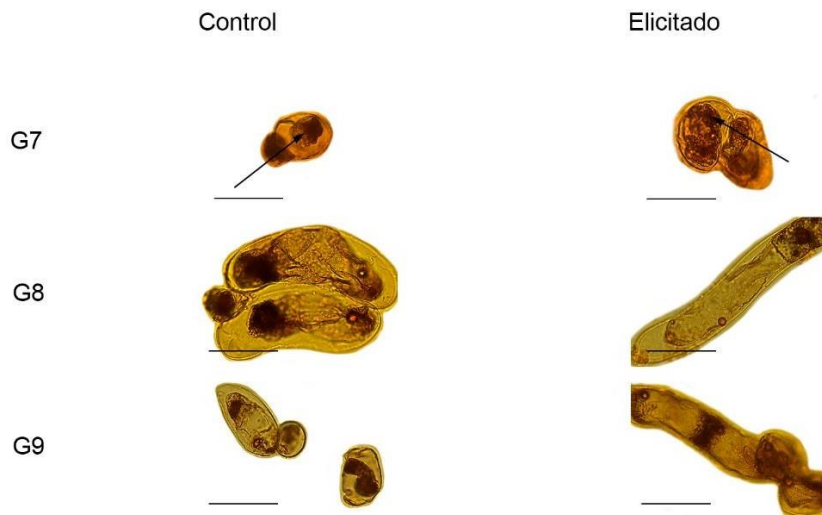


Figura 21. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación G7, G8 y G9, control y elicitadas, teñidas con reactivo Dragendorff para visualización de alcaloides. Escala 50 μ m. Algunas flechas señalan el color positivo.

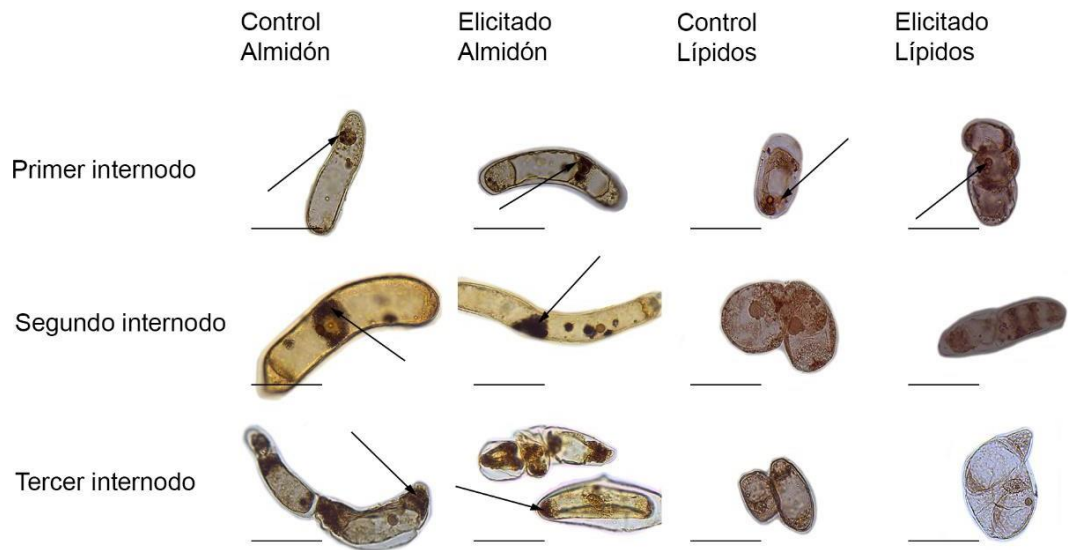


Figura 22. Microscopía de células del cultivo celular correspondiente a codificación A1 del primer internodo, B4 del segundo internodo y G7 del tercer internodo, control y elicitadas, teñidas con reactivo Lugol y Sudán III para visualización de almidón y sustancias lipídicas.

