

## Estudio de *Datura metel* Linn, por cultivo de tejido celular

J. DEL SOL, A. LAGUNA y E. ALVAREZ

Laboratorio de Fitoquímica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, CENIC  
Apartado 6880, Cubanacán, La Habana, Cuba

Recibido en septiembre de 1986

### RESUMEN

En cultivo de tejidos de *Datura metel*, el uso de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones entre 2 y 4 mg/l presentó mejores resultados en lo que a crecimiento celular se refiere que el uso de ácido indolacético (AIA) o de ácido naftalenacético (ANA). Las variaciones de la concentración de kinetina no afectaron ni el crecimiento celular ni la producción de alcaloides, sin embargo, al añadir hidrolizado de levadura al medio se incrementa el rendimiento celular, y muy ligeramente, la producción de alcaloides, siendo óptimo a concentraciones entre 0,6-0,9 g/l. Un incremento del pH hasta 7,3 aumenta el crecimiento celular, no así la producción de alcaloides.

Los callos crecen mejor en medio Murashige-Skoog (MS) que en medio B<sub>5</sub> y la dilución de sales a la mitad de la concentración causa un notable incremento en el crecimiento celular. Algunos de los cambios en estos parámetros ocasionan cambios en los cromatogramas (HPLC) del crudo total de alcaloides.

### SUMMARY

In cell cultures of *Datura metel* Linn, the use of 2,4-D gave better results for cell growth than the use of IAA and NAA. Variation of kinetina concentration in the medium had no effect on callus growth or alkaloid production. Yeast extract increase the cellular growth and also the alkaloid production, being optimum at 0,6-0,9 g/l. An slow increase of pH up to 7,3 increase the cell growth but no variation is observed in the alkaloidal production of that cell. The use of Murashige-Skoog medium and also dilution of salts concentration to a half of normal cause a notable growth of the callus.

Some of the changes of these parameters produce a change in the HPLC profile of the crude alkaloid mixture.

### INTRODUCCION

En un trabajo anterior (Del Sol, 1984), se establecieron las condiciones del cultivo de células y fueron seleccionadas las líneas de *D. metel* más promisorias para posibles estudios de producción de alcaloides por cultivo de tejidos *in vitro* de esta especie.

De los estudios realizados anteriormente en diversas especies de *Datura* (Chan y Staba, 1965; Staba y Jindra, 1968; Stohs, 1969; Sairam y Khanna, 1971; Khanna y Khanna, 1976; Idrisova, 1976; Vergar-Petri *et al.*, 1978; Kibler and Neumann, 1979), se observa que los rendimientos de alcaloides obtenidos por cultivo de células son bajos en comparación con los obtenidos en las plantas de partida.

En el presente trabajo se presentan resultados que indican el comportamiento de esta especie en cultivo de tejidos *in vitro* ante cambios de hormonas, concentración de sales, kinetina, pH, presencia de otros nutrientes e incluso cambios de medios de cultivo, con vistas a establecer el medio más adecuado para el cultivo de esta especie con el fin de obtener el mejor crecimiento celular y el mejor rendimiento de alcaloides, los cuales, no obstante, se mantienen por debajo de los obtenidos en las plantas de partida, al igual que el resto de los reportes de la literatura.

## MATERIALES Y METODOS

Callos y suspensiones de *D. metel* fueron obtenidos de plantas estériles y propagadas según se reporta (Del Sol, 1984) en medio MS (Murashige, Skoog, 1962), conteniendo 2 mg/l de 2,4-D y 0,1 mg/l de kinetina (medio denominado MA); se aislaron 15 sublíneas atendiendo a las diferencias morfológicas de los primeros callos celulares obtenidos. Los mismos se propagan cada cuatro semanas en el mismo medio y sirvieron como origen para todos los experimentos realizados. Cada ensayo constó con tres muestras y un control.

En medio MS se ensayaron concentraciones de auxinas 2,4-D, ANA y AIA de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/l, manteniendo la concentración de kinetina constante (0,1 mg/l). Para evaluar el efecto de la kinetina se evaluaron concentraciones de 0,1, 0,5 y 1,0 mg/l, manteniendo una concentración constante de 2,4-D de 2 mg/l.

En medio MA se ensayaron concentraciones de 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 g/l de hidrolizado de levadura en dos líneas celulares, manteniendo constante el resto de las variables.

En medio MA sin hidrolizado y con hidrolizado de levadura (0,5 g/l), se analizaron, para una misma línea celular, las variaciones con el pH a 5,3; 5,8; 6,0; 6,7; 7,3; 8,0 y 9,0 (el pH fue ajustado con KOH antes de esterilizar el medio).

Dos líneas celulares fueron transferidas a medio MA normal, a medio MA con la concentración de sales duplicada y a medio MA con la concentración de sales diluida a la mitad.

