

Efecto de la aplicación de elicitores sobre la producción de 4β-hidroxiwithanólido E, en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L.

Yineth Piñeros-Castro¹, Ángela Otálvaro-Álvarez^{2*}, Mario Velásquez-Lozano^{2*}

¹Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Carrera 4 # 22-60, Bogotá, Colombia.
²Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 # 45-03, Bogotá, Colombia.

yineth.pineros@utadeo.edu.co

*amotalvaro@unal.edu.co; mevelasquezl@unal.edu.co

Recibido: 25-01-2008; Aceptado: 16-07-2009

Resumen

Objetivo: Estudiar la producción del metabolito 4β-hidroxiwithanólido E, mediante el cultivo in vitro de raíces transformadas de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y evaluar el efecto de la influencia de la aplicación de diferentes elicitores sobre la producción de dicho metabolito. **Materiales y métodos:** Se obtuvieron raíces transformadas de *Physalis peruviana* L. mediante infección con *Agrobacterium rhizogenes* C106. Se cultivaron las raíces transformadas en medio líquido Murashige & Skoog, durante cuatro semanas, al cabo de las cuales se aplicaron diferentes concentraciones de sulfato de cobre, ácido salicílico y ácido jasmónico durante 24 horas. Se cuantificó el contenido del metabolito por cromatografía líquida. **Resultados:** Al cuantificar la producción de 4β-hidroxiwithanólido E presente en los tejidos se encontró la mayor producción (0,323 mg/g raíces secas) luego de aplicar ácido salicílico a una concentración de 10 mM como elicitore. **Conclusiones:** Se logró aumentar la producción de 4β-hidroxiwithanólido E mediante la aplicación de elicitores tales como ácido salicílico y sulfato de cobre, en raíces de uchuva transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*. La mayor concentración del metabolito obtenida corresponde a 1,538 veces la encontrada en las raíces sin tratamiento con elicitores.

Palabras clave: elicitores, 4β-Hidroxiwithanólido E, *Physalis peruviana* L., raíces transformadas.

Abstract

Effect of elicitor application on the production of 4-β-hydroxy withanolide E by hairy roots of *Physalis peruviana*. **Objectives:** To study the metabolite 4-β-hydroxy withanolide E production by the in vitro culture of golden berry (*Physalis peruviana* L.) transformed roots, and to evaluate the effect of different elicitors on the metabolite production. **Materials and methods:** Hairy roots of *Physalis peruviana* L were obtained through infection with *Agrobacterium rhizogenes* C106. Hairy roots were cultured on Murashige & Skoog liquid medium for four weeks, before being exposed to different concentrations of copper sulfate, salicylic acid and jasmonic acid during 24 hours. Metabolite contents were quantified using High Performance Liquid Chromatography. **Results:** The highest amount of 4-β-hydroxy withanolide E in hairy root tissues (0.323 mg/g of dry roots) was obtained after exposing the tissues to 10 mM salicylic acid as elicitor. **Conclusions:** 4-β-hydroxy withanolide E production in hairy roots was improved by using elicitors such as salicylic acid and copper sulphate. The highest concentration of the metabolite in hairy roots treated with elicitors was 1.538 times the control concentration (without elicitor treatment).

Key words: elicitors, hairy roots, 4-β-hydroxy withanolide E, *Physalis peruviana* L.

Resumo

Efeito da aplicação de elicitores sobre a produção de 4 β -hidroxiwithanólido E, em raízes transformadas de *Physalis peruviana* L.
Objetivo: Estudar a produção do metabolito 4 β -hidroxiwithanólido E em cultivo *in vitro* de raízes transformadas de "uchuva" (*Physalis peruviana* L.) e avaliar o efeito da influência da aplicação de diferentes elicitores na produção deste metabolito. **Materiais e métodos:** Foram obtidas raízes transformadas de *Physalis peruviana* L. através da infecção com *Agrobacterium rhizogenes* C106. Cultivaram-se durante quatro semanas as raízes transformadas em meio líquido Murashige & Skoog, depois se aplicaram diferentes concentrações de sulfato de cobre, ácido salicílico e ácido jasmônico durante 24 horas. Quantificou-se o conteúdo do metabolito por cromatografia líquida. **Resultados:** Ao quantificar a produção de 4 β -hidroxiwithanólido E presente nos tecidos encontrou-se a maior produção (0,323mg/g raízes seca) após aplicação do ácido salicílico a uma concentração de 10 mM como elicitor. **Conclusões:** Aumentou-se a produção de 4 β -hidroxiwithanólido E aplicando elicitores como o ácido salicílico e sulfato de cobre, nas raízes de *Physalis peruviana* L. transformadas com *Agrobacterium rhizogenes*. A maior concentração do metabolito é 1,538 vezes a encontrada nas raízes não tratadas com elicitores.

