Producción de taxoides en callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis* mediante el uso de elicitores abióticos

Naivy Pérez[1*], Raúl Barbón[1], Alina Capote[1], Elio Jiménez[1], Dirk Wilken[2] *Autor para correspondencia.

[1] Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: naivylisbet@yahoo.es, naivy@ibp.co.cu

[2] BioPlanta GmbH. Deutscher Platz 5. 04103 Leipzig, Germany.

RESUMEN

Varias estrategias han sido desarrolladas para incrementar la producción de metabolitos secundarios *in vitro*, tales como la manipulación de parámetros ambientales, selección de clones celulares con altos rendimientos y el uso de elicitores. En el presente trabajo fueron utilizados callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis* (líneas SN y E15), especie de gran interés para la producción de metabolitos con actividad anticancerígena. Se estudió el efecto de diferentes concentraciones de nitrato de plata (1.0; 4.0 y 8.0mg.l^{-1}) y las condiciones de oscuridad total y 12 h de luz sobre la producción de biomasa y taxoides. Las concentraciones de nitrato de plata no ejercieron igual efecto en las condiciones de iluminación estudiadas. El nitrato de plata incrementó la masa fresca en oscuridad con valores superiores a 6.0g en todos los tratamientos siendo mayor con 8.0mg.l^{-1}. La acumulación de taxuyunnanim C se favoreció con 4.0mg.l^{-1} en condiciones de luz solar (0.93mg/gMS), donde se produjo menor incremento de biomasa. Las suspensiones celulares en ambas líneas mostraron mejor crecimiento que el cultivo de callos, mientras que la mayor acumulación de Taxuyunnanin C fue en el cultivo de callos en la línea SN. Las líneas celulares tuvieron un comportamiento diferente bajo condiciones de luz. En cuanto al incremento de biomasa la línea E15 se comportó de manera superior a la SN en ambas condiciones de iluminación aunque el mayor valor de masa fresca se obtuvo en la oscuridad (7.89g) y la mayor acumulación de Taxuyunnanin C fue en condiciones de oscuridad con la línea SN (0.98 mg/gMS).

Palabras clave: cultivo de células, elicitación, metabolitos secundarios, taxuyunnanin C

Abreviaturas: gMF - Gramos de masa fresca, gMS - gramos de masa seca, $AgNO_3$ - Nitrato de plata, Tc - Taxuyunnanin C

ABSTRACT

Until now, several strategies have been developed to improve the production of secondary metabolites using plant cell cultures, manipulating the parameters of the environment, selecting high yielding cell clones and the use of elicitors. In the present work, callus and cell suspensions of *Taxus chinensis* lines SN and E15 were used, important specie for the production of metabolites with anticancer activity. The effect of different concentrations of the silver nitrate (1.0; 4.0 and 8.0mg.l-^{1}) and the conditions of total dark and 12 h artificial light about the production of biomass and the taxoids accumulation were studied. The concentrations of $AgNO_3$ used didn't cause same effect under the different conditions of illumination to those that the cultivations were exposed. The $AgNO_3$ increased the fresh weight under conditions of darkness in which superior values were obtained at 6.0g in all the treatments being bigger when using the concentration of 8.0mg (7.39g). In relation to the taxoids accumulation a bigger influence was observed with 4.0mg under conditions of light (0.93 mg/gDW), treatment where smaller increment of biomass took place. Cell suspensions in both lines showed better growth that the cultivation of callus, while the biggest accumulation in Taxuyunnanine C was in the cultivation of callus in the line SN. It was observed that the cellular lines had a different behavior in conditions of light and darkness. As for the increment of the biomass the line E15 behaved from a superior way to the line SN as much in the darkness as to the light although the biggest value of fresh weight was obtained in the darkness (7.89g) and the biggest accumulation in Taxuyunnanine C was under conditions of darkness with the line SN (0.98 mg/gDW).

