

CULTIVOS DE RAICES TRANSFORMADAS: Producción de Solasodina por *Solanum eleagnifolium* Cav. y de tiofenos por *Tagetes laxa* Cabrera

JULIAN RODRIGUEZ TALOU,
MARIA ALEJANDRA ALVAREZ Y ANA MARIA GIULIETTI
Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología,
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
Junín 956 6° Piso (1113) Buenos Aires, Argentina.

Resumen

El cultivo de raíces transformadas es una alternativa interesante para la producción de metabolitos secundarios por cultivo in vitro. Debido a esto se abordó el establecimiento y cultivo de raíces transformadas por infección con *Agrobacterium rhizogenes* de dos especies nativas: *Solanum eleagnifolium* Cav. y *Tagetes laxa* Cabrera. De los clones obtenidos se seleccionó para cada especie el de mayor producción de solasodina y tiofenos respectivamente y se encararon estudios cinéticos. En el caso de *S. eleagnifolium* Cav. el máximo valor de biomasa se alcanzó a los 30 días de cultivo, con un rendimiento máximo de solasodina de 1.90 ± 0.08 mg/g peso seco (PS). Cuando se trabajó con *T. laxa* la biomasa máxima se alcanzó a los 19 días (1.9-2.0 g PF) y la mayor acumulación de tiofenos ($\mu\text{g/erlenmeyer}$) se alcanzó el día 14. También se estudiaron, en esta última especie, la influencia de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y producción de tiofenos. Los medios G-B5 y G-B5 1/2 X tienen un efecto positivo sobre el crecimiento; en cuanto a la producción de tiofenos, con excepción del medio N 1/2X que tuvo un efecto negativo, en los restantes medios se alcanzaron niveles similares (980-1090 $\mu\text{g/erlenmeyer}$).

TRANSFORMED ROOT CULTURES: Production of Solasodine by *Solanum eleagnifolium* Cav. and of thiophene by *Tagetes laxa* Cabrera

Summary

Root cultures are being used as experimental systems to explore root - specific secondary metabolites and to provide future systems for commercial production of plant specialty

Palabras claves: Raíces transformadas - Solasodina - Tiofenos - *Solanum eleagnifolium* Cav. - *Tagetes laxa* Cabrera - Cultivo in vitro

Key words: Transformed roots - Solasodine - Thiophene - *Solanum eleagnifolium* Cav. - *Tagetes laxa* Cabrera - In vitro cultures

chemicals. We established transformed hairy root cultures from *S. eleagnifolium* Cav. and *T. laxa* Cabrera. From the clones obtained we selected for each species those that resulted in the higher solasodine and thiophene productivity respectively in order to study kinetic parameters. Working with *S. eleagnifolium* Cav. the maximum biomass value was reached after 30 days of culture and the maximum solasodine yield was 1.90 ± 0.08 mg/g dry weight (DW). With respect to *T. laxa* Cabrera the maximum biomass was reached after 19 days of culture (1.9 - 2.0 g fresh weight) and the highest thiophene accumulation ($\mu\text{g}/\text{flask}$) was reached at 14 days. We also studied, for this last species, the influence of different culture mediums on growth and thiophene production. Mediums G - B5 and G - B5 1/2X had a positive effect on growth. With respect to thiophene production, all mediums reached similar levels (980 - 1090 $\mu\text{g}/\text{flask}$) except medium N 1/2X that had a negative effect.

Introducción

Las plantas superiores son una importante fuente de metabolitos secundarios utilizados por el hombre en diversas industrias, tales como la farmacéutica, alimentaria, agroquímica y cosmética, entre otras.

El potencial que ofrecen las plantas como fuente de compuestos de interés comercial es enorme ya que ellas sintetizan una gran variedad de compuestos químicos (4 veces más que la que producen los microorganismos). Sin embargo, solamente se ha analizado la actividad biológica de un reducido porcentaje (5 al 10%) de todas las especies existentes en el planeta.

Por estas causas se incrementaron, en los últimos años, las investigaciones para la búsqueda de compuestos de interés comercial a partir de los vegetales.

La gran complejidad de los metabolitos vegetales (muchas veces con presencia de varios carbonos quirales) hace que su síntesis química sea poco eficiente y costosa.

