

Acción del hongo *Helminthosporium saccharii* en la acumulación de alcaloides en suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* G Don

M. RODRÍGUEZ¹, A. LAGUNA¹, S. BORREGO¹, M. A. PADRÓN², P. SIERRA² Y E. ALVAREZ¹

¹ Departamento de Metabolitos Secundarios, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado 6880, La Habana, Cuba

² Dirección de Ciencia y Técnica, MINSAP, 29 y E, Vedado, La Habana, Cuba

Recibido en noviembre de 1987

RESUMEN

Se ha demostrado que cuando se produce un estrés en la células vegetales, se estimula o induce la producción de metabolitos secundarios; para lograr estos fines se han empleado, fundamentalmente, agentes químicos y biológicos. En el presente trabajo se adicionó un homogeneizado del hongo *Helminthosporium saccharii* a una suspensión celular de *Catharanthus roseus* (L) G Don, para observar su efecto sobre la estimulación de la producción de alcaloides en dicha especie vegetal. Se realizaron diversas determinaciones químicas y biológicas en el momento de la inoculación del hongo, y a los 4, 8 y 12 días posteriores a su inoculación. Los resultados evidenciaron un ligero incremento de la producción de alcaloides por la suspensión de *C. roseus* inoculada, observándose que la tetrahydroalstonina fue el alcaloide mayormente producido en todos los tiempos de incubación.

SUMMARY

It has been demonstrated that if an artificial stress is produced to plant cells, the production of secondary metabolites can be induced or stimulated. Chemical and biological agents are used mainly for this purpose. In the present work an homogenized culture of the fungus *Helminthosporium saccharii* was added to a cell suspension of *Catharanthus roseus* (L) G Don, to test the possible stimulation of alkaloids production by the cells. Some different biological and chemical analysis were done at 0, 4, 8 and 12 days after the inoculation of the fungus. The results showed a positive effect of the fungus over the alkaloid production of the cell line of *C. roseus*, in which tetrahydroalstonine (THA) was the alkaloid more significantly accumulated in all the incubation times.

INTRODUCCION

La producción de alcaloides por suspensiones celulares de *C. roseus* (L) G Don es de gran interés económico, en virtud del valor de algunos compuestos presentes en la planta, utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades, especialmente la vinblastina y la vincristina, alcaloides utilizados desde la década del 60 como antitumorales (Svoboda 1958, Noble *et al.*,

1958). Es por esa razón que diversos autores centran sus esfuerzos en la utilización de métodos que conduzcan a un aumento en los rendimientos de los alcaloides presentes en los cultivos de células vegetales de esta especie *in vitro* (Carew, 1965), así como para estimular la producción de otros aún no detectados (Amino *et al.*, 1984; Fanh *et al.*, 1985).

A principios de la presente década, Wolters y Eilert (1982), realizaron los primeros trabajos en la estimulación o inducción de la acumulación de alcaloides en cultivos de células vegetales por sustancias fúngicas. Posteriormente se utilizaron varios microorganismos y compuestos químicos, con el fin de aumentar la acumulación de alcaloides en el cultivo de células de *Papaver somniferum* con buenos resultados (Eilert *et al.*, 1985).

El objetivo del presente trabajo fue conocer si un homogeneizado del hongo *H. saccharii* adicionado a una suspensión celular de *C. roseus* (L) G Don era capaz de provocar un estrés en la célula, lo que conduciría a un aumento de la producción de alcaloides, ya sea de los que normalmente son producidos por dicha suspensión, o de otros no reportados anteriormente para la misma.

MATERIALES Y METODOS

Preparación del homogeneizado fúngico

Un cm² del micelio del hongo *H. saccharii* crecido en placas que contienen el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), pero sin la presencia de hormonas (MS-), fue inoculado en erlenmeyers con 100 ml de MS líquido incubado en zaranda a 150 rpm, luz continua (80 lux) durante seis días a 25 °C. El micelio en este medio fue homogeneizado mediante sonicación durante cuatro horas y sometido a autoclave durante 20 minutos a 121 °C, lográndose así la preparación del elicitor.