Keywords: cell cultures, elicitation, secondary metabolites, taxuyunnanine C

Abbreviations: gDW - Grams of dry weight, gFW - grams of fresh weight, $AgNO_3$ - Silver nitrate, Tc - Taxuyunnanine C

INTRODUCCIÓN

El cultivo de células de plantas representa una fuente potencial para la obtención de compuestos medicinales, fragancias, colorantes, nutrientes y cosméticos (Gleba *et al*., 1999). Sus principales ventajas incluyen la síntesis de metabolitos secundarios en condiciones controladas independientemente de las

condiciones climáticas; no existe influencia biológica negativa que afecte la producción de metabolitos secundarios y es posible seleccionar cultivares con alta productividad (Vanisree y Tsay, 2004).

Sin embargo, existen pocos ejemplos exitosos de la aplicación comercial de los procesos de cultivo de células para la obtención de metabolitos secundarios. Los principales problemas son la baja productividad, la inestabilidad de las líneas celulares y la dificultad para realizar el escalado de la producción (Zhong, 2001).

El Taxus considerado el "árbol de la muerte" contiene los taxoides en la corteza y al ser eliminada para la extracción de los metabolitos el árbol muere, dichas sustancias juegan un papel muy importante dentro de las drogas de origen natural. En la última década se han realizado varios trabajos con el paclitaxel conocido comercialmente como Taxol, el cual es considerado como una de las drogas anticancerígenas de mayor importancia que ha sido usada como agente quimioterapéutico en tratamientos de cáncer de ovario y pulmón y ha mostrado una actividad clínica contra otras enfermedades notorias (Jaziri *et al*., 1996; Jennewein y Croteau, 2001; Baebler *et al.*, 2002). El Tc es una sustancia novel fisiológicamente activa y ha sido sugerida en tratamientos de Alzheimer (Cheng *et al*., 1994). Su importancia y limitada disponibilidad han incrementado el interés por el empleo de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*.

El paclitaxel y otros taxoides pueden ser producidos en diferentes sistemas de cultivo de tejidos, incluyendo callos, suspensiones celulares, brotes, raíces y cultivos embriogénicos (Ketchum *et al*., 1999; Wang *et al*., 2001).

Existen varios obstáculos para el uso de callos o cultivo de células indiferenciadas con el fin de producir metabolitos secundarios (Steven, 1998). Muchos de estos compuestos están asociados a procesos de respuesta de la planta ante cambios ambientales, daños o estrés, por lo que es lógico pensar que su producción puede ser estimulada o alterada mediante la manipulación del ambiente físico o químico (Vanisree y Tsay, 2004). La elicitación es una de las estrategias más efectiva para mejorar la productividad de metabolitos secundarios (Roberts y Shuler, 1994; Vanisree *et al*., 2004). Productos de interés han sido obtenidos mediante el empleo de elicitores bióticos y abióticos (Wang y Zhong, 2002; Dong y Zhong, 2002; Hu *et al*., 2001; Lee y Shuler, 2000). Es por ello que se desarrolló el presente trabajo que tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos elicitores abióticos que pueden influir sobre la producción de la biomasa y la acumulación de taxoides en cultivos de callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron callos de *Taxus chinensis* líneas SN y E15 provenientes del banco de germoplasma del Instituto de Bioquímica de Plantas en la Universidad de Halle, Alemania.

Los callos se multiplicaron en medio de cultivo semisólido B5+1 propuesto por Merhand (1998) en condiciones de oscuridad y temperatura 27±2°C. Las suspensiones celulares fueron preparadas en erlenmeyers de 300 ml de capacidad. Una densidad de 80gMF.l^{-1} fue inoculada en 90 ml de medio de cultivo, se realizaron subcultivos semanales y se renovó el 50 % del mismo. Las suspensiones celulares se cultivaron en agitador orbital a 100 rpm en condiciones de oscuridad a 27±2°C. En cada experimento se emplearon 10 réplicas.

Determinación del contenido de taxoides

El contenido de taxoides fue determinado a partir de la masa seca del material vegetal según el método descrito por Ketchum y Gibson (1995). Para la cuantificación de los taxoides se empleó un sistema HPLC Gynkotek (Dionex) equipado con un diodo detector (UVD 340S) y una columna LiChrocart RP18 (250mm x 4mm; 4µm).