Durante los últimos 30 años se ha buscado como estrategia alternativa el cultivo in vitro de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios en lugar de utilizar los sistemas tradicionales de cultivos a campo.

El cultivo in vitro ofrece algunas ventajas potenciales (3):

- Suministro planificado de acuerdo con la demanda, independencia del clima, suelo, enfermedades y problemas sociopolíticos.
- Cultivo bajo condiciones controladas y optimizadas, lo que posibilita una calidad estable.
- Cortos períodos de tiempo.
- Uso de las mismas instalaciones para distintos metabolitos.
- Mejores condiciones para la extracción y purificación.

Por otro lado, el cultivo in vitro permite una mejor y más rápida búsqueda y selección de especies mejoradas genéticamente que el que se realiza tradicionalmente a campo.

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas en este terreno, pocos procesos se han llevado a la industria, los que se han limitado a (4):

- Cultivo de células de *Lithospermum erythrorhizon* para la producción de shikonina;
- Cultivo de raíces de *Panax ginseng* productoras de saponinas;

- Cultivo de células de *Coptis japonica* para la producción de berberina;
- Cultivo de células de *Nicotiana tabacum* para la producción de nicotina y biomasa.

La causa por la cual pocos procesos se han llevado a escala industrial es su baja productividad, en parte debido a que se ha trabajado con células indiferenciadas (callos y cultivos en suspensión). El proceso de desdiferenciación generalmente lleva a una pérdida en la capacidad de producir metabolitos secundarios, lo que puede deberse a pérdida de la expresión de los genes responsables de las rutas metabólicas en células no especializadas, pérdida de sitios de almacenamiento que sólo estarán presentes en cultivos diferenciados, o a desregulación del catabolismo del compuesto sintetizado (4). Ante estas dificultades el cultivo in vitro de tejidos diferenciados (tallos y raíces) se presenta como una estrategia muy atractiva.

El cultivo in vitro de raíces para la producción de metabolitos secundarios ha adquirido gran interés en los últimos años (5,6). Esto se debe al redescubrimiento de las raíces no sólo por sus funciones tradicionales como soporte mecánico y captación de agua y sales, sino también como fuente importante de productos químicos que luego son trasladados al resto de la planta (6,7). Desde la antigüedad, los extractos vegetales de raíces fueron ampliamente empleados en medicina popular como colorantes, alimentos, etc. En la actualidad se conocen una gran cantidad de compuestos sintetizados en las raíces con importantes actividades biológicas (Tabla 1), muchos de ellos aplicados a la industria.

Especie	Compuesto	Acción
<i>Atropabelladona</i> <i>Datura innoxia</i>	Hiosciamina - Escopolamina	Antiespasmódica
<i>Valeriana officinalis</i>	Valepotriatos	Sedante
<i>Tagetes patula</i>	Tiofenos	Insecticida
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenósidos	Energizante
<i>Stevia rebaudiana</i>	Esteviósidos	Edulcorante
<i>Lithospermum</i> <i>erythrorhizon</i>	Shikonina	Colorante
<i>Sanguinaria canadensis</i>	Sanguinarina	Antibacteriana
<i>Catharanthus roseus</i>	Ajmalicina - Catarantina	Antitumoral
<i>Solanum laciniatum</i>	Solasodina	Precursora de hormonas esteroideas

Tabla 1. Compuestos de interés comercial sintetizados en las raíces

Los cultivos in vitro de raíces aplicados al estudio y producción de metabolitos secundarios se comenzaron a utilizar hace 40 años; estos sistemas generalmente obtenidos a través de un balance hormonal en el medio de cultivo, son difíciles de establecer, y además las raíces presentan un crecimiento lento (7). Este inconveniente pudo ser solucionado por medio del cultivo de raíces transformadas, obtenidas a través de la infección con cepas patogénicas de *Agrobacterium rhizogenes* (raíces en cabelleras o "hairy roots").