Palavras chave: elicitores, 4 β -Hidroxiwithanólido E, *Physalis peruviana* L., raízes transformadas.

Introducción

La uchuva (*Physalis peruviana* L.) perteneciente a la familia *Solanaceae*, ha sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico por sus características terapéuticas. Su actividad se atribuye a la presencia de withanólidos, compuestos químicos reconocidos por sus propiedades medicinales. La withaferina A, aislada a partir de *Withania somnifera*, una planta proveniente de la India ha mostrado actividad citotóxica contra células tumorales en humanos (1). Se ha estudiado la efectividad de tres withanólidos provenientes de *Acnistus arborescens* sobre un panel de líneas humanas de células cancerosas, entre otras: BC-1 (cáncer de mama), Lu1 (cáncer de pulmones), KB (carcinoma epidérmico), KB-V1 (líneas celulares resistentes a la vinblastina) y LNCaP (cáncer de la próstata de dependencia hormonal) (2).

De *Physalis angulata* se han aislado withanólidos con actividad para el tratamiento de enfermedades tropicales causadas por protozoarios, tales como la enfermedad de Chagas

producida por *Trypanosoma cruzi* y leishmaniasis por *Leishmania amazonens* (3).

También se han estudiado las actividades de whitanólidos presentes en *Physalis philadelphica*, especialmente contra cáncer realizando ensayos *in vitro* para determinar la inducción de quinona reductasa y la inhibición de células epiteliales JB6 (4),(5).

Relacionando los whitanólidos con mecanismos químicos de defensa de las plantas, se ha investigado su actividad antialimentaria sobre poblaciones de insectos (6). El 4 β -hidroxiwithanólido E, es uno de los withanólidos presentes en *Physalis peruviana* L. (7). Dicho compuesto fue aislado anteriormente desde plantas cultivadas en la sabana de Bogotá y producido en raízes de *Physalis peruviana* L. cultivadas *in vitro* (8).

En la figura 1, se puede observar la estructura molecular del El 4 β -hidroxiwithanólido E.

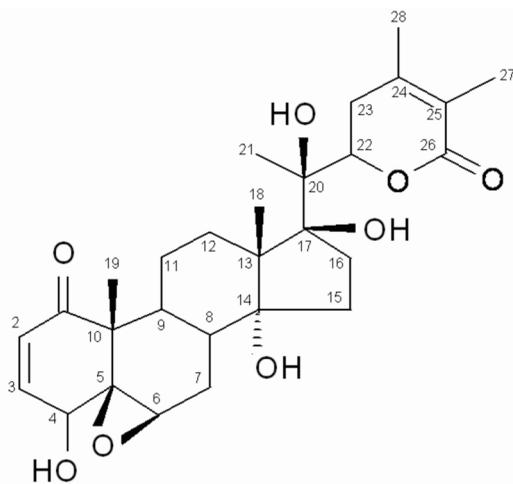


Figura 1. Estructura química del 4 β -hidroxiwithanólido E

En trabajos posteriores realizados en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia se ha investigado la transformación de las raíces de *Physalis peruviana* L., mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* como alternativa para la producción de raíces adventicias capaces de sintetizar 4β-hidroxiwithanólido E. Resultados previos han demostrado que la velocidad de crecimiento de las raíces transformadas es mayor comparada con la de las no transformadas (9).

La modificación de las raíces mediante infección con *Agrobacterium rhizogenes* ha sido planteada como una estrategia para incrementar la producción de biomasa y por lo tanto de metabolitos secundarios en plantas cultivadas *in vitro*; además de ésta, se han estudiado la adición de precursores y otras estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios, resultando la “elicitación” una de las más exitosas. Ésta consiste en aplicar estrés físico o químico a las suspensiones celulares y/o los tejidos para que aumente la producción de metabolitos secundarios a niveles que normalmente no se producen. Existen elicitores bióticos (quitosan, micelio de hongos, bacterias y levaduras) y abióticos (temperatura, Luz UV, sales de metales pesados, pH, etc.) (10, 11). Dentro de los elicitores bióticos, además de algunos microorganismos y los extractos de los mismos empleados comúnmente, es posible considerar moléculas que actúan como señales endógenas en los mecanismos de defensa de las plantas, tales como el ácido salicílico y el ácido jasmónico entre otros. De otro lado, dentro del grupo de elicitores abióticos se encuentran sustancias que pueden ocasionar cambios osmóticos al cultivo como lo hacen iones metálicos, dando lugar a uniones indiscriminadas con algunos constituyentes biológicos de las células que alteran el funcionamiento de las mismas y favoreciendo la liberación de los metabolitos al medio de cultivo (9).