Efecto del nitrato de plata y las condiciones de iluminación sobre la producción de biomasa y la acumulación de taxoides

Suspensiones celulares de la línea E15, en fase de multiplicación, con una densidad de inóculo de 100gMF.l^{-1} en 40ml de medio de cultivo fueron inoculadas en erlenmeyers de 300ml de capacidad. El nitrato de plata fue utilizado en tres concentraciones (1.0; 4.0 y 8.0mg.l^{-1}) determinadas en experimentos previos y un control cultivado en las diferentes condiciones de iluminación con 0mg.l^{-1} de nitrato de plata.

Las suspensiones celulares fueron mantenidas en diferentes condiciones de luz, un primer tratamiento bajo fotoperíodo de 12 horas luz, con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 42-48µmol.m^{-2}.s^{-1} y un segundo tratamiento bajo condiciones de oscuridad total a una temperatura de 27±2°C. El medio de cultivo fue renovado cada 10 días. Se evaluó el incremento de masa fresca y seca a los 45 días así como la determinación y cuantificación de taxoides según se describió anteriormente.

Efecto de las condiciones de iluminación en la multiplicación de suspensiones celulares y la acumulación de taxoides

Se utilizaron cultivos de suspensiones celulares de las líneas SN y E15. Las suspensiones celulares fueron mantenidas en diferentes condiciones de luz, un primer tratamiento bajo fotoperíodo de 12 horas luz, con una DFFF de 42-48µmol.m^{-2}.s^{-1} y un segundo tratamiento bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de 27±2°C. Se evaluó el incremento de masa fresca y seca a los 45 días así como la determinación y cuantificación de taxoides según se describió anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del nitrato de plata y las condiciones de iluminación sobre la producción de biomasa y la acumulación de taxoides

En condiciones de luz el incremento de la masa fresca fue menor respecto a la oscuridad en el que se obtuvieron valores superiores a 6.0gMF en todos los tratamientos con $AgNO_3$ así como en el control, siendo mayor con 8.0mg (7.39gMF) como se observa en la tabla 1.

La acumulación de taxoides en el grupo control y en el tratamiento con mayor concentración de $AgNO_3$ se comportó de manera similar tanto en condiciones de luz como en oscuridad; sin embargo, se observó una mayor influencia en la producción de taxoides con 4.0mg en condiciones de luz (Figura 1). Zhang *et al.* (2000) empleó como elicitor abiótico el ión Ag^+ para inducir la biosíntesis de paclitaxel en el cultivo de suspensiones celulares. Los elicitores abióticos empleados en estos estudios influyeron en la acumulación de taxoides y sus efectos varían según las líneas celulares empleadas.

Tabla 1. Efecto de la adición del Nitrato de plata y las condiciones de iluminación sobre la producción de biomasa de suspensiones celulares de *Taxus chinensis* línea E15.

Tratamientos		Biomasa	
Iluminación	$AgNO_3$ ($mg.l^{-1}$)	Masa fresca (gMF)	Masa seca (gMS)
Luz	0	3.92 c	0.29 bc
	1	5.01 abc	0.37 abc
	4	3.34 c	0.27 c
	8	4.33 bc	0.36 abc
Oscuridad	0	7.22 a	0.48 ab
	1	7.13 a	0.34 adc
	4	6.63 ab	0.51 a
	8	7.39 a	0.30 bc
Error estandar		±1.047	±0.058

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p<0.05$ según la comparación de medias mediante la Prueba Duncan.

