

Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Phyllanthus acumminatus*, para la producción de compuestos con actividad biológica

Development of *Phyllanthus acumminatus* hairy roots culture system for the production of compounds with biological activity

Giovanni Garro-Monge¹, Karol Jiménez-Quesada²,
Raquel Pérez-Méndez³

Fecha de recepción: 12 de octubre de 2017
Fecha de aprobación: 5 de enero de 2018

Garro-Monge, G; Jiménez-Quesada, K; Pérez-Méndez, R.
Desarrollo de un sistema de cultivo *in vitro* de raíces pilosas
de *Phyllanthus acumminatus*, para la producción de com-
puestos con actividad biológica. *Tecnología en Marcha*. Vol.
31-3. Julio-Setiembre 2018. Pág 66-73.

DOI: 10.18845/tm.v31i3.3903

- 1 Profesor-investigador, Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: ggarro@tec.ac.cr
- 2 Profesora-investigadora, Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: kjimenez@tec.ac.cr
- 3 Estudiante de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: raquelpm1894@gmail.com



Palabra clave

Transformación genética; agro-infección; cepa bacteriana; metabolismo secundario; microscopía.

Resumen

Las plantas del género *Phyllanthus* son actualmente investigadas por su habilidad para producir compuestos fenólicos con alta capacidad antioxidante. Además, diversos estudios han revelado que estas plantas poseen metabolitos (filantósidos y lignanos) que pueden inducir la apoptosis celular, lo que les proporciona un gran potencial para posibles tratamientos de prevención contra el cáncer. En este trabajo, se llevó a cabo la introducción *in vitro* de semillas de *P. acumminatus*; se logró el cultivo *in vitro* del material vegetal, y las vitro-plantas fueron utilizadas en ensayos de inducción de raíces pilosas, mediante transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes* cepa Ar15834. El tratamiento más favorable para la inducción de estos cultivos organogénicos consistió en el uso de estacas de aproximadamente 1-2 cm, a las cuales se les hicieron cortes transversales con un bisturí, para luego ser inoculadas en el cultivo bacteriano (OD₆₀₀: 0.6-1). Las estacas fueron colocadas en medio M & S semisólido al 50% de sales y vitaminas, sin reguladores de crecimiento, por un período de 48 h. Transcurrido este tiempo, las estacas fueron micropropagadas en medio M & S al 100% de sales y vitaminas, complementado con 500 µg/l del antibiótico Ceftriaxona® para erradicar la bacteria. Se logró el cultivo de las raíces pilosas en medio M & S al 100% de sales y vitaminas, sin reguladores de crecimiento. Por medio del uso de microscopía de luz, se logró la caracterización morfológica de las raíces establecidas, las cuales coinciden plenamente con las típicas raíces pilosas o *hairy roots* obtenidas por medio del sistema de agro-infección, según la literatura consultada.

Keywords

Genetic transformation; agro-infection; bacterial strain; secondary metabolism; microscopy.

Abstract

Plants of the genus *Phyllanthus* are currently studied because of their ability to produce phenolic compounds with high antioxidant capacity. Additionally, several studies have demonstrated their capability to induce cellular apoptosis through secondary metabolites (phyllanthostatin), which provides these plants a great potential for possible cancer prevention treatments. In this research, *P. accumminatus* seeds were introduced *in vitro*, *in vitro* culture of the seedlings was achieved, and the vitroplants were used in order to induce hairy roots by genetic transformation with Ar15834 of *Agrobacterium rhizogenes*. The most promising assay for the induction of these organogenic cultures consisted of the use of 1-2 cm stems to which transverse wounds were made in order to inoculate them in the bacterial culture (OD₆₀₀: 0.6-1). The stems were placed in hormone-free semisolid M & S medium containing 50% of salts and vitamins during 48 hours. After this time, the stems were transferred to a hormone-free semisolid 100% M & S medium supplemented with Ceftriaxona® (500 µg/l) to remove the bacteria. Finally, the hairy roots cultures were accomplished by using hormone-free semisolid 100% M & S medium. Besides, through light microscopy, the established roots morphologic characterization was carried out and it matched the typical hairy roots morphology reported when agro-infection system is used.

Introducción

A lo largo de los años, el uso y consumo de las plantas medicinales se ha vuelto costumbre y parte del conocimiento tradicional de las diferentes poblaciones alrededor del mundo. Estas especies vegetales traen grandes beneficios tanto para la salud individual como colectiva y es por su gran utilidad y demanda, que se han convertido en un recurso de interés para diversas áreas de investigación, principalmente la farmacéutica, la médica y la biotecnológica [1].