La aplicación de elicitores como estrategia biotecnológica es de importancia en el estudio de los procesos relacionados con el cultivo de material vegetal, puesto que permite alcanzar mayor productividad de algunos metabolitos secundarios, generar conocimiento sobre las respuestas fisiológicas de las plantas y desarrollar estrategias para la purificación y extracción simultánea de metabolitos de origen vegetal, producidos *in vitro* mediante el cultivo de tejidos vegetales.

Materiales y métodos

Material biológico

La especie vegetal utilizada para inducir el crecimiento de raíces transformadas y producción 4β-hidroxiwithanólido

E fue *Physalis peruviana* L., fenotipo Colombia, perteneciente a la familia *Solanaceae* y proveniente de la sabana de Bogotá. Para el trabajo se utilizaron segmentos de raíces transformadas mediante *Agrobacterium rhizogenes* C106, mantenidas en medio líquido Murashige & Skoog (12).

Medio de cultivo y condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron sobre medio Murashige & Skoog (MS) (12), suplementado con sacarosa (30 g/L). Todos los reactivos usados fueron de grado analítico Merck y Sigma Plant Cell Culture Reagents. El medio se ajustó a pH 5,8. Los segmentos de raíces adventicias se cultivaron en frascos de vidrio transparente de 100 mL de capacidad, con 10 mL de medio (MS) líquido cada uno. Los frascos se cubrieron con papel aluminio y se agitaron de forma orbital a 70 rpm, en completa oscuridad a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 4 semanas. Posteriormente se llevó a cabo la aplicación de elicitores.

Elicitores

Como agentes de elicitación se utilizaron sulfato de cobre (Merck) 0,1 y 0,2 mM, ácido jasmónico (Sigma Aldrich) 0,1 mg/L y 1 mg/L y ácido salicílico (Merck) 1 y 10 mM. El tratamiento con los elicitores se realizó durante 24 horas, adicionando dichas concentraciones al medio de cultivo presente y manteniendo las demás condiciones (oscuridad, agitación orbital de 70 rpm y temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Estándar de 4β-hidroxiwithanólido E

Para la cuantificación se contó con un sustancia aislada de raíces confirmada por resonancia magnética nuclear (RMN) como 4β-hidroxiwithanólido E (ensayos resonancia nuclear de ^1H , ^{13}C , análisis COSY, HMBC y HMQC) en la Universidad de Córdoba (Argentina) (8).

Extracción de 4β-hidroxiwithanólido E

Luego del proceso de elicitación, las raíces se secaron a temperatura ambiente durante 4 días. Se maceraron 100 mg de raíces secas y se colocaron en 20 mL de agua en ebullición por 20 minutos para extraer el metabolito. Posteriormente cada muestra se filtró y el agua se evaporó hasta sequedad, luego se adicionaron 15 mL de acetato de etilo, se homogeneizó y pasó a través de una columna de sílica gel 60 (Merck), usada con el fin de purificar la muestra. Después del paso de la muestra por la columna de purificación el solvente se evaporó y a continuación se adicionaron 2 mL de la fase móvil para redissolver la muestra y someterla a análisis por cromatografía líquida (CLAE).

Análisis cuantitativo de 4β-hidroxiwithanólido E por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

Para este análisis se empleó un equipo Waters® (Waters, Milford, MA, USA), con detector de absorbancia UV 486 a 225 nm. Todos los datos se procesaron mediante el software Millennium 2.15.01 de Waters (Milford, MA, USA).

Se utilizó como fase móvil una solución 65% en volumen de acetonitrilo grado CLAE (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) y 35% de agua grado CLAE (MilliQ). El flujo se mantuvo en 1,3 mL/min. Para el análisis se contó con una columna C₁₈ en fase reversa de 100 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro, (Chromolith Performance RP-18, Merck KGA 64271 Darmstadt, Alemania). El volumen de las muestras inyectadas corresponde a 20 µL. Los análisis se realizaron a temperatura ambiente y el tiempo de cada uno se fijó en 5 minutos.