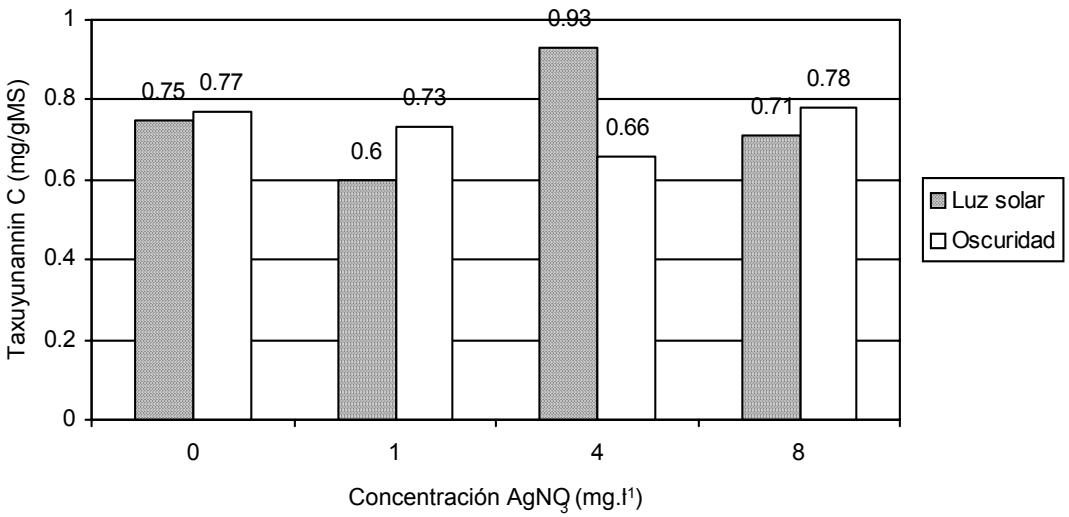

Figura 1. Efecto de la adición del Nitrato de plata y de las condiciones de iluminación sobre la acumulación de taxoides en suspensiones celulares de *Taxus chinensis* línea E15.

Como se puede observar en el tratamiento donde se produjo menor incremento de biomasa, se obtuvo la mayor acumulación del Tc. Estos resultados coincidieron con autores como Dornenburg y Knorr (1997) que plantearon que muchos productos metabólicos no están asociados con el crecimiento celular por lo que es necesario favorecer las condiciones de cultivo para la producción de biomasa y una segunda etapa para iniciar la acumulación de taxoides.

Efecto de las condiciones de iluminación en la multiplicación de suspensiones celulares y la acumulación de taxoides

En el cultivo de callos (Figura 2) y suspensiones celulares (Figura 3), la línea E15 mostró un crecimiento superior a la línea SN con diferencias significativas y alcanzó el mayor incremento en el cultivo de suspensiones, en las que no se observaron diferencias morfológicas entre las líneas celulares (Tabla 2).

Sin embargo, en el cultivo de callos de la línea SN se obtuvo la mayor acumulación de Tc (Fig. 4), lo que demuestra la marcada influencia de las líneas celulares en la síntesis de metabolitos secundarios.

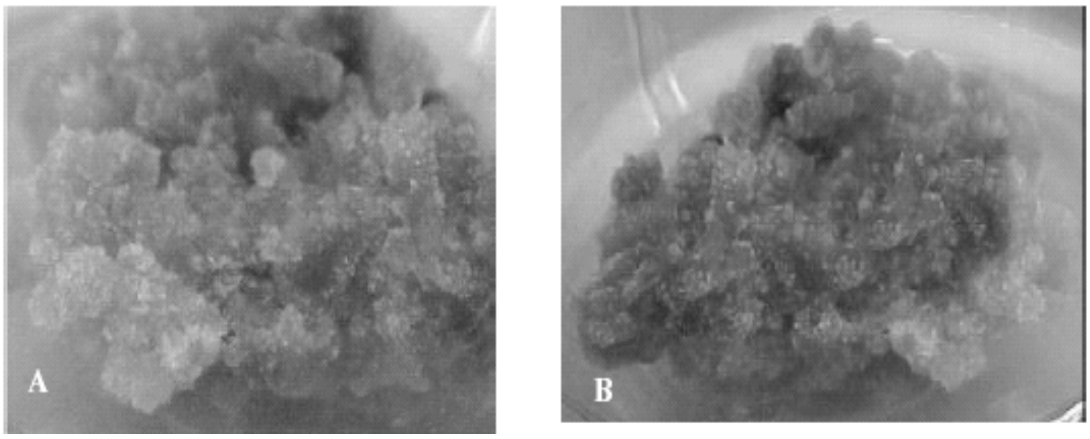

Figura 2. Callos de *Taxus chinensis* líneas E15 (A) y SN (B) cultivados en medios de cultivo semisólidos.