3.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La presencia de diferentes metabolitos secundarios, como alcaloides, flavonoides, fenoles y terpenos, ha sido reportada previamente en órganos aéreos de *P. boldus*, los cuales contribuyen a una alta capacidad antioxidante responsable de las propiedades medicinales del boldo (Speisky y Cassels 1994, Schmeda-Hirschmann *et al.* 2003, Quezada *et al.* 2004). Para dilucidar la composición química del boldo se han utilizado tanto técnicas analíticas como histológicas. En este sentido, la histoquímica es una valiosa herramienta que permite detectar la presencia y acumulación de metabolitos en tejidos y células vegetales. Por ejemplo, con técnicas histoquímicas, Guedes *et al.* (2023) determinaron la presencia de proteínas, azúcares reductores, almidón, lípidos, fenoles, flavonoles y terpenos en los tallos de boldo. La mayoría de estos metabolitos se acumulan en la médula, radios parenquimáticos, floema y corteza. Además, se detectaron terpenos y lípidos en las células del súber.

Los cultivos celulares compuestos por CMC han sido utilizados por lograr una mayor acumulación y producción de diversos metabolitos secundarios (Moon *et al.* 2015, Zhou *et al.* 2015, Moon *et al.* 2017, Song *et al.* 2019). La utilización de elicitores como el metil jasmonato contribuye al incremento en la producción de estos metabolitos, especialmente aquellos derivados de la vía de los fenilpropanoides (D'Onofrio *et al.* 2009). Además, la tirosina se emplea como precursor en la síntesis de la mayoría de los alcaloides presentes en el boldo (O'Brien *et al.* 2006, Cassels *et al.* 2019). Los análisis histoquímicos muestran que la adición de metil jasmonato y tirosina al medio de cultivo produce cambios en la dinámica de acumulación de almidón, lípidos y terpenos.

A pesar de que el metil jasmonato y la tirosina son promotores de la síntesis de compuestos fenólicos (Hu *et al.* 2014, Sadeghnezhad *et al.* 2019), la prueba histoquímica para fenoles solubles no detectó la presencia de estos compuestos en los cultivos celulares. Además, la ausencia de fenoles en los cultivos no elicitados indica que algún otro factor exógeno pudo inhibir la síntesis de fenoles solubles. Aunque se detectaron flavonoides tanto en los

cultivos tratados como en los no tratados, parece que el metil jasmonato no indujo una respuesta positiva en cuanto a la producción del grupo de fenoles. Sin embargo, la limitación de los estudios histoquímicos a una caracterización cualitativa no permite concluir al respecto, por lo que se necesitan estudios cuantitativos que confirmen si las concentraciones y perfiles de flavonoides fueron modificados por los elicitores metil jasmonato y tirosina.

Todas las células obtenidas a partir de los cultivos celulares producidos a partir de callos de internodos de tallos de plántulas *in vitro* de *P. boldus* acumulan alcaloides, independientemente de si fueron elicitadas o no. Sin embargo, no se detectaron en ningún cultivo celular fenoles y proteínas, que son sustancias constitutivas del boldo. Además, la acumulación de terpenoides estuvo afectada por la respuesta del callo, ya que, en las células provenientes de una respuesta no friable, la elicitación con tirosina y metil jasmonato inhibió la síntesis y acumulación de este metabolito. Los resultados sugieren que, en los cultivos celulares derivados de callos no friables, la elicitación con metil jasmonato y tirosina tiende a causar una inhibición o estimulación en la síntesis de compuestos. Además, es posible que la presencia de células desdiferenciadas por sobre las células indiferenciadas, lo que compone un cultivo de células heterogéneas, haya impuesto restricciones metabólicas, lo que provoca diferencias de acumulación de metabolitos entre los tipos de callos (Lee *et al.* 2010, Moon *et al.* 2015). Por otra parte, en los cultivos celulares donde se suprimió la síntesis de terpenos, se elicó la síntesis de almidón (tratamientos A2 G8 y G9) y lípidos (tratamiento A2). Esto podría deberse a la competencia entre rutas metabólicas promovida por la aplicación de metil jasmonato (James *et al.* 2013, Sadeghnezhad *et al.* 2020). Es probable que, en determinadas condiciones *P. boldus* inhiba la síntesis de terpenoides en favor de la producción de sustratos energéticos, como es el caso del almidón y los lípidos.