Las plantas del género *Phyllanthus*, de la familia *Phyllanthaceae* han sido estudiadas por su acción antiviral [2]. Diversas investigaciones han revelado que las plantas de este género poseen metabolitos que inducen la apoptosis celular, lo cual les proporciona un gran potencial en la prevención del cáncer [3]-[4]. Estudios fitoquímicos realizados a extractos y cultivos *in vitro* de *Phyllanthus sp.* demuestran que compuestos como alcaloides, flavonoides, lignanos, fenoles, taninos y terpenoides poseen actividad antitumoral.

Específicamente la especie *P. acuminatus* se ha empleado en diversas actividades como control de plagas, conservación de alimentos y usos medicinales, como el tratamiento de trastornos del aparato urinario, enfermedades hepáticas, infecciones intestinales, ictericia y diabetes y dermatitis, entre otras [5]. Esta especie posee la capacidad de producir compuestos fenólicos con alto poder antioxidante, lo cual se ha comprobado por medio de diferentes análisis químicos y espectrofotométricos [6].

Para la obtención de los metabolitos de interés a partir de plantas silvestres como *P. acuminatus*, el cultivo de tejidos o de células vegetales es una alternativa beneficiosa debido a que su producción es independiente de los factores externos y proporciona disponibilidad de nutrientes al material vegetal, además de que es posible controlar las condiciones para alcanzar mejor rendimiento, estabilidad genética y calidad del cultivo. El cultivo *in vitro* de *Phyllanthus sp.* suele ser sencillo, ya que no requiere de cuidados exigentes [2]-[7].

Para la obtención de metabolitos secundarios en plantas, se han empleado diversos sistemas; sin embargo, uno de los más recomendados es el cultivo de raíces y brotes, ya que estos se caracterizan por tener un patrón metabólico muy similar al de los órganos en la planta y pueden o no haber sido sometido a procesos de transformación genética [8]. El uso de la técnica de *hairy roots* o raíces pilosas busca una mayor producción de raíces adventicias con el fin de aumentar la cantidad de metabolitos secundarios que obtener. Además, se ha demostrado que la transformación de raíces con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* genera altas respuestas de enraizamiento por parte de la planta, ya que tiene la capacidad de infectar las plantas por medio de heridas e inducir la producción de raíces adventicias. [9]-[10]-[11].

Este trabajo se realizó, precisamente con el objetivo de establecer un sistema de cultivo *in vitro* de raíces pilosas de *Phyllanthus acuminatus* mediante transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*, que permitiera un posterior cultivo a escala para la obtención de extractos a base de compuestos con potencial anticancerígeno.

Metodología

Establecimiento de vitro plantas de *Phyllanthus acuminatus*

Los frutos maduros utilizados para introducción en laboratorio fueron recolectados en Santa Teresita de Turrialba, Cartago, Costa Rica (latitud: 9.583934, longitud: -83.384280). La desinfección de semillas se basó en los protocolos descritos por Catapan y colaboradores [8] y Jiménez y colaboradores [2]. Se logró optimizar el protocolo de introducción mediante el corte de la cubierta seminal, dejando el embrión al descubierto para su germinación.

El medio de cultivo utilizado en esta etapa compuso de sales y vitaminas M&S [12] al 100%, complementado con 3% m/v de sacarosa, gelificado con Phytigel® a un pH 5.7. La temperatura de germinación fue de 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. El porcentaje máximo de germinación obtenido a los 30 días de la introducción fue de 30.75%; no obstante, posteriormente a dicho período de evaluación, la germinación de semillas continuó. El medio de multiplicación utilizado correspondió a un M&S [12] al 100% más ácido naftalenacético (ANA) como regulador de crecimiento a una concentración de 0.5 mg/mL; el subcultivo del material se realizó mediante microestacas con dos nudos.

Transformación de microestacas de *P. acuminatus* con *A. rhizogenes*

Se verificó la densidad óptica de los cultivos bacterianos de la cepa silvestre Ar15834 a 600 nm de longitud de onda, es decir, OD_{600} . Se prepararon diluciones hasta obtener un valor de OD_{600} entre 0.6 y 1 y para realizar la agro-infección, se procedió a eliminar las ramas adyacentes de las plántulas, de esa manera se extrajeron microestacas que fueron sometidas a dos tipos de tratamiento de agro-infección, respectivamente.