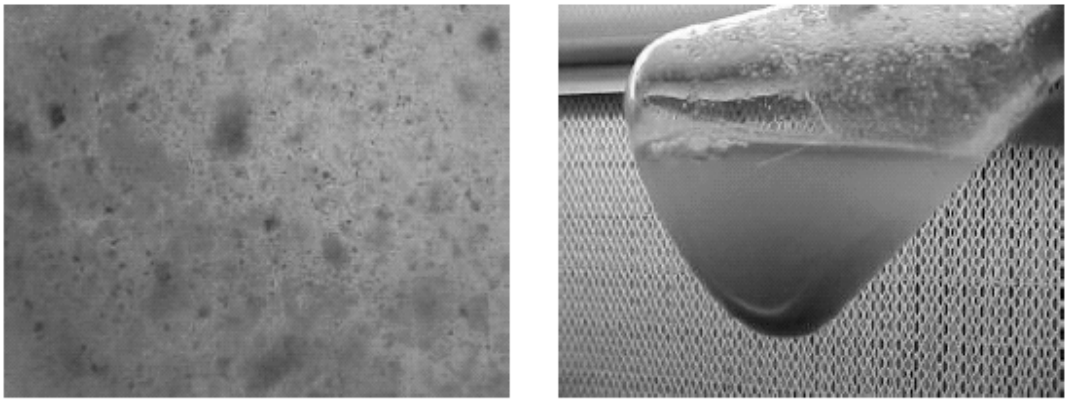

Figura 3. Suspensiones celulares de *Taxus chinensis* establecidas de callos cultivados en medios de cultivo semisólidos durante 28 días.

Tabla 2. Producción de biomasa a partir del cultivo de callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis* en las líneas SN y E15 en condiciones de oscuridad.

Líneas	Biomasa			
	Masa fresca (gMF)		Masa seca (gMS)	
	Callos	Suspensiones	Callos	Suspensiones
SN	2.73 b	5.75 b	0.13 b	0.58 a
E15	4.92 a	7.89 a	0.22 a	0.59 a
E estandar	±0.379	±0.093	±0.012	±0.577

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p<0.05$ según la comparación de medias mediante la Prueba de Duncan.

Esta relación inversa entre crecimiento celular y acumulación de taxoides que ha sido observada en el cultivo de callos y suspensiones celulares ha sido referido por Hirasuna *et al*. (1996) y Ketchum *et al*. (1999).

En cuanto al incremento de la biomasa en el cultivo de suspensiones celulares, la línea E15 se comportó de manera superior a la línea SN tanto en la oscuridad como a la luz y mostró el mayor incremento de masa fresca en condiciones de oscuridad con diferencia significativa con respecto al resto de los tratamientos (Tabla 3). En cuanto a la masa seca se observaron diferencias en ambas condiciones de iluminación dentro de cada línea celular, siendo más marcada para la E15, sin embargo, en esta línea se obtuvo igual valor de Tc y la mayor acumulación fue en condiciones de oscuridad con la línea SN. Algunos autores como Schröder *et al.* (1999) han planteado que la luz puede inducir procesos de diferenciación y la activación de genes que no son expresados en condiciones de oscuridad. La figura 5 muestra la influencia de las condiciones de iluminación sobre la acumulación de taxoides en las líneas celulares empleadas.

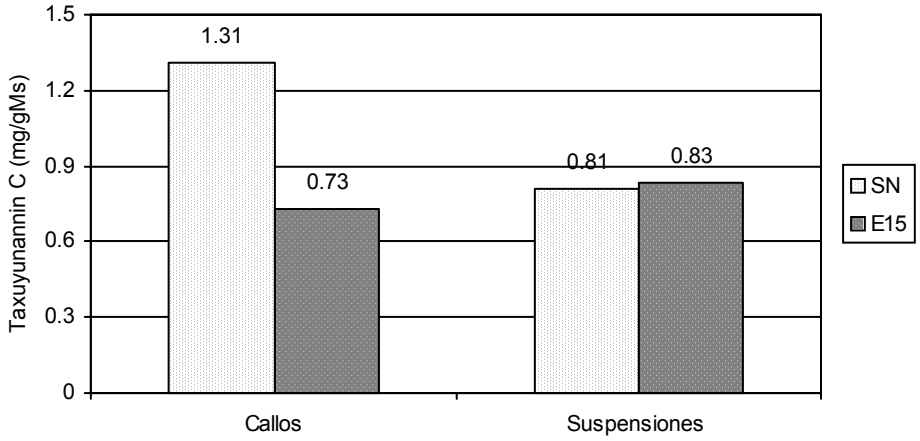

Figura 4. Producción de Taxuyunannin C en el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Taxus chinensis* líneas SN y E15 en condiciones de oscuridad total.