La efectividad del metil jasmonato en la producción de alcaloides ha sido ampliamente demostrada. Por ejemplo, la aplicación del elicitador metil jasmonato en suspensiones

celulares de CMC de *Taxus cuspidata* aumentó la producción de paclitaxel en un 14,000 % en comparación con un 220 % y un 433 % en cultivos en suspensión de DDC derivados de acículas o embriones (Lee *et al.* 2010). También se ha estudiado en cultivos de células de *Catharanthus roseus* (Rischer y Oresic 2006, Moon *et al.* 2015) y *Nicotiana tabacum* (De Sutter *et al.* 2005, Gális *et al.* 2006). A diferencia de otros metabolitos, en los cultivos celulares sin elicitación, independientemente de si provienen o no de un callo friable, hay una acumulación de alcaloides. Estos resultados indican que esta vía metabólica en el boldo no está restringida bajo ninguna condición hormonal evaluada, probablemente debido a las múltiples funciones de los alcaloides en respuesta al estrés biótico y abiótico. Aunque la elicitación con metil jasmonato y tirosina podría haber tenido un efecto positivo, no se pudo observar una diferencia notoria en la acumulación de alcaloides en los cultivos tratados con elicitores. Planteamos el uso de otro tipo de elicitores para próximas investigaciones, como la exposición a luz ultravioleta, dado que estas células CMC se caracterizan por la sobreexpresión de genes responsables de la respuesta al estrés ambiental (Rando 2007).

En conclusión, el estudio histoquímico de los cultivos celulares de CMC de boldo revela una organización celular caracterizada por la presencia de organelos básicos como el núcleo, vacuola, citoplasma, membrana plasmática y pared celular, pero una ausencia de organelos más especializados como las mitocondrias. La presencia de plastidios, principalmente leucoplastos y cromoplastos, sugiere un estado de indiferenciación celular en concordancia con el origen de los cultivos. La investigación sobre la composición química del boldo y la manipulación de cultivos celulares ha revelado importantes aspectos sobre la síntesis y acumulación de metabolitos primarios y secundarios. Mientras que el metil jasmonato y la tirosina han demostrado ser eficaces en la producción de metabolitos secundarios en otras especies, la vía metabólica del boldo parece ser más compleja. Los estudios histoquímicos sugieren que la respuesta de los cultivos celulares a los elicitores puede variar según la naturaleza del callo y los mecanismos metabólicos involucrados. Además, la acumulación de alcaloides parece ser independiente de la

elicitación, lo que destaca su importancia en la respuesta del boldo al estrés. Futuras investigaciones podrían explorar el uso de diferentes elicitores, como la exposición a luz UV, en conjunto con análisis cuantitativos para comprender y optimizar la producción de metabolitos de interés farmacológico.

4. REFERENCIAS

1. Baebler Š., M. Hren, M. Camloh, M. Ravnikar, B. Bohanec, I. Plaper, R. Ucman, 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.
2. Baker J.R. 1958. Note on the Use of Bromophenol Blue for the Histochemical Recognition of Protein. *Journal of Cell Science*: 459-460.
3. 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.
4. Bastien J.W. 1987. *Healers of the Andes: Kallawaya herbalists and their medicinal plants*. University of Utah Press.
5. Benedetti S., S. Barros. 2018. *Boldo* (*Peumus boldus* Mol.) Avances en la investigación para el desarrollo de modelos productivos sustentables.
6. Brundrett M.C., B. Kendrick, C.A. Peterson. 1991. Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or Fluoral Yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry* 66(3): 111-116.
7. Campbell L., S. Turner. 2017. Regulation of vascular cell division. *Journal of experimental botany* 68(1): 27-43.
8. Cassels B.K., G. Fuentes-Barros, S. Castro-Saavedra. 2019. *Boldo*, its secondary metabolites and their derivatives. *Current Traditional Medicine* 5(1): 31-65.
9. 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.
10. Croteau R., R.E. Ketchum, R.M. Long, R. Kaspera, M.R. Wildung. 2006. Taxol biosynthesis and molecular genetics. *Phytochemistry Reviews* 5: 75-97.
11. D'Onofrio C., A. Cox, C. Davies, P.K. Boss. 2009. Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates. *Functional Plant Biology* 36(4): 323-338.