El proceso de transformación es un mecanismo de ingeniería genética natural bastante complejo. Básicamente consiste en la transferencia de una porción de ADN (T-ADN) del plásmido Ri de *A. rhizogenes* al genoma de la célula vegetal. El mecanismo se

dispara con la secreción de compuestos fenólicos (acetosiringona) producidos por heridas de las plantas; estos compuestos activan los genes vir responsables de la transformación genética. Una vez producida la inserción en el genoma vegetal los genes del T-ADN transferido se expresan induciendo a la célula transformada a comportarse como una célula raíz. Paralelamente se sintetizan aminoazúcares (opinas) los que son utilizados por *A. rhizogenes* como nutrientes. Se obtienen así raíces transformadas capaces de mantenerse en cultivo in vitro en medios libres de fitoreguladores conservando el mismo perfil de compuestos que la planta original (8,9). Esta metodología es en general aplicable para la mayoría de las Dicotiledóneas, ya que son más susceptibles a la infección.

El sistema de raíces transformadas es excelente para el estudio de rutas metabólicas, interacción de las plantas con microorganismos, estudios de producción, etc.

En este estudio se han establecido cultivos de raíces transformadas de *Solanum eleagnifolium* Cav. y *Tagetes laxa* Cabrera.

Solanum eleagnifolium Cav. es una especie nativa productora de solasodina, presente en la planta como el glicósido solamargina (materia prima alternativa a la diosgenina para la síntesis de drogas esteroidales); *Tagetes laxa* Cabrera es una especie productora de tiofenos (compuestos heterocíclicos azufrados derivados de los poliacetilenos que poseen una gran actividad biocida especialmente contra nematelmintos e insectos). Por ser estas últimas moléculas fácilmente degradables son una alternativa eficaz para reemplazar a los insecticidas usados en la actualidad (10).

Materiales y métodos

Material Vegetal Las semillas de *S. eleagnifolium* Cav. se recolectaron en la Pcia. de San Luis y las de *T. laxa* Cabrera en la Pcia. de Jujuy. Se esterilizaron por inmersión en NaClO (4% de cloro activo) durante 20 minutos, lavadas con abundante agua destilada estéril y finalmente se sembraron en medio MSRT (11) con 0.8% de agar, el pH se ajustó a 5.7. Los cultivos se incubaron a $24 \pm 2^\circ$ C y un fotoperíodo de 16 horas.

Establecimiento de cultivos de raíces transformadas se inocularon plántulas que tenían entre dos y tres semanas de edad con cultivos de 48 hs. de *A. rhizogenes* LBA 9402 según la descripción de Hamill y col. (6). Estas plántulas fueron mantenidas en medio MSRT en las condiciones descritas anteriormente. Aproximadamente entre la tercera y cuarta semanas de realizada la infección, aparecieron ápices radicales en los sitios de inoculación. Estos ápices radicales fueron transferidos a medio MSRT líquido en presencia de 1 g/l de ampicilina con el fin de eliminar las bacterias y se incubaron en agitadores rotatorios a 100 rpm en idénticas condiciones ambientales a las ya descritas para *S. eleagnifolium* Cav. En el caso de *T. laxa* Cabrera las raíces se incubaron en oscuridad. Los clones obtenidos se mantuvieron en medio líquido MSRT sin ampicilina repicándolos cada 2 semanas en el caso de *S. eleagnifolium* Cav. y cada 3 semanas para el caso de las raíces de *T. laxa* Cabrera.

Estudios cinéticos de crecimiento y producción de metabolitos secundarios. Para realizar los estudios de raíces transformadas de *S. eleagnifolium* Cav. se inocularon

en erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio MSRT con 1.5 g de peso fresco (PF) de ápices radicales de 2 cm de longitud aproximadamente, mientras que para *T. laxa* Cabrera se inocularon 0.10-0.15 g de PF en 40 ml de medio. Las condiciones de cultivo fueron las descritas en el punto anterior.

Cuando se estudió la influencia de diferentes medios de cultivo se utilizaron los medios Gamborg B5 (G-B5) (12) y Nitsch (N) (13). Para los casos en que se utilizó la mitad de la concentración de sales de los distintos medios se indicaron como MSRT 1/2 X, G-B5 1/2 X y N 1/2 X.

Índice de crecimiento

El índice de crecimiento (IC) se define como la relación entre el peso fresco final y el peso fresco inicial.