El tiempo de retención registrado para el 4β-hidroxiwithanólido E, fue de $1,1 \pm 0,5$ minutos y su concentración en el extracto se cuantificó mediante una curva de calibración, índice de Pearson 0,994.

Análisis estadístico

Los resultados de los experimentos de elicitación se analizaron mediante una prueba de varianza simple (ANOVA). Como herramienta informática se utilizó Statgraphics Plus® de Microsoft®. Se realizaron tres réplicas por ensayo. Para la comparación de las medias se usó una prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Resultados

En la figura 2, se encuentran los datos de la producción de 4β-hidroxiwithanólido E para los diferentes tratamientos con los elicitores.

Discusión

En la figura 2 se muestran las tendencias dentro de cada tratamiento con los diferentes elicitores. De este modo es posible observar como al incrementar la concentración de los elicitores sulfato de cobre y de ácido salicílico se aprecia un aumento en la cantidad del 4β-hidroxiwithanólido E presente en las raíces. Mientras que

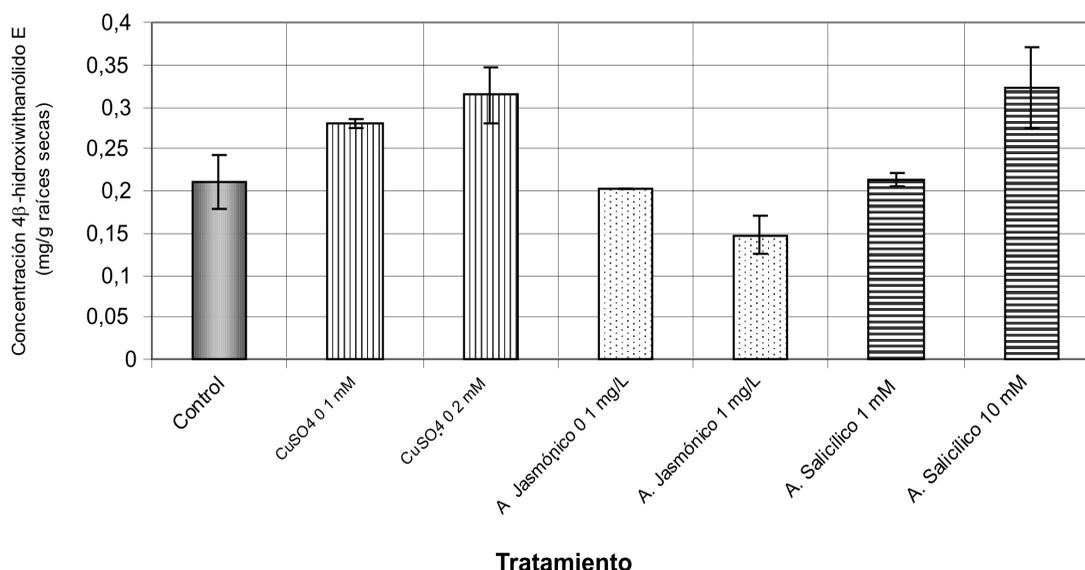


Figura 2. Concentración de 4β-hidroxiwithanólido E obtenida en raíces transformadas de *Physalis peruviana* L., sometidas a elicitación.

la aplicación de ácido jasmónico como elicitor trae como resultado la disminución en la cantidad del 4 β -hidroxiwithanólido E presente en las raíces, esta disminución es del 4% para el caso de la adición de ácido jasmónico 0,1 mM y del 29,68% para la adición del mismo elicitor a una concentración de 0,2 mM. Sin embargo, al aplicar la prueba de Tukey se encontró que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias correspondientes a los tratamientos con ácido jasmónico y el control que corresponde a la concentración del metabolito en las raíces que no recibieron tratamiento con elicitores.

De los valores encontrados para la concentración del 4 β -hidroxiwithanólido E, en cada uno de los ensayos se puede comentar que la mayor cantidad de metabolito se encontró para la prueba con ácido salicílico a una concentración de 10 mM, lográndose un aumento del 53,8% sobre la cantidad de metabolito reportada para las raíces consideradas como control. Mientras que en el caso de las raíces sometidas a elicitación con ácido salicílico 1 mM el aumento sólo fue del 1,55%.

Para los ensayos con sulfato de cobre se puede decir que en el caso de la concentración de 0,1 mM y 0,2 mM los aumentos en la concentración del metabolito sobre los valores reportados para el control fueron de 33,20% y 49,53% respectivamente.