12. David R., J. Carde. 1964. Histochemie-coloration differentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif NADI. Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences 258(4)
13. De Sutter V., R. Vanderhaeghen, S. Tilleman, F. Lammertyn, I. Vanhoutte, M. Karimi, D. Inzé, A. Goossens, P. Hilson. 2005. Exploration of jasmonate signalling via automated and standardized transient expression assays in tobacco cells. The Plant Journal 44(6): 1065-1076.
14. Duong Tan N., B. Le, K. Tran Van, T. Thorpe. 2003. Cell Layer Culture System: Regeneration and Transformation Applications.
15. 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.
16. Edahiro J.-i., M. Seki. 2006. Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. Journal of Bioscience and Bioengineering 102(1): 8-13.
17. 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.
18. Feucht W., P.P.S. Schmid, E. Christ. 1986. Distribution of Flavanols in Meristematic and Mature Tissues of *Prunus avium* Shoots. Journal of Plant Physiology 125(1): 1-8.
19. 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.
20. Fuentes-Barros G., S. Castro-Saavedra, L. Liberona, W. Acevedo-Fuentes, C. Tirapegui, C. Mattar, B.K. Cassels. 2018. Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (*boldo*). Fitoterapia 127: 179-185.

21. Gális I., P. Šimek, T. Narisawa, M. Sasaki, T. Horiguchi, H. Fukuda, K. Matsuoka. 2006. A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *The Plant Journal* 46(4): 573-592.
22. Gotteland M., J. Espinoza, B. Cassels, H. Speisky. 1995. Effect of a dry *boldo* extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers. *Revista medica de Chile* 123(8): 955-960.
23. 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.
24. Greb T., J.U. Lohmann. 2016. *Plant Stem Cells*. *Curr Biol* 26(17): R816-821.
25. Guedes L., E. Gavilán, C. Perez, B. Jose, N. Aguilera. 2022. Impact of the galling *Dasineura* sp. on the structural and chemical profile of *Peumus boldus* stems. *Trees*.
26. Guedes L.M., N. Aguilera, S. Torres, E. Gavilán, N. Rosales. 2024. Gall inducer *Dasineura* sp. alters the polyphenol profile and antioxidant activity of *Peumus boldus* stems. *Tree Physiology* 44(3): tpae024.
27. Guedes L.M., E. Gavilán, C. Pérez, J. Becerra, N. Aguilera. 2023. Impact of the galling *Dasineura* sp. on the structural and chemical profile of *Peumus boldus* stems. *Trees* 37(2): 545-553.
28. Guerra F., L. Badilla, R. Cautín, M. Castro. 2023. *In Vitro* Propagation of *Peumus boldus* Mol, a Woody Medicinal Plant Endemic to the Sclerophyllous Forest of Central Chile. *Horticulturae* 9(9): 1032.
29. Hu G., J.-M. Jia, D. Kim. 2014. Effects of feeding tyrosine and phenylalanine on the accumulation of phenylethanoid glycosides to *Cistanche deserticola* cell suspension culture. *Chinese journal of natural medicines* 12: 367-372.
30. Hulle V. 1983. Influence of the preparation technique on the boldine content of *boldo* dry extract. *J Pharm Belg* 38: 97.