Métodos analíticos

La extracción y cuantificación de solasodina se llevó a cabo según Nigra y col. (14). La extracción y cuantificación por HPLC de tiofenos se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita por Norton y col. (15). Los tiofenos analizados fueron: 5 - (3-buten - 1 - inil) - 2, 2' - bitienil (BBT); 5 - (4 - hidroxil - 1 - butinil) - 2, 2' - bitienil (BBTOH); 5 - (4 - acetoxil - 1 - butinil) - 2, 2' - bitienil (BBTOAc) y α - tertienil (α - T).

Resultados y conclusiones

Solanum eleagnifolium Cav.

Aproximadamente entre la segunda y tercera semanas de infectadas las plantas, comenzaron a observarse en los sitios de inoculación el surgimiento de ápices radicales (Figura 1A) con una frecuencia de infección del 80%.



Figura 1 Inducción de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* LB 9402 en *S. eleagnifolium* Cav.

A partir de los mismos se establecieron cultivos en medio líquido, que fueron mantenidos por subcultivo en medio de MSRT cada 2 semanas. De los clones obtenidos se seleccionó el que produjo mayor rendimiento en solasodina y con él se efectuaron estudios cinéticos de crecimiento y producción (Figura 2). El máximo valor de biomasa (4.0 g peso seco / l) se alcanzó a los 30 días de cultivo, con un índice de crecimiento (IC) de 39.07 y un rendimiento máximo de solasodina de 1.90 ± 0.08 mg/g peso seco (PS) alcanzado a los 30 días de cultivo. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.148 d^{-1} con un tiempo de duplicación de 4.68 d.

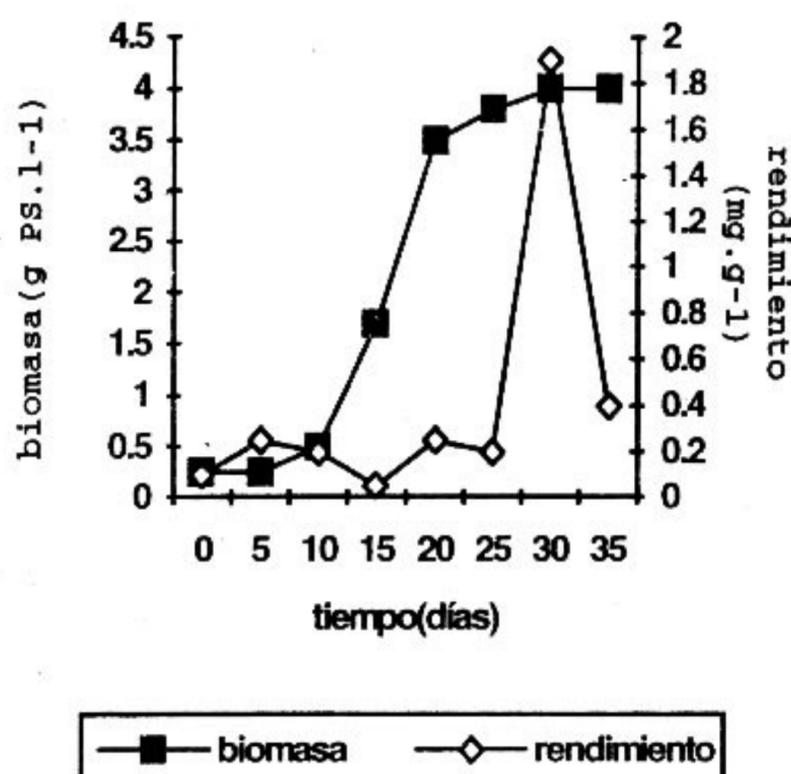


Figura 2 Cinética de crecimiento y rendimiento de solasodina en raíces transformadas de *Solanum eleagnifolium* Cav. (clon 5) en medio MSRT.

Los valores de rendimiento de solasodina son comparables a los obtenidos en cultivos indiferenciados (1.2- 1.7 mg/g PS) y a los de hojas y ramas de la planta silvestre (14), pero son inferiores a los obtenidos en cultivos en suspensión donde se alcanzaron rendimientos de 6.00 - 6.98 mg / g PS como máximo (16).