Para el análisis químico se tomaron muestras de todos los experimentos. Un gramo de callo seco se sonica durante dos horas con metanol (25 ml), se filtra, y la solución metanólica se evapora a sequedad; el residuo se redisuelve en cloroformo (10 ml), la solución se filtra y se evapora hasta sequedad a presión reducida. El extracto así obtenido se mezcla con LiCl 0,1 N (20 ml) y posteriormente se extrae con cloroformo (6 . 5 ml), el cual se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evapora hasta sequedad con presión reducida, obteniéndose el crudo total de alcaloides.

Para cada una de las muestras, el crudo total de alcaloides se analizó mediante cromatografía de capa delgada utilizando placas Chromagran (KODAK), sin indicador fluorescente y cloroformo: metanol 19:1 como eluyente de las mismas. El análisis de las muestras por cromatografía líquida de alta resolución se realizó utilizando un equipo Waters con bomba M-45, inyector U6K, detector M-440 a 254 nm. Se utilizó una columna LiChrosorb RP-18 (10 µm) y como eluyente MeOH : H<sub>2</sub>O 85 : 15 con un flujo de 1,0 ml/min.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Inicialmente las líneas celulares conservaron las diferencias morfológicas que sirvieron para su separación, sin embargo, después de 5 a 6 pases la tendencia fue de homogeneización de las mismas desde el punto de vista morfológico, resultando callos celulares de color carmelita claro y de buena friabilidad.

En la figura 1 se muestran resultados comparativos de los rendimientos de alcaloides y rendimiento celular en relación con la concentración de auxinas; si bien no hay grandes diferencias entre ellos, los mejores callos, en cuanto a aspecto, friabilidad y estabilidad, se logran en 2,4-D,

donde la concentración óptima oscila entre 2-4 mg/l. Como se observa en la figura 1, la concentración de alcaloides no varía apreciablemente en ninguna de las muestras.

En un trabajo anterior (Khanna y Khanna, 1976v), se observan resultados similares a los obtenidos en este trabajo, aunque dichos autores observan para el medio con 2,4-D un mayor crecimiento celular, pero una menor producción de alcaloides. En presencia de ANA los callos oscurecen, y después de varios pases tienden a fenolizarse, se detiene el crecimiento. Los callos en presencia de AIA tienden a endurecerse, lo cual dificulta su propagación. En presencia de 2,4-D, sin embargo, se han cultivado durante 24 meses sin cambios morfológicos o de crecimiento.

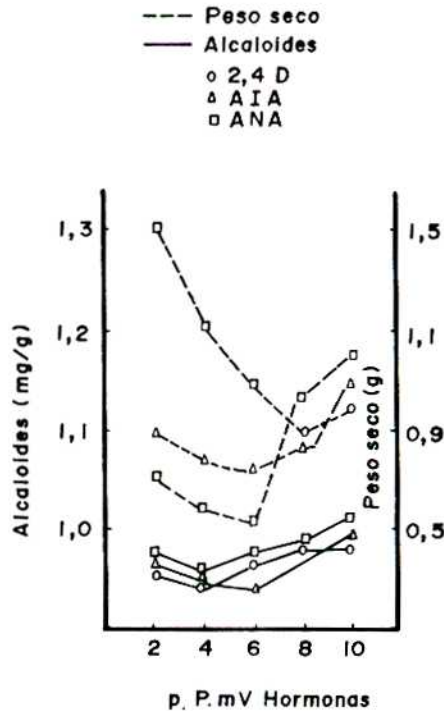


FIG. 1. Producción de alcaloides en relación con diferentes concentraciones de auxinas.

En los ensayos con kinetina a diferentes concentraciones, no hubo gran variación en los resultados, tal y como se muestra en la figura 2, tanto en lo que respecta al crecimiento celular como para la producción de alcaloides.

Al estudiar el efecto del hidrolizado de levadura (HL), se observa que esta mezcla de aminoácidos influyó notablemente en el rendimiento celular (tabla 1), observándose callos de alta vitalidad algo más oscuros que los del control sin HL, pero esto no afectó la estabilidad de las líneas y el cambio de color puede evitarse si se agrega al medio agua de coco al 10 por ciento.

Al estudiar el efecto del pH sobre el crecimiento celular y la producción de alcaloides, se pudo observar que a pesar de que es recomendado el pH entre 5,4 y 6,0 (Gamborg y Wetter, 1975), al ensayarse un rango mayor las líneas no solo se adecuaron a pH superiores, sino que aumentaron la calidad y el rendimiento celular; en la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos, y como se observa, el porcentaje de alcaloides no varía significativamente.