Inoculación de la suspensión celular

Se utilizó una suspensión celular de *C. roseus* (clasificada como C8) de 7 días, subcultivada semanalmente en medio MS. A cada 40 ml de esta suspensión se le añadieron 0,25 ml de homogeneizado del hongo. Las muestras se mantuvieron en zaranda a 150 rpm con 80 lux de iluminación continua y 25 °C durante el tiempo que duró la experiencia.

Determinaciones biológicas

Se determinó el porcentaje de viabilidad, el número de células por mililitro, masa húmeda, masa seca gravimétrica, índice de refracción, conductividad y pH en el momento de inoculación, así como a los 4, 8 y 12 días posteriores a esta. Se analizó también una muestra de la suspensión celular tomada como referencia.

Extracción de los alcaloides

Mediante filtración se separó la biomasa del sobrenadante, procesándose ambas partes por separado de la siguiente forma:

- la cantidad de biomasa obtenida se sonicó con MeOH durante una hora, se filtró y el MeOH fue evaporado a sequedad con vacío; el residuo así obtenido se extrajo con ácido tartárico al 2 %. La solución ácida se "basificó" a pH 9 con hidróxido de amonio, después la solución se extrajo con acetato de etilo en varias ocasiones, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniéndose el crudo de alcaloides de los mismos.

Análisis de los alcaloides presentes

Los crudos totales obtenidos mediante el procedimiento anterior fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución, utilizando detección UV a 254 nm, columna LiChrosorb RP - 18 (10 µm) de 25 cm de largo por 4 mm d.i., eluyéndose con MeOH / agua / TEA en relación 72/28/0,1 con un flujo de 0,7 ml/min

RESULTADOS Y DISCUSION

La línea celular de *C. roseus* empleada en este trabajo presentaba su fase de crecimiento acelerado a partir del tercer día, alcanzando el máximo valor al séptimo (figura 1). En este punto se adicionó el homogeneizado fúngico, pues se ha demostrado que la producción de los alcaloides de interés comienza a partir de este momento y continúa hasta después de la caída brusca en el número celular (Staba 1980, Merillon 1982).

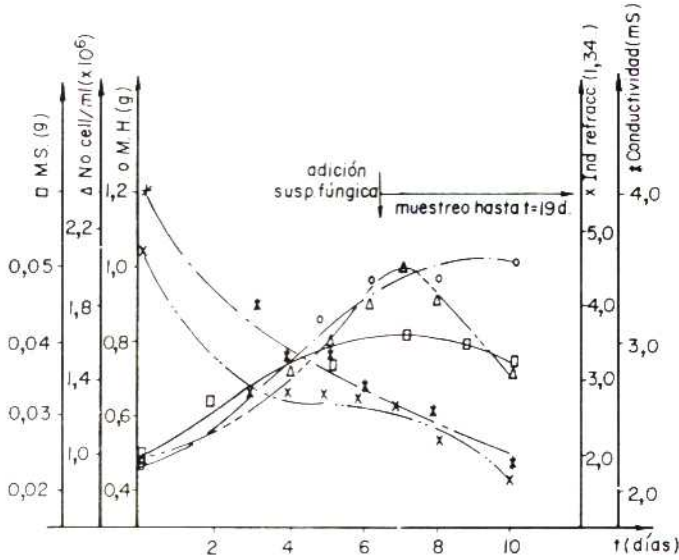


FIG. 1. Variación de varios parámetros con el tiempo, incluyendo el momento de adición del *H. saccharii* a la suspensión celular de *C. roseus*.

Después de añadir el homogeneizado fúngico, los valores de masa húmeda y masa seca (figura 1), así como el pH del medio (figura 2) no evidenciaron diferencias significativas con las del control; esto concuerda con lo reportado anteriormente por Eilert *et al.*, (1984).