Sin embargo al hacer la prueba de comparación de medias se encontró que los resultados obtenidos para la adición de sulfato de cobre a 0,1 y 0,2 mM y ácido salicílico 10 mM, respecto a la producción de metabolito no presentan diferencias estadísticamente significativas, como si ocurre en el caso de comparar con el blanco (prueba de Tukey al 95%).

Considerando que el ácido salicílico incrementa la producción de 4 β -hidroxiwithanólido E, y teniendo en cuenta que estudios previos han demostrado que los withanolidos participan en los mecanismos químicos de defensa de las plantas e inclusive han llegado a establecer su actividad antialimentaria en insectos (6), se puede presumir que tanto los elicitores como el metabolito producido intervienen en estos mecanismos. Suposición que encuentra soporte en las evidencias que existen sobre las interacciones entre el ácido salicílico y los mecanismos de defensa, aunque aún faltan por elucidar los componentes implicados y la forma en que estas interacciones se llevan a cabo (13).

Respecto a otros resultados obtenidos para la producción del 4 β -hidroxiwithanólido E (8), se reportó la producción de 0,127 mg/g de raíz seca para raíces de uchuva no transformadas y no sometidas a elicitación. Es decir que el valor obtenido en este trabajo con las raíces transformadas

sin ser sometidas a elicitación de 0,210 mg/g de raíz seca supera resultados anteriores.

Conclusiones

Se logró aumentar la producción del 4 β -hidroxiwithanólido E en raíces de uchuva transformadas con *Agrobacterium rhizogenes*, por medio de la aplicación de elicitores tales como ácido salicílico y sulfato de cobre. La máxima cantidad del 4 β -hidroxiwithanólido E encontrada en los tejidos fue de 0,323 mg/g de raíz seca, valor que corresponde a 1,538 veces el encontrada en las raíces sin tratamiento con elicitores. Este trabajo es pionero en las pruebas de elicitación con raíces modificadas de uchuva (*Physalis peruviana* L.), por esta razón se recomienda estudiar más detalladamente el mecanismo de acción de los elicitores estudiados sobre los tejidos de las raíces, incluyendo sus posibles acciones como liberadores del metabolito al medio de cultivo.

Agradecimientos

Se agradece a Colciencias por su Apoyo a Doctorados Nacionales Convocatoria 2005.

Financiación

Este trabajo se desarrolló bajo el proyecto "Estudio para la obtención raíces adventicias de uchuva (*Physalis peruviana* L.) mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* y evaluación de la producción de withaesteroides", código 4175, financiado por Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses.

Referencias

1. Jayaprakasam B, Zhang Y, Seeram NP, Nair MG. Growth inhibition of human tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves. *Life Sciences*. 2003; **74** (1): 125-132.
2. Minguzzi S, Barata LES, Shin YG, Jonas PF, Chai HB, Park EJ, et al. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. *Phytochemistry*. 2002; **59** (6): 635-641.
3. Guimaraes ET, Lima MS, Santos LA, Ribeiro IM, Tomassini TBC, dos Santos RR, et al. Activity of

- physalins purified from *Physalis angulata* in *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009; **64**(1):84-7.
4. Su BN, Misico R, Jung Park E, Santarsiero BD, Mesecar AD, Fong HHS, *et al.* Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. *Tetrahedron*. 2002; **58** (17): 3453-3466.
 5. Su BN, Gu JQ, Kang YH, Park EJ, Pezzuto JM, Kinghorn AD. Induction of the phase II enzyme, quinone reductase, by withanolides and norwithanolides from solanaceous species. *Mini Reviews in Organic Chemistry*. 2004; **1**: 115-124.
 6. Bado S, Mareggiani G. Withanolides from *Jaborosa odonelliana* (Solanaceae): bioactivity against agricultural pests. *Revista Latinoamericana de Química*. 2001; **29** (3): 145-150.
 7. Baumann TW, Meier CM. Chemical defence by withanolides during fruit development in *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*. 1993; **33** (2): 317-321.
 8. Velásquez ME. *Estudio de proceso para la obtención de whitanólidos a partir de cultivo in vitro de uchuva* (*Physalis peruviana L.*) Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2004.
 9. Pitta-Álvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000; **26** (2-4): 252-258.
 10. Savitha BC, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. *Process Biochemistry*. 2006; **41** (1): 50-60.
 11. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science* (Limerick). 2001; **161** (5): 839-851.
 12. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962; **15** (3): 473-497.
 13. Vivanco JM, Cosio E, Loyola-Vargas VM, Flores HE. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. 2005: 69.