Tabla 3. Efecto de las condiciones de iluminación en la multiplicación de suspensiones celulares de *Taxus chinensis* líneas SN y E15.

	Biomasa	
Tratamientos	Masa fresca (gMF)	Masa seca (gMS)
SN luz	4.28 d	0.44 c
SN oscuridad	5.75 c	0.58 b
E15 luz	6.57 b	0.92 a
E15 oscuridad	7.89 a	0.59 b
Error estandar	±0.043	±0.026

Medias con letras distintas dentro de una misma columna difieren estadísticamente para $p<0.05$ según la comparación de medias mediante la Prueba de Duncan.

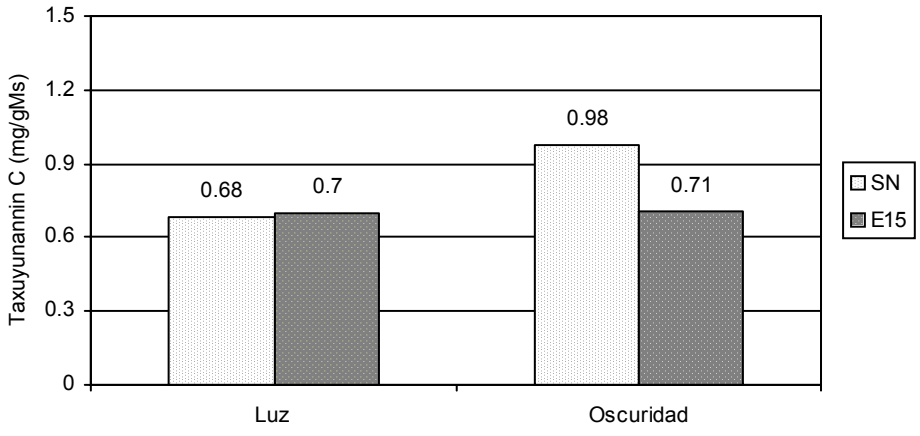

Figura 5. Efecto de las condiciones de iluminación en la acumulación de Taxuyunnanin C en suspensiones celulares de *Taxus chinensis* líneas SN y E15.

Fett-Neto *et al.* (1995) señalaron una correlación entre la actividad de la enzima 3-hidroxy-3metiglutaril-coenzima A reductasa y la acumulación de taxoides. Esta enzima tiene una actividad significativa en el crecimiento de células a la luz y se observa una baja regulación de los niveles estables del paclitaxel.

Cuando las técnicas de cultivo son combinadas con ensayos para producir niveles de taxoides aparecen otros problemas como la alta variabilidad del contenido de estos y los ritmos de crecimiento. Autores como Wheeler *et al.* (1992) se lo atribuyen a la variabilidad genética entre individuos de la misma especie y Zhong (1995) a diferencias entre las líneas celulares de *Taxus*.

Ketchum y Gibson (1996) observaron en líneas celulares de *Taxus canadiense* y *T. cuspidata* diferentes ritmos de crecimiento y capacidad para producir taxoides. Es por ello que unido al empleo de elicitores abióticos o bióticos es necesaria la selección de líneas productivas, esto está corroborado por los resultados de Dornenburg y Knorr (1997) quienes plantean que el desarrollo de métodos para la selección de líneas celulares con alta productividad y la optimización del medio de cultivo mejorar la producción de metabolitos secundarios.

La acumulación de metabolitos secundarios es un resultado de un equilibrio dinámico entre la formación del producto, la transportación, el almacenamiento y la degradación (Vanisree y Tsay, 2004). Muchos autores han descrito que los rendimientos de productos deseables han sido bajos o en ocasiones no detectados en cultivos de callos o suspensiones celulares. Los bajos rendimientos obtenidos en estos ensayos pueden ser explicados por el bajo grado de diferenciación celular, inapropiado estado de desarrollo, expresión suprimida o reducida de enzimas en células indiferenciadas; aspectos señalados por autores como Jaziri *et al*. (1996). Estos resultados muestran que el Tc no es un metabolito asociado al crecimiento celular y por tanto es necesario considerar dos etapas en el proceso, una de crecimiento celular seguida de una etapa de acumulación del metabolito secundario.