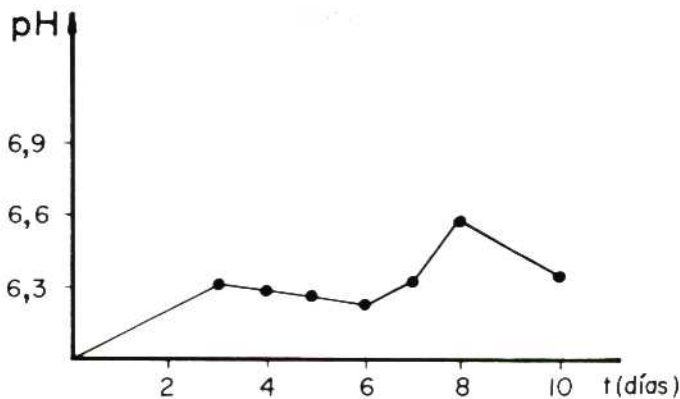


FIG. 2. Variación del pH con el tiempo en la suspensión estudiada.

El consumo de sales y azúcares reductores se comportó normalmente (figura 1), disminuyendo su concentración en el medio a medida que aumenta el crecimiento celular. En cuanto a la viabilidad, se comenzó el experimento con el 88 % de las células viables, alcanzándose al quinto día un valor superior al 90 %, y con posterioridad nuevamente un decremento hasta el 75 % (figura 3), a causa, fundamentalmente, de la disminución de la concentración de nutrientes en el medio.

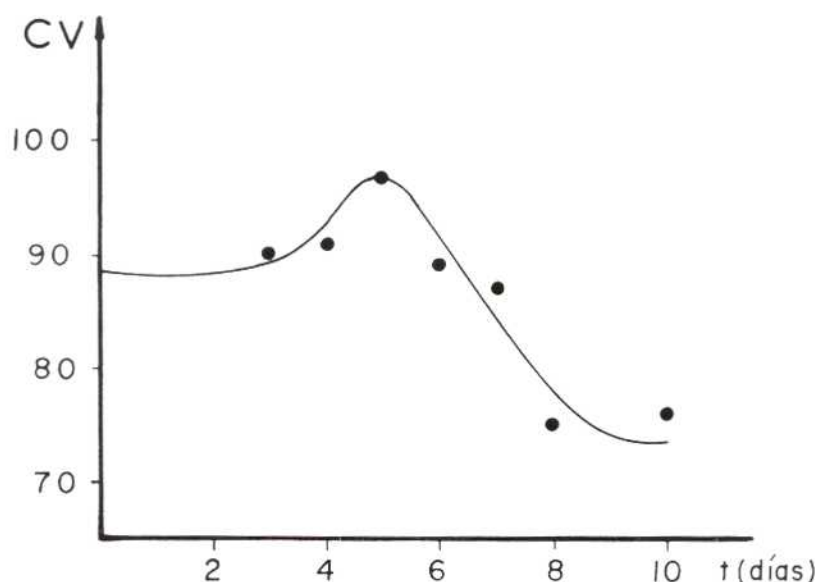


FIG. 3. Variación de la viabilidad de las células con el tiempo en la suspensión estudiada.

En la tabla 1 se reportan los rendimientos de alcaloides en las biomásas, tanto para la suspensión de referencia como para las inoculadas con el hongo, encontrándose dichos rendimientos en correspondencia con lo reportado en la literatura por otros autores (Kurz *et al.*, 1980; Kutney *et al.*, 1981) para diferentes líneas celulares de *C. roseus*. A partir del cuarto día se observó un incremento en la producción de alcaloides, tanto en la biomasa como en el sobrenadante, sin embargo, ya a los 12 días las diferencias no son tan marcadas.

Tabla 1
RENDIMIENTOS DE ALCALOIDES EN LAS BIOMASAS DE LAS SUSPENSIONES CELULARES ESTUDIADAS

Tiempo post-inoculada (días)	Control		Inoculada			
	peso seco (mg)	crudo alcaloide (mg)	por ciento	peso seco (mg)	crudo alcaloide (mg)	por ciento
0	51,9	0,3	0,58	51,9	0,3	0,58
4	136,9	0,8	0,58	65,4	0,3	0,61
8	118,4	0,7	0,59	108,5	0,7	0,64
12	179,9	1,1	0,61	150,9	1,0	0,66

En las figuras 4, 5, 6 y 7, se muestran los cromatogramas de las biomazas y los sobrenadantes de las suspensiones tratadas con el hongo y la referencia; al momento de inocular el hongo (figura 4), se observó muy poca presencia de alcaloides en el sobrenadante, y en la biomasa se observó la presencia de yohimbina, vindolinina y tetrahidroalstonina, alcaloides comunes a las suspensiones celulares de *C. roseus* (Kutney, 1981), pero estos se encontraban en muy bajas concentraciones.