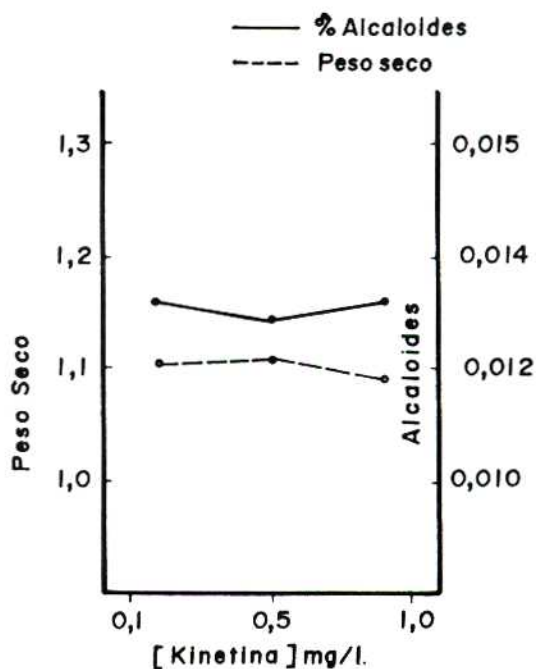


FIG. 2. Efecto de la kinetina en el peso seco de las células y la producción de alcaloides.

Tabla 1

EFFECTO DEL HIDROLIZADO DE LEVADURA SOBRE EL RENDIMIENTO CELULAR  
(LOS CALLOS FUERON EVALUADOS DESPUES DE 20 DIAS DE CULTIVO)

Concentración HL (g/l)	Peso seco (g)	% de alcaloides (mg/g)
0	0,302	0,010
0,3	0,425	0,012
0,6	0,484	0,018
0,9	0,540	0,021
1,2	0,450	0,016

Tabla 2

EFFECTO DEL pH SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA PRODUCCION DE ALCALOIDES  
(LAS CELULAS FUERON COSECHADAS DESPUES DE 20 DIAS EN CULTIVO)

pH	Peso seco (g)	% de alcaloides (mg/g)
5,3	0,901	0,013
5,8	1,030	0,014
6,0	1,113	0,015
6,7	1,370	0,013
7,3	1,245	0,015
8,0	1,006	0,010
9,0	0,868	0,008

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos al comparar el crecimiento celular en los medios MS y B5 (Gamborg *et al.*, 1968) con la concentración de sales modificadas. Como se observa, a una mayor concentración salina hay una ligera disminución del rendimiento y una mayor dilución provoca un aumento de los rendimientos celulares. Este fenómeno pudiera relacionarse con problemas osmóticos que dificultan la alimentación celular en altas concentraciones salinas.

Tabla 3

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SALES EN EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA PRODUCCION DE ALCALOIDES (LAS CELULAS FUERON COSECHADAS DESPUES DE 20 DIAS EN CULTIVO)**

Dilución	Medio MS		Medio B5	
	Peso seco (g)	% de alcaloides (mg/g)	Peso seco (g)	% de alcaloides (mg/g)
normal	1,150	0,018	1,010	0,021
sales x 1/2	1,310	0,021	1,44	0,023
sales x 2	1,020	0,020	1,010	0,019

Al estudiar el crecimiento celular en los medios de cultivo MS y B5, se observa un mayor crecimiento celular en el medio MS que en el B5, lo que puede tener una relación directa con variaciones nutricionales de las células en cada uno de los medios. Es notable que el aumento de peso seco está pareado con una alta hidratación que oscila entre 96-97 por ciento de humedad. Estos resultados se ven reflejados en la tabla 4.

Tabla 4

**COMPARACION DEL CRECIMIENTO CELULAR Y LA PRODUCCION DE ALCALOIDES EN MEDIOS MS Y B5 A DIFERENTES TIEMPOS DE CULTIVO**

Tiempo (días)	Medio MS			Medio B5		
	Peso seco (g)	% H <sub>2</sub> O	% de alcaloides (mg/g)	Peso seco (g)	% H <sub>2</sub> O	% de alcaloides (mg/g)
0 <sub>0</sub>	—	—	—	—	—	—
18	0,730	96,7	0,013	0,695	96,0	0,019
25	0,893	96,8	0,018	0,763	96,9	0,014
30	1,091	96,9	0,015	0,805	96,0	0,016

Según muestran los datos de esta tabla, los rendimientos de alcaloides varían significativamente en B5 respecto al medio MS.

Todos los resultados anteriores nos hacen sugerir como medio óptimo para la propagación de callos de *Datura metel* Linn, y también para la producción de alcaloides tropánicos por dichos callos, al medio MS con la concentración de sales diluida a la mitad, el pH del medio ajustado a 6,8 con una concentración de hidrolizado de levadura entre 0,5 y 0,9 g/l. Además, este medio debe contener 2,4-D como auxina en concentración de 2-4 mg/l, kinetina en concentración de 0,1 mg/l y con posibilidades de adicionar agua de coco al 10 por ciento.