***Tagetes laxa* Cabrera**

Entre la tercera y cuarta semanas posteriores a los infección se observó el surgimiento de raíces en los sitios de infección (Figura 3) con una frecuencia de infección aproximada al 90%. A partir de ápices radicales se establecieron distintos clones en medio líquido sin fitorreguladores (Figura 4). Se seleccionó uno de estos clones en base a su capacidad productora, y su IC para realizar estudios cinéticos de crecimiento y producción de tiofenos. La biomasa máxima obtenida fue de 1.9 - 2.0 g de PF a los 19 días de cultivo (Figura 5), con un índice de crecimiento de 20. La máxima tasa de crecimiento ($\mu = 0.14 \text{ d}^{-1}$) ocurrió entre los días 10 y 14. El valor máximo de tiofenos totales (μg / erlenmeyer) se alcanzó al día catorce y fue de aproximadamente $1000 \mu\text{g}$ / erlenmeyer; a partir de este punto el contenido de tiofenos decreció como resultado del equilibrio entre síntesis, degradación y acumulación. Con respecto a la productividad específicas, se observó un rápido incremento hasta el día seis ($2200 \mu\text{g}$ / g PF).

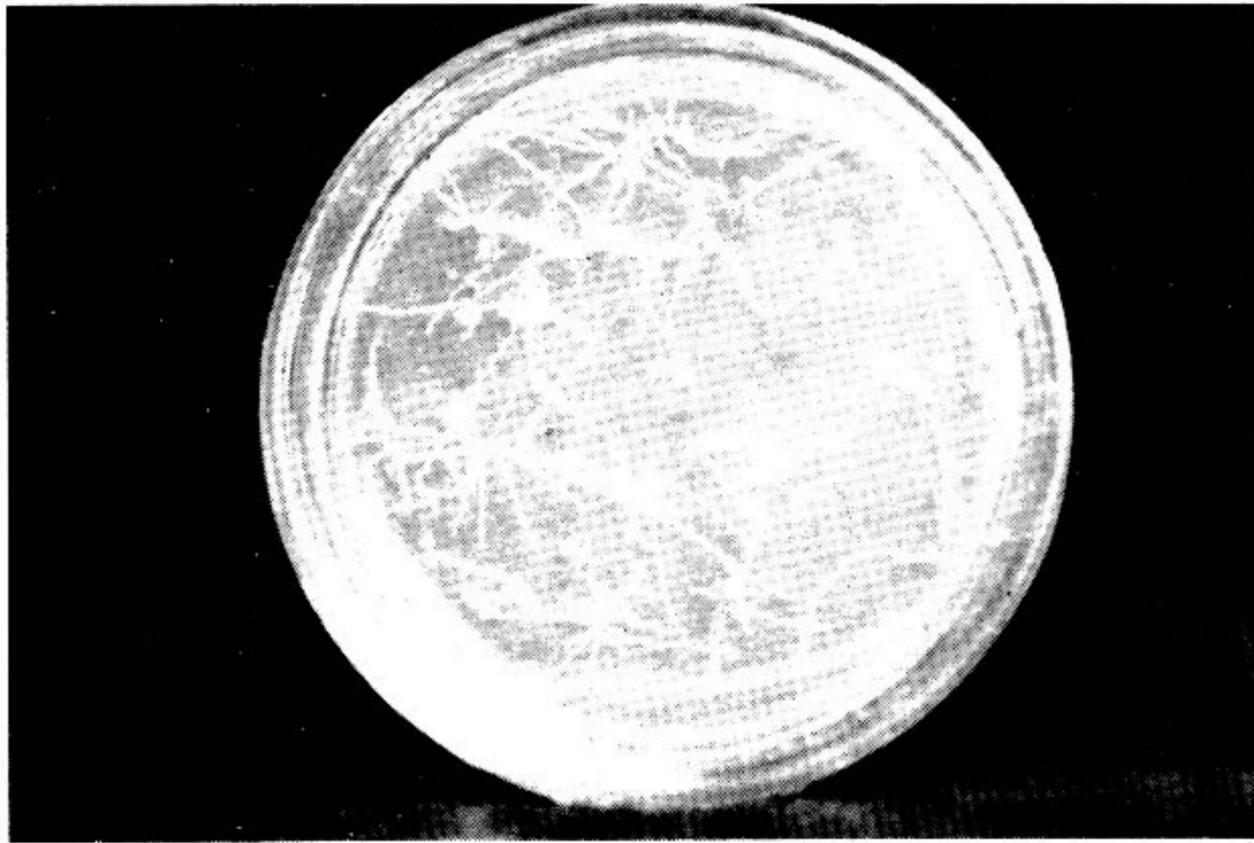


Figura 3 Inducción de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes* LB 9402 en *T.laxa* Cabrera

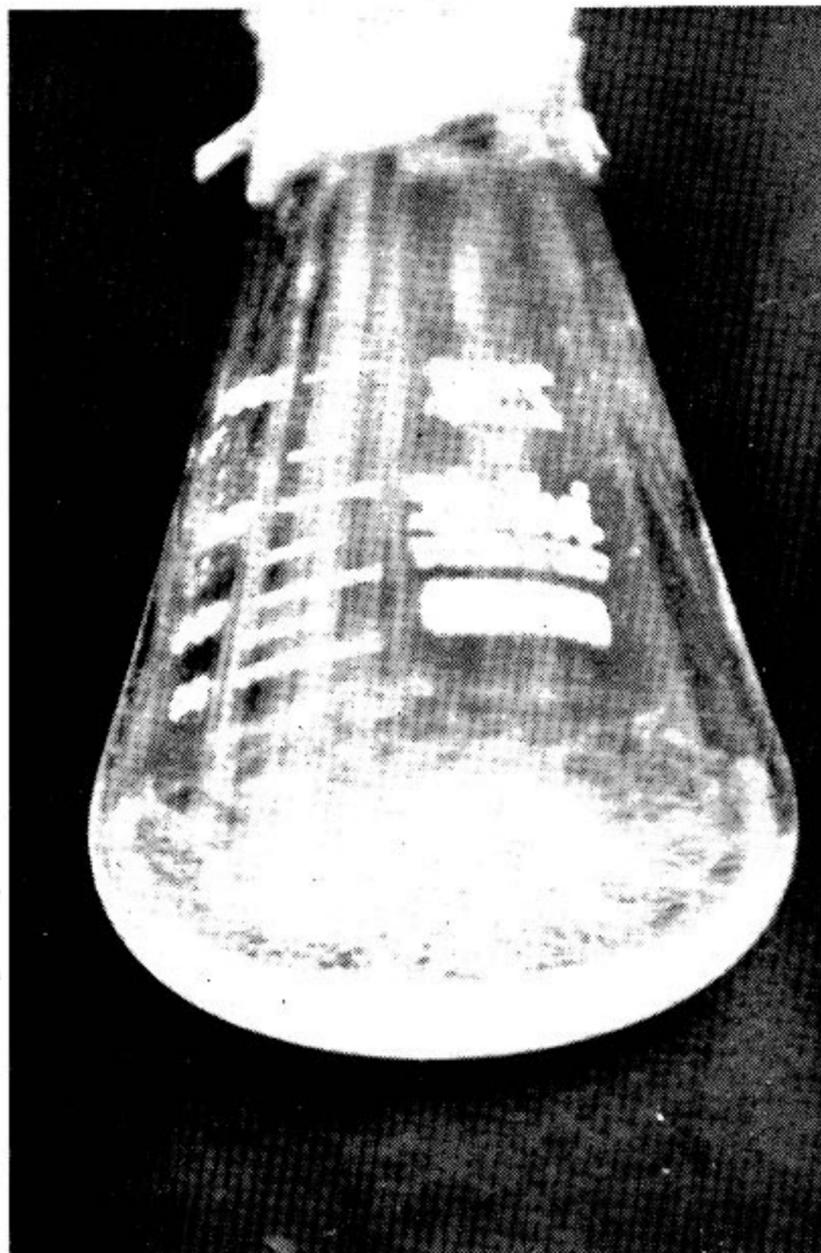


Figura 4 Cultivo de raíces transformadas de *T. laxa* Cabrera en medio MSRT líquido

decreciendo hasta $900 \mu\text{g/g}$ PF al décimo día y estabilizándose a un nivel de $400 - 500 \mu\text{g/g}$ de PF a partir del día diecinueve. Es importante destacar que el contenido de tiofenos en estas raíces transformadas es superior al hallado en raíces de plantas enteras crecidas in vitro ($88 \mu\text{g/g}$ PF).