REFERENCIAS

Cheng, KD, Chen WM, Zhu WH, Fang QC, Liang XT, Guo JY (1994) Taxane analog and process for producing the same. Patent WO 9, 406, 740

Dong, H y Zhong J (2002) Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation. Enzime and Microbial technology 31:116-121

Dornenburg, H, Knorr D (1997) Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. Foodtechnology 51(11): 47-54

Fett-Neto, AG, Melanson SJ, Nicholson S, Pennington J, DiCosmo F (1994) Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. Biotechnology and Bioengineering 44(8): 966-971

Fett-Neto, AG, Pennington J, DiCosmo F (1995) Effect of white light on taxol and baccatin III accumulation in cell cultures of *Taxus cuspidata*. J Plant Physiol. 146: 584-590

Gleba, D, Borisjuk N, Borisjuk L, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba Y, Raskin I (1999) use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 5973-5977

Hirasuna, TJ, Pestchanker LJ, Scrinivasan V, Shuler ML (1996) Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 44: 95-102

Hu, W W, Yao HU, Zhong JJ (2001) Improvement of *Panax notoginseng* cell cultures for production of ginseng saponin and polysaccharide by high-density cultivation of pneumatically agitated bioreactors. Biotechnology Progress 17: 838-846

Jaziri, M, Zhiri A, Guo YW, Dupont JP, Shimomura K, Hamada H, Vanhaelen M, Homes J (1996) Taxus sp. Cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 59-75

Jennewein, S, Croteau R (2001) Taxol : biosynthesis, molecular genetics and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol 57: 13-19

Ketchum, R, Gibson D (1995) A novel method of isolating taxanes from cell suspension cultures of yew. J. Liq. Chromatogr. 18(6): 1093-1111

Ketchum, R, Gibson D (1996) Paclitaxel production in suspension cell cultures of taxus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 9-16

Ketchum, R, Gibson D, Croteau R ,Shuler ML (1999) The kinetics of taxoid accumulation in suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotech Bioeng 62: 97-105

Lee, C W, Shuler M L (2000) The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalcine and catharanthine from immobilized Catharanthus roseus cells. Biotechnology Bioengineering 67: 61-71

Roberts, SC, Shuler M L (1997) Large scale plant cell culture. Current opinion in Biotechnology 8: 154-159

Schröder, Gunterbusch E, Kaltenbach M, Schmidt J, Strack D, De Luca V, Schröder J (1999) Light- induced cytochrome P450-dependent enzyme in indole alkaloids biosynthesis: tabersonine 16-hydroxylase. FEBS Lett 458: 97-102

Steven, R (1998) Method for production of plant biological products in precocious neomorphic embryoids. United States Patent 5,850,032

Vanisree, M, Tsay HS (2004) Plant cell cultures an alternative and efficient source the production of biological important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering 2(1): 29-48

Wang, Ch, Jianyong W, Xingguo M (2001) Enhancement of Taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. Springer-Verlag

Wang, W, Zhong J (2002) Manipulation of ginsenoside heterogeneity in cell cultures of *Panax notoginseng* by addition of jasmonates. J. Biosci. Bioeng. 93: 48-53

Wheeler, N, K Jech, S Masters, S Brobst, Alvarado A, Hoover A, Snader K (1992) Effects of genetic, epigenetic, environmental factors on taxol content: in *Taxus brevifolia* and related species. J. Nat Prod. 55:432-440

Zhang, CH, Mei XG, Liu L, Yu LJ (2000) Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. Biotechnol. Lett. 22:1561–1564

Zhong, JJ (1995) Recent advances in cell cultures of *Taxus* spp. for production of the natural anticancer drug taxol. Plat Tissue Cult Biotechnol 1:75-80

Zhong, JJ (2001) Biochemical engineering of the production of plant- specific secondary metabolites by cell suspension cultures. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 72: 21-26