Todas estas variantes permiten obtener rendimientos del crudo de alcaloides totales superiores comparativamente entre ellos, pero siempre quedarán por debajo de los valores obtenidos

para el material vegetal utilizado como punto de partida para la formación de dichos callos. Acorde con el análisis cromatográfico, ninguna de las variantes analizadas favoreció la formación de atropina y/o escopolamina, sin embargo, la presencia de hidrolizado de levadura, agua de coco y la dilución de las sales fueron los factores que más influyeron en la aparición de nuevos picos en los cromatogramas (posibles alcaloides o precursores de estos); en los cromatogramas de la figura 3 se muestran ejemplos de estas variaciones.

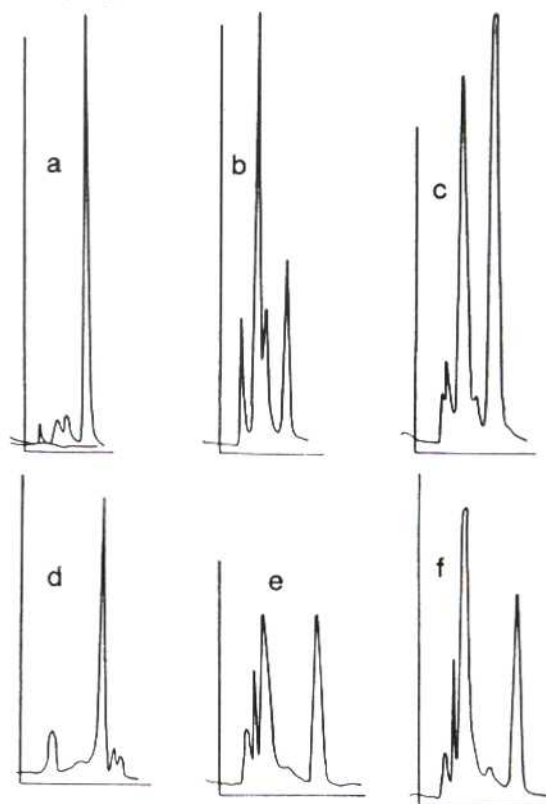


FIG. 3. Cromatogramas de los extractos alcaloidales de una línea de cultivo de tejidos celular de *Datura metel* Linn cultivada en diferentes medios: a = MS; b = MS + AIA + HL; c = MS + 2,4 D + HL; d = B5; e = B5 + AIA + HL; f = B5 + 2,4 D + HL.

### AGRADECIMIENTOS

Al licenciado Víctor Fuentes (Estación Experimental de Plantas Medicinales, MINSAP), por haber suministrado el material vegetal de partida. Esta investigación fue parcialmente financiada por: Servicios Canadienses Universitarios de Ultramar.

### REFERENCIAS

- CHAN W. N. y E. J. STABA (1965). *Alkaloid production by Datura callus and suspension tissue culture*. *Lloydia* 28: 55.

- DEL SOL, J. A. (1984). *Cultivo de tejidos de especies de Datura metel, D. stramonium y D. ferox*. Revista de Ciencias Biológicas CFNIC (en imprenta).
- GAMBORG, O. L. y L. R. WETTER (1975). *Plant tissue culture methods*. Publications NRC, Canada.
- IDRISOVA, L. S. (1976). *Effect of different concentrations of sucrose on Datura innoxia growth in light*. Mater. Teor. Klin. Med. 6: 103 (Chem. Abstracts 91-52727).
- GAMBORG, O. L.; R. A. MILLER y K. OJIMA (1968). *Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells*. Exp. Cell Res. 50: 151.
- KHANNA, P. y R. KHANNA (1976). *Effect of various auxins on growth and production of tropane alkaloids from in vitro tissue culture of Datura metel Linn*; Ind. J. Pharm. 38: 120.
- KIBLER, R. y K. N. NEUMANN (1979). *Alkaloid content in haploid and diploid leaves and cell suspension of Datura innoxia*. Planta Médica 35: 354.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plantarum. 15: 473.
- SAIRAM, T. V. y P. KHANNA (1971). *Effect of tyrosine and phenyl alanine on growth and production of alkaloids in Datura tatula tissue cultures*. Lloydia 34: 170.
- STABA, E. J. y A. JINDRA (1968). *Datura tissue cultures, production of minor alkaloids from chlorophyllous and non-chlorophyllous strains*. J. Pharm. Sci. 57: 701.
- STOHS, S. J. (1969). *Production of scopolamine and hyoscyamine by Datura stramonium L. suspension cultures*. J. Pharm. Sci. 58: 103.
- VERGAR-PETRI, G.; K. DIN HUYAK y E. SZOKE (1978). *The alkaloid production in Datura innoxia tissue cultures*. Acta Botanica Acad. Sci. Hung. 24 (3-4): 351.