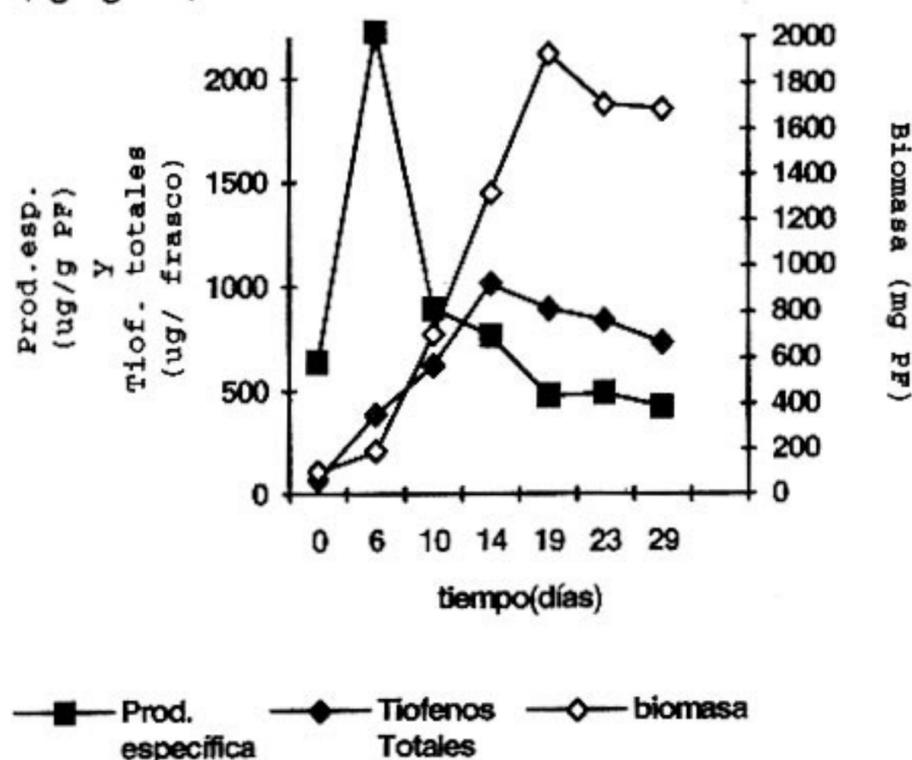


Figura 5 Cinética de crecimiento y producción de tiofenos en raíces transformadas de *T. laxa* Cabrera (clon TL 34) en medio MSRT.

Cuando se estudió la influencia de diferentes medios de cultivo (Figura 6), en todos el contenido total de tiofenos fue similar ($980 - 1090 \mu\text{g/erlenmeyer}$) con excepción del medio N 1/2 X cuyo contenido fue de $520 \mu\text{g/erlenmeyer}$. La productividad específica para las dos concentraciones de medio Gamborg usadas y para el medio N 1/2 X fue menor ($600 \mu\text{g/g PF}$) que para los medios MSRT y Nitsch ($1200 - 1500 \mu\text{g/g PF}$). Con respecto a la biomasa, los medios G-B5 y G-B5 1/2 X estimularon positivamente el crecimiento, observándose en los demás medios, índices de crecimiento similares.