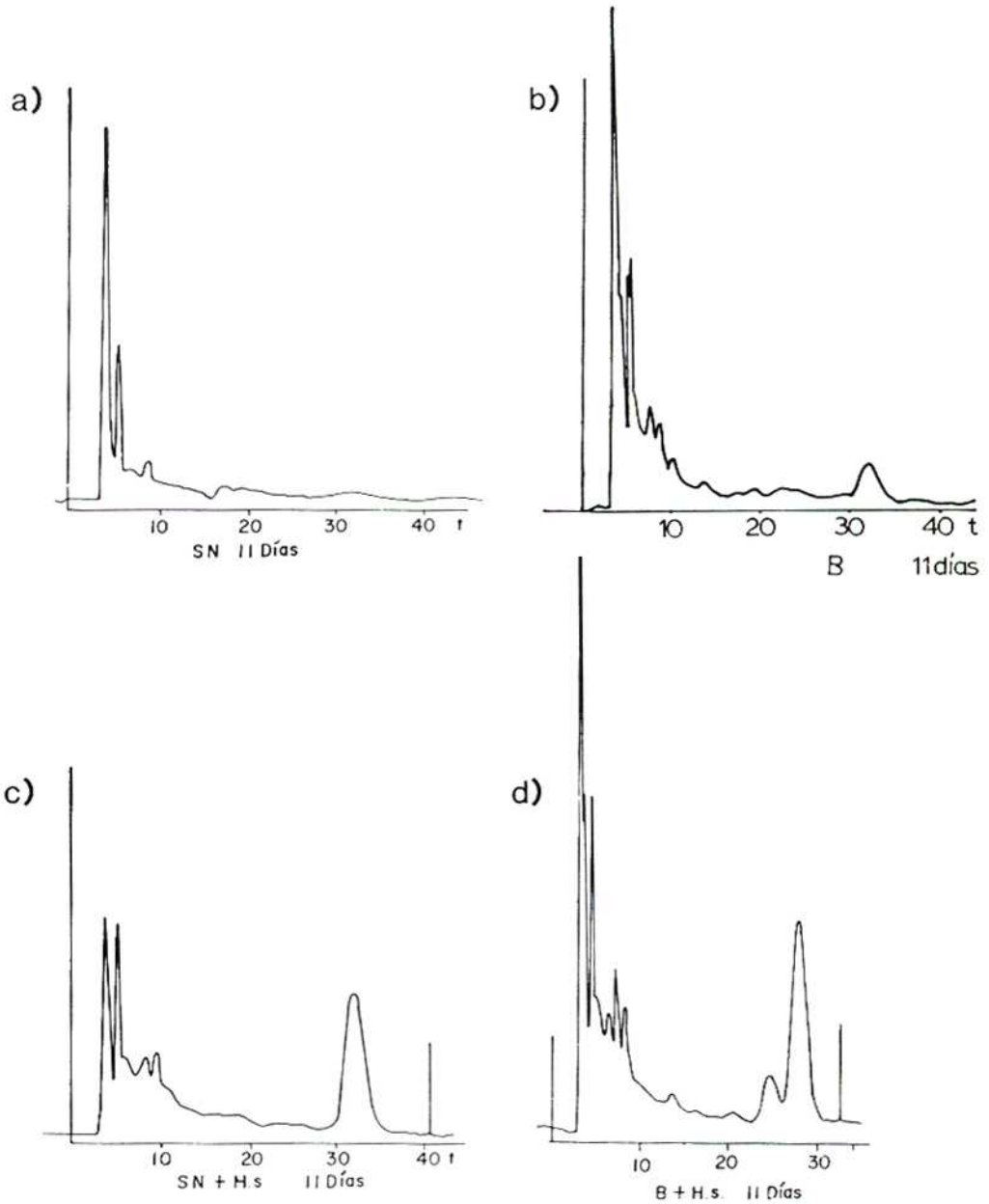


FIG. 4. Cromatogramas de la biomasa y el sobrenadante en el momento de inoculación del hongo.