31. Hulst A., M. Meyer, H. Breteler, J. Tramper. 1989. Effect of aggregate size in cell cultures of *Tagetes patula* on thiophene production and cell growth. Applied microbiology and biotechnology 30: 18-25.
32. James J.T., F. Tugizimana, P.A. Steenkamp, I.A. Dubery. 2013. Metabolomic analysis of methyl jasmonate-induced triterpenoid production in the medicinal herb *Centella asiatica* (L.) urban. Molecules 18(4): 4267-4281.
33. Jang M.O., E.K. Lee, Y.W. Jin. 2012. Plant stem cell line derived from cambium of herbaceous plant with storage root and method for isolating the same. Google Patents.
34. Johansen D.A. 1940. Plant microtechnique. Plant microtechnique (First Ed).
35. Joshi J., C. Elias, M. Patole. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal 62(2): 121-141.
36. Ketchum R., D. Gibson. 1996. Paclitaxel production in suspension cell cultures of *Taxus*. Plant cell, tissue and organ culture 46: 9-16.
37. Ketchum R.E., D.M. Gibson, R.B. Croteau, M.L. Shuler. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotechnology and bioengineering 62(1): 97-105.
38. Khatri P., J.S. Rana, A. Sindhu, P. Jamdagni. 2019. Effect of additives on enhanced in-vitro shoot multiplication and their functional group identification of *Chlorophytum borivillianum* Sant. Et Fernand. SN Applied Sciences 1(9): 1105.
39. Laux T. 2003. The Stem Cell Concept in Plants: A Matter of Debate. Cell 113(3): 281-283.
40. 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): 1213-1217.
41. 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, Springer International Publishing.

42. Luebert F., P. Pliscoff. 2006. Sinopsis bioclimática y vegetal de Chile.
43. Magistretti M. 1980. Remarks on the pharmacological examination of plant extracts. *Fitoterapia* 51(1).
44. McCoy E., S.E. O'Connor. 2008. Natural products from plant cell cultures. *Progress in Drug Research* 65: 329-370.
45. Miller C.O., F. Skoog, M.H. Von Saltza, F. Strong. 1955. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid¹. *Journal of the American Chemical Society* 77(5): 1392-1392.
46. Miyashima S., J. Sebastian, J.Y. Lee, Y. Helariutta. 2013. Stem cell function during plant vascular development. *Embo j* 32(2): 178-193.
47. Moon S.H., B. Mistry, D.H. Kim, M. Pandurangan. 2017. Antioxidant and anticancer potential of bioactive compounds following UV-C light-induced plant cambium meristematic cell cultures. *Industrial Crops and Products* 109: 762-772.
48. 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.
49. Moruś M., M. Baran, M. Rost-Roszkowska, U. Skotnicka-Graca. 2014. Plant stem cells as innovation in cosmetics. *Acta poloniae pharmaceutica* 71: 701-707.
50. Murashige T., F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
51. Mustafa N., W. Winter, F. Iren, R. Verpoorte. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature protocols* 6: 715-742.
52. Naill M.C., S.C. Roberts. 2004. Preparation of single cells from aggregated *Taxus* suspension cultures for population analysis. *Biotechnology and bioengineering* 86(7): 817-826.
53. Neumann K.H., K. Ashwani, J. Imani. 2020. Plant cell and tissue culture : a tool in biotechnology : basics and application.

54. O'Brien T.P., N. Feder, M.E. McCully. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2): 368-373.
55. O'Brien P., C. Carrasco-Pozo, H. Speisky. 2006. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-biological interactions* 159(1): 1-17.
56. 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.
57. Ochoa-Villarreal M., S. Howat, M.O. Jang, I.S. Kim, Y.-W. Jin, E.-K. Lee, G.J. Loake. 2015. Cambial meristematic cells: a platform for the production of plant natural products. *New biotechnology* 32(6): 581-587.
58. Paiva E., S. Pinho, D. Oliveira. 2011. Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding? *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 689: 37-49.
59. 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.
60. Poblete P., J. Gysling Caselli, V. Alvarez González, M. Bañados, J. Carlos, C. Kahler González, V. Pardo, D. Soto Aguirre, D. Baeza Rocha. 2023. *Anuario forestal 2023*.
61. Quezada N., M. Asencio, J. Del Valle, J. Aguilera, B. Gómez. 2004. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from *Boldo* (*Peumus boldus* Molina) leaves. *Journal of food science* 69(5): C371-C376.
62. Rando T.A. 2007. The immortal strand hypothesis: segregation and reconstruction. *Cell* 129(7): 1239-1243.
63. Reinert J., M.M. Yeoman. 2012. *Plant cell and tissue culture: a laboratory manual*. Springer Science & Business Media.
64. Rischer H., M. Oresic. 2006. Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc Natl Acad Sci* 103(14): 5614-5619.