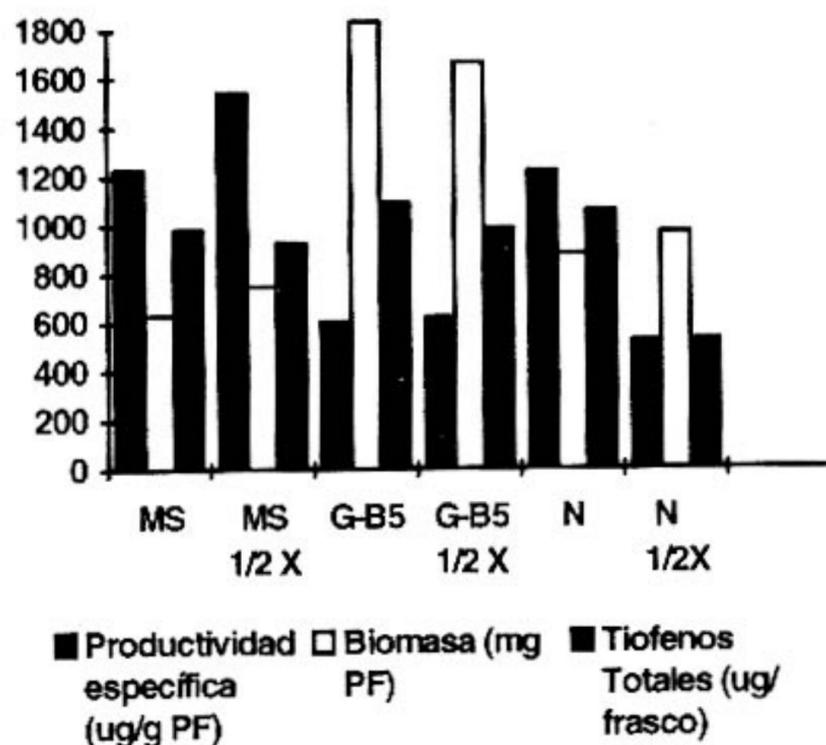


Figura 6 Influencia de diferentes medios de cultivo en el crecimiento y la producción de tiofenos en raíces transformadas de *T. laxa* Cabrera (clon TL 34).

Podemos entonces concluir que con excepción del N 1/2 X en los demás medios no se observaron diferencias en la producción total de tiofenos ($\mu\text{g}/\text{erlenmeyer}$), por lo que es posible utilizar, en este caso, cualquiera de los medios ensayados para desarrollar este tipo de cultivos.

Bibliografía

1. Cronk, Q. y Syngé, H. (1988). Biodiversity: the key role of plants. **Joint IVCN-WWF Bulletin**.
2. Farnsworth, N.R. (1988). Screening for new medicines. En: **Biodiversity**. Wilson, E.O. National Academic Press, Washington D.C.: 83-97.
3. Fowler, M. y Stafford, A. (1992). Plant Cell Culture, Process Systems and Product Synthesis. En: **Plant Biotechnology**. Fowler, M. y Warren, G., Pergamon Press, Inglaterra.
4. Charlwood, B.; Charlwood, K. y Molina - Torres, J. (1990). Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. En: **Secondary Products from Plant Tissue Culture**. Charlwood, B. y Rhodes, M., Clarendon Press, Oxford.
5. Flores, H. y Filner, P. (1985). Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae. En: **Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures**. Neumann, K.; Barz, W. y Reinhard, E., Springer - Verlag, Berlín: 174-185.
6. Hamill, J.; Parr, A.; Robins, R. y Rhodes, M. (1986). **Plant Cell Rep.** 5: 111-114.
7. Flores, H. (1992). **Chemistry & Industry**, 18 May: 374-377.
8. Stachel, S.; Messens, E. y Van Montagu, M. (1985). **Nature**, 318: 624-629.
9. Petit, A.; David, C. y Dahl, G. (1982). **Mol. Gen. Genet.** 190: 204-210.
10. Haesspieler, B.; Amason, J. y Downe, A. (1988). **J. of the Amer. Mosquito Control Association** 4: 479-484.
11. Khanna, P. y Staba, J. (1968). **Lloydia** 31: 180-189.
12. Gamborg, O.; Miller, R. y Ojima, K. (1968). **Exp. Cells Res.** 50: 151-158.
13. Nitsch, J.P. (1969). **Phytomorphology** 19: 389-391.
14. Nigra, H.; Caso, O. y Giulietti, A. (1987). **Plant Cell Rep.** 6: 135-137.
15. Norton, R. (1985). **Phytochemistry** 24: 719-722.
16. Alvarez, A.; Nigra, H. y Giulietti, A. (1993). **Natural Product Letters** 13: 9-19