A los 4 días después de inoculado el hongo, se observó en el sobrenadante un aumento marcado de la concentración de THA con respecto al control (figura 5), lo que debe estar asociado a la permeabilidad de la pared celular, que permite la excreción de dicho alcaloide al medio. En el caso de la biomasa se cuadruplicó la concentración de THA y pleiocarpamina respecto a la suspensión de referencia.

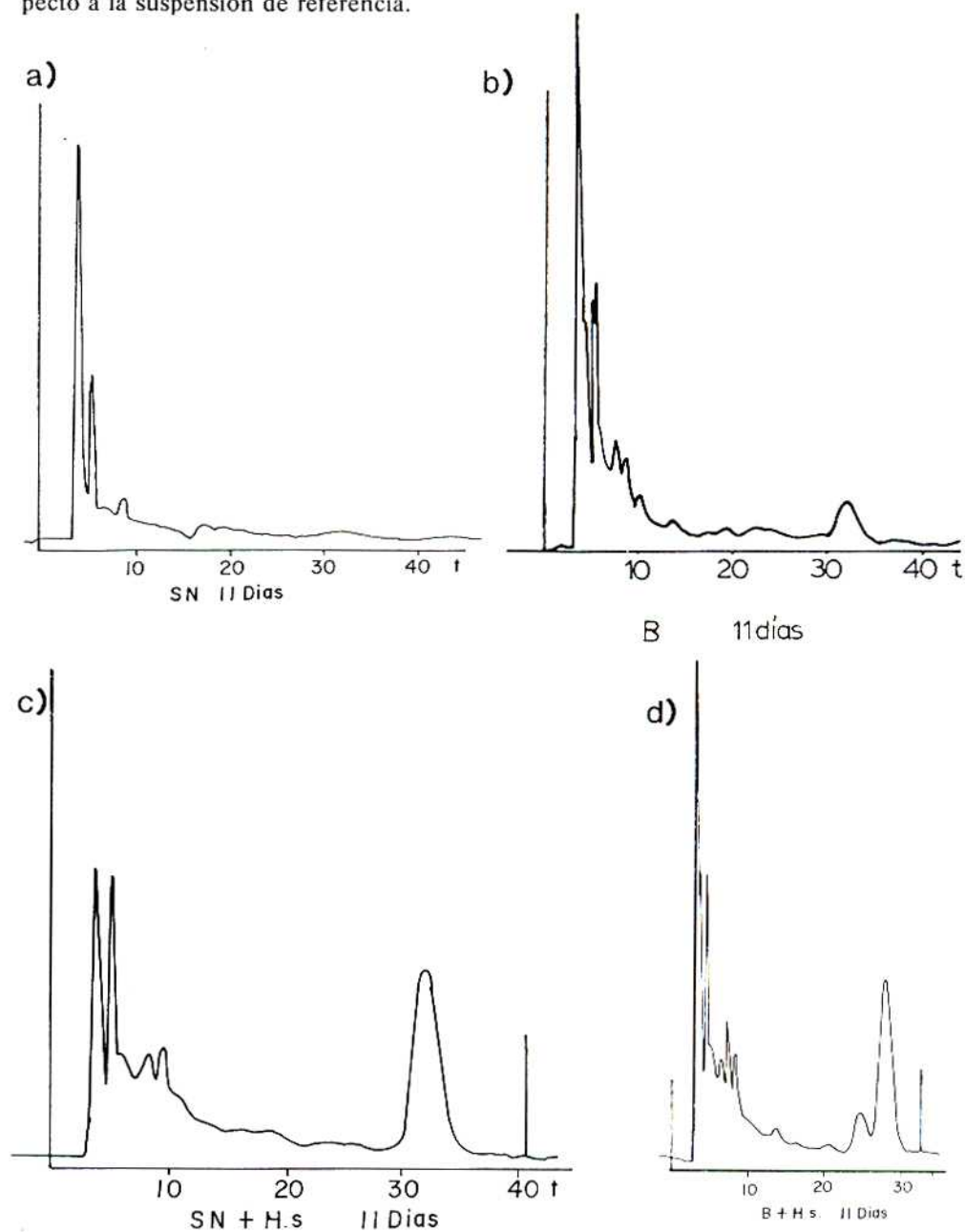


FIG. 5. Cromatograma de los extractos de la biomasa y el sobrenadante, tanto de la referencia como de la suspensión inoculada a los cuatro días post-inoculación.