65. 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.
66. Roberts S.C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology* 2007 3:7 3(7): 387-395.
67. Rodriguez R., C. Marticorena, D. Alarcón, C. Baeza, L. Cavieres, V.L. Finot, N. Fuentes, A. Kiessling, M. Mihoc, A. Pauchard. 2018. Catálogo de las plantas vasculares de Chile. *Gayana Botánica* 75(1): 1-430.
68. Sadeghnezhad E., M. Sharifi, H. Zare-Maivan, N. Ahmadian Chashmi. 2019. Time-dependent behavior of phenylpropanoid pathway in response to methyl jasmonate in *Scrophularia striata* cell cultures. *Plant cell reports* 39: 227-243.
69. Sadeghnezhad E., M. Sharifi, H. Zare-Maivan, N. Ahmadian Chashmi. 2020. Time-dependent behavior of phenylpropanoid pathway in response to methyl jasmonate in *Scrophularia striata* cell cultures. *Plant cell reports* 39(2): 227-243.
70. Schmeda-Hirschmann G., J. Rodriguez, C. Theoduloz, S. Astudillo, G. Feresin, A. Tapia. 2003. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol.(*Boldo*). *Free radical research* 37(4): 447-452.
71. Simirgiotis M.J., G. Schmeda-Hirschmann. 2010. Direct identification of phenolic constituents in *Boldo* Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(4): 443-449.
72. Smetana O., R. Mäkilä, M. Lyu, A. Amiryousefi, F. Sánchez Rodríguez, M.-F. Wu, A. Sole-Gil, M. Leal Gavarrón, R. Siligato, S. Miyashima. 2019. High levels of auxin signalling define the stem-cell organizer of the vascular cambium. *Nature* 565(7740): 485-489.
73. Song Y., S. Chen, X. Wang, R. Zhang, L. Tu, T. Hu, X. Liu, Y. Zhang, L. Huang, W. Gao. 2019. A novel strategy to enhance terpenoids production using cambial meristematic cells of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. *Plant Methods* 15: 1-13.

74. 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.
75. Speisky H., B.K. Cassels. 1994. *Boldo* and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacological Research* 29(1): 1-12.
76. 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.
77. Strobel G.A., A. Stierle, W.M. Hess. 1993. Taxol formation in yew — *Taxus*. *Plant Science* 92(1): 1-12.
78. Taiz L., E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd edn. 339-350
79. 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.
80. 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.
81. Trehan S., B. Michniak-Kohn, K. Beri. 2017. Plant stem cells in cosmetics: current trends and future directions. *Future science OA* 3(4): FSO226.
82. Urzúa A., P. Acuña. 1983. Alkaloids from the bark of *Peumus boldus*. *Fitoterapia* 54(4): 175-177.
83. Vogel H., I. Razmilic, P. Acevedo, B. Gonzalez. 2005. alkaloid and essential oil concentration in different populations of *peumus boldus*. pp. 181-184. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
84. 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.

85. Xiao Y., S. Gao, P. Di, J. Chen, W. Chen, L. Zhang. 2009. Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Physiologia Plantarum* 137(1): 1-9.
86. Ye Z.-H. 2002. Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annual review of plant biology* 53(1): 183-202.
87. 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.
88. Zhou P., J. Yang, J. Zhu, S. He, W. Zhang, R. Yu, J. Zi, L. Song, X. Huang. 2015. Effects of β -cyclodextrin and methyl jasmonate on the production of vindoline, catharanthine, and ajmalicine in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology* 99: 7035-7045.