En el octavo día posterior a la inoculación, la concentración de THA en el sobrenadante fue mayor que en el control, pero representó sólo el 30% de la concentración observada a los 4 días de inoculado; esto se corresponde también con lo observado para la biomasa (figura 6), donde la concentración de THA disminuye respecto a la suspensión de 4 días con el hongo.

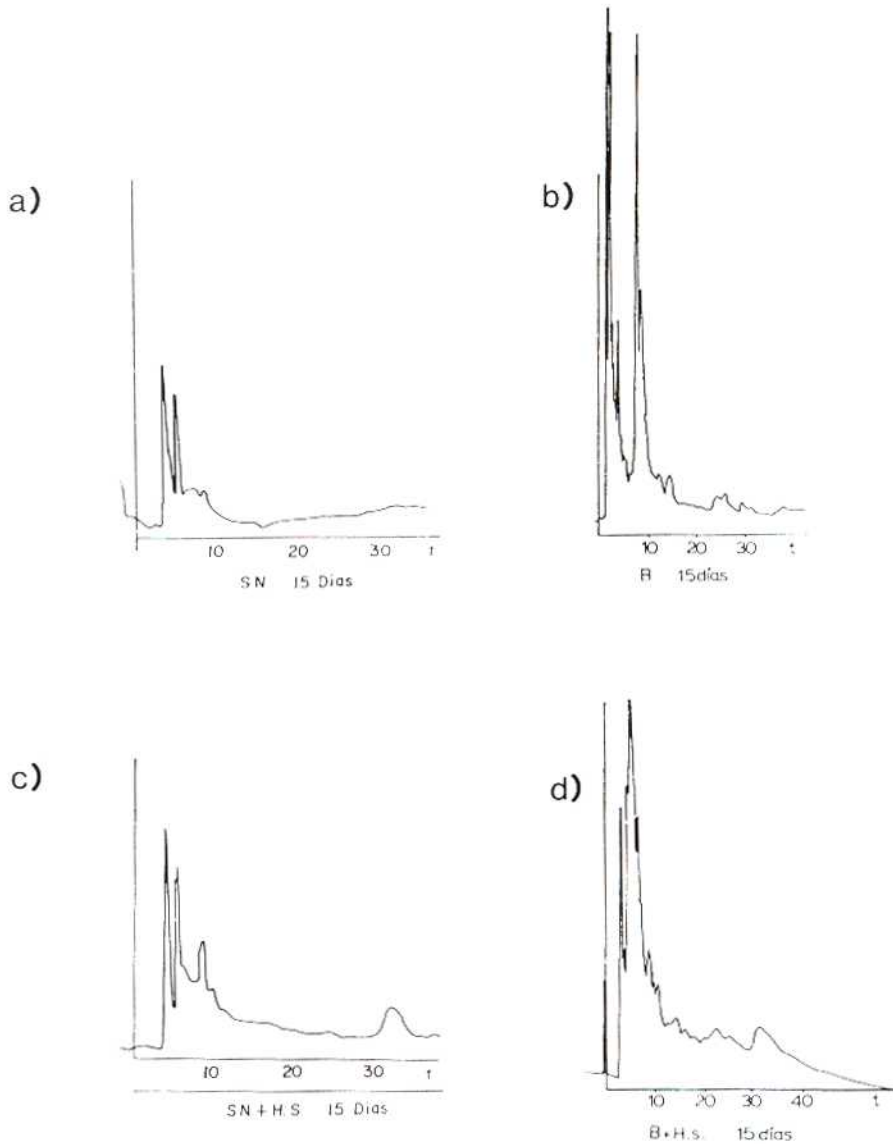


FIG. 6. Cromatogramas de los extractos de biomasa y los sobrenadantes, tanto de la referencia como de la suspensión inoculada a los ocho días post-inoculación.

A los 12 días post-inoculación, continuó observándose el incremento de THA en el sobrenadante; en el caso de la biomasa se observó también el incremento de este compuesto al igual que la pleiocarpamina, pero en este caso representó solamente el doble con respecto a la suspensión de referencia para ambos alcaloides (figura 7).

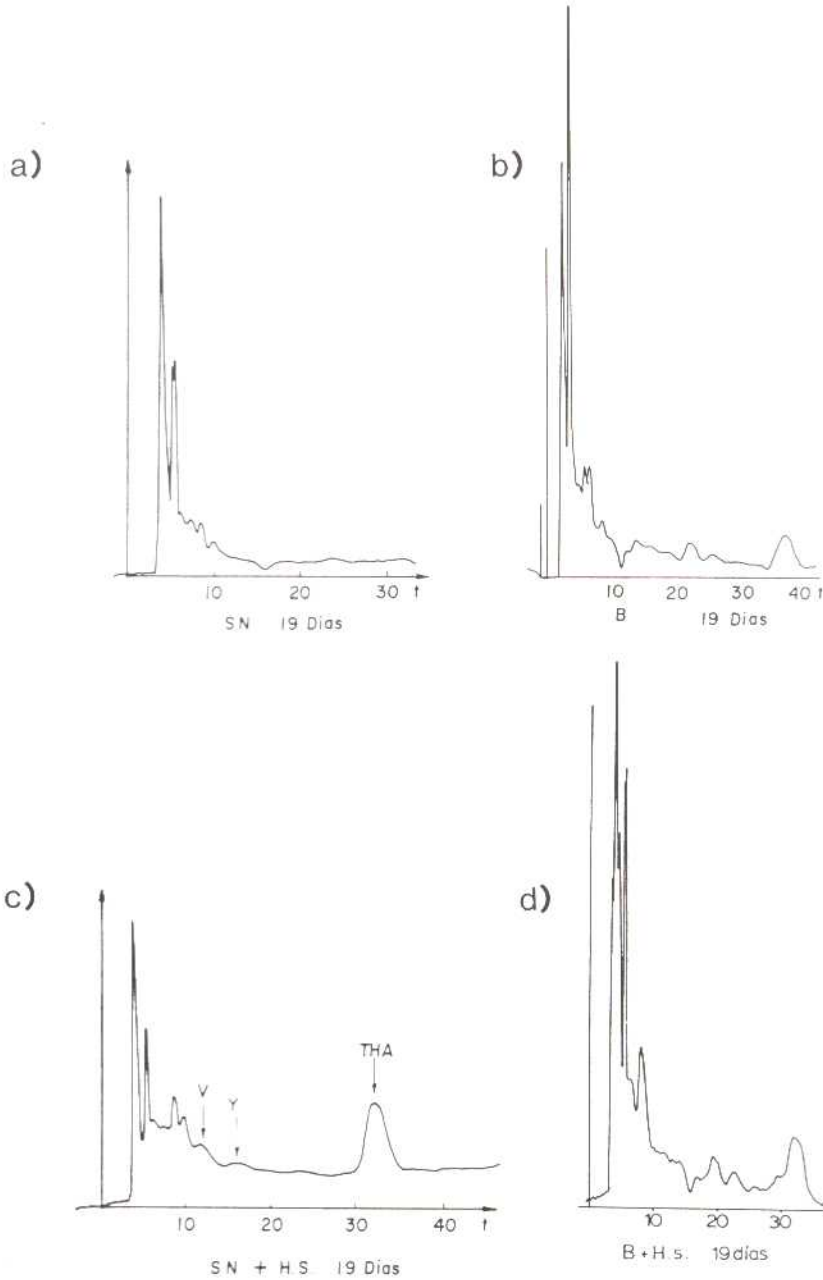


FIG. 7. Cromatogramas de los extractos de la biomasa y el sobrenadante, tanto de la referencia como de la suspensión inoculada a los 12 días post-inoculación.

Tal y como hemos señalado, al comparar las figuras 5 - 7, la inoculación del hongo *H. sachari* provocó un incremento brusco en la producción de THA por las células, así como también de pleiocarpamina. Esta producción fue disminuyendo con el tiempo de incubación en presencia del hongo, llegando, de valores cuatro veces mayores que la referencia a los 4 días, a sólo el doble al cabo de los 12 días. Se observó la presencia de THA en el sobrenadante, independientemente de los tiempos de inoculación del hongo. Además, se observó la presencia de otros alcaloides en las muestras tratadas con el hongo respecto a las de referencia, pero los mismos no fueron identificados por no contarse con patrones de estos, ni con mayor cantidad del material en estudio.

CONCLUSIONES

La presencia del homogeneizado fúngido en la suspensión celular de *C. roseus* (L) G Don provocó un ligero aumento de la producción de alcaloides, así como un incremento en el contenido de vindolinina, yohimbina y fundamentalmente tetrahidroalstonina en los distintos tiempos post-inoculación estudiados.

La presencia del hongo *H. sacharii* provocó, además, la excreción de otros alcaloides al sobrenadante, algunos de ellos en cantidades minoritarias, lo que no se produce con frecuencia en este tipo de cultivo.

REFERENCIAS

- AMINO, S. I.; Y. TAKEUCHI y A. KOMANINO (1984). *Changes in cell wall constituents during the cell cycle in a synchronous culture of C. roseus*. *Physiol plantarum* **60**: 326.
- CAREW, D. R. y J. STABA (1965). *Plant Tissue Culture, its fundamental applications and relationship to medicinal plants*. *Lloydia* **28**: 1-26.
- EILERT, U.; W. G. W. KURZ y F. CONSTABEL (1985). *Stimulation of sanguinarine accumulation in Papaver somniferum cell culture by fungal elicitors*. *J. Plant. Physiol.* **119**: 65-76.
- FAHN, W.; E. LAUBERMAIR; B. NEUSSE-NEUMANN y J. STOCKIGT (1985). *Late enzymes on vincoline biosynthesis*. *Plant Cell Reports* **4**: 337-340.
- KURZ, W. G. W.; K. B. CHATSON; F. CONSTABEL; J. P. KUTNEY; L. S. L. CHOI; P. KOLODZIEJCZYK; S. K. SLEIGH; K. L. STUART y B. R. WORTH (1980). *Alkaloid production in C. roseus cell culture. III. Catharantine and other alkaloids from the 200 GW cell line*. *Heterocycles* **14**: 765-769.
- KUTNEY, J. P. (1981). *Studies on Plant Tissue Culture*. *Heterocycles* **15**: 1405-1431.
- KUTNEY, J. P.; L. S. L. CHOI; P. KOLODZIEJCZYK; S. K. SLEIGH; K. L. STUART y B. R. WORTH (1980). *Alkaloid production in C. roseus cell culture. Initial sources on cell lines and their alkaloid content*. *Phytochemistry* **19**: 2583-2587.
- MERILLON, J. M.; J. C. CHENIEUX y M. RIDEAU (1983). *Cinetique de croissance, evolution du metabolisme glucidoazote et accumulation alcaloïdique dans une suspension cellulaire de Catharanthus roseus*. *J. Med. Plant. Res.* **47**: 169-176.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plantarum* **15**: 473-497.
- NOBLE, R. L.; C. T. BEER y J. H. CUTTS (1958). *Role of change observation in chemotherapy: Vinca rosea*. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **76**: 882-840.
- STABA, E. J. (1980). *Plant tissue culture as a source of biochemicals* Capítulo III, pp.59-97, CRC Press, USA.
- SVIBODA, G. H. (1958). *A note on several new alkaloids from Vinca rosea Linn: Leurosine, virosine, perivine*. *J. Amer. Phar. Assoc. Sci. Ed.* **47**: 834-840.
- WALTERS, B. y U. EILERT (1982). *Acridone epoxidegehalte in kallus kulturen von Ruta graveolens und ihre steigerung durch misch kultur mit pflezn*. *Z. Naturforschg* **37c**: 575-583.