El tratamiento 1 consistió en realizar varias heridas con bisturí a la altura de la mitad del explante y colocarlo en un matraz estéril. Luego, se cubrieron las estacas con los cultivos bacterianos, y la mezcla se agitó por 20 min. Posteriormente, los explantes fueron separados del cultivo bacteriano con un colador; se secó el exceso de bacteria de las estacas con papel filtro Whatman™ n.º 3 autoclavado, y finalmente, se lavaron con abundante agua destilada estéril y se secaron nuevamente en papel filtro Whatman™ n.º 3 autoclavado.

El tratamiento 2 involucró los pasos anteriormente descritos, exceptuando que, en lugar de realizar cortes en las microestacas, estas fueron sometidas a un proceso de desecación en el flujo de la cámara por un período de 20 min, antes de ser colocadas en contacto con el cultivo bacteriano.

Las estacas se cultivaron de manera horizontal en medio M & S [12] 100%, 3% m/v de sacarosa y Phytigel como gelificante, a un pH de 5.7, a 25°C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Todo el material fue evaluado diariamente y se subcultivó según la presencia de la bacteria en el medio, por un período de al menos 6 semanas. El medio de subcultivo del material vegetal fue M&S 100% como el anterior, pero complementado esta vez con el antibiótico Ceftriaxona® a una concentración de 500 µg/ml (determinado mediante pruebas de resistencia a antibióticos, tanto de las bacterias como de las plantas). Las estacas subcultivadas se expusieron a una temperatura de 25 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad con luz difusa. Todo el material se evaluó diariamente y se subcultivó según se consideró necesario.

Al aparecer las primeras formas de raíces pilosas, aproximadamente 10 semanas después de la agro-infección, fueron separadas del explante y se subcultivaron en medio M & S [12] 100%. Las raíces pilosas fueron recolectadas transcurrido un período de 30 semanas aproximadamente, se secaron durante 48 h a temperatura ambiente y posteriormente 2 h a 70°C, para ser molidas y utilizadas en la elaboración de extractos crudos.

Resultados y discusión

Cultivo de vitroplantas de *Phyllanthus acuminatus*

En la figura 1 se presentan las fotografías de las plántulas de *P. acuminatus* cultivadas en el laboratorio, tanto en la etapa de germinación de la semilla (a) como en la de multiplicación del material (b).

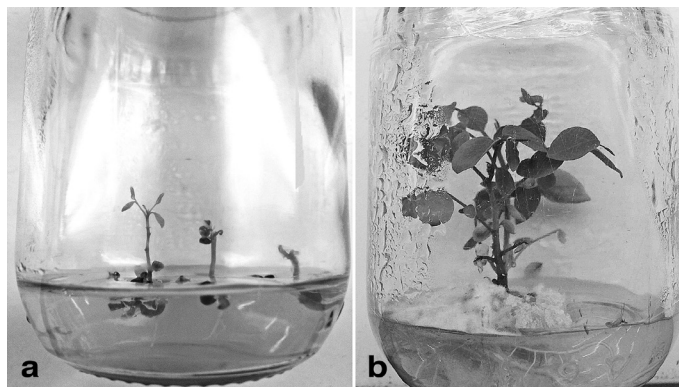


Figura 1. Plántulas *in vitro* de *Phyllanthus acuminatus*: a. Germinación *in vitro* (3 semanas); b. Micropropagación (4 semanas)

La etapa de introducción del material vegetal, en este caso mediante la semilla, resultó bastante compleja, debido a la resistencia mecánica de la cubierta seminal en esta especie, por lo que implicó la propuesta de varios protocolos de germinación. La escarificación por lijado de la superficie de las semillas, la aplicación de ácido giberélico antes de la desinfección del material y el corte en la cubierta seminal probaron ser estrategias efectivas para promover la germinación *in vitro*. Se ha reportado que la cubierta seminal de algunas semillas actúa como una barrera física que impide la entrada de agua hacia el interior y limita el intercambio de gases entre el embrión y el medio, imposibilitando el crecimiento embrionario [13]. Por tanto, al eliminar o disminuir esta barrera, el ácido giberélico cumplió su función como promotor de la división celular y el corte en la testa facilitó la germinación de las semillas.

Transformación de microestacas de *P. acuminatus* con *A. rhizogenes*

Tal y como se evidencia en las figuras 2 y 3, se produjo el crecimiento *in vitro* de raíces pilosas de la especie *P. acuminatus*, con el protocolo 1 de transformación genética, lo cual confirmó los resultados observados por diversos investigadores en otras especies del género *Phyllanthus* [14]-[15]. La inducción de este tipo de crecimiento organogénico ha tenido por objeto en otros trabajos el estudio de sus capacidades medicinales contra el cáncer de mama [4] y el virus de la hepatitis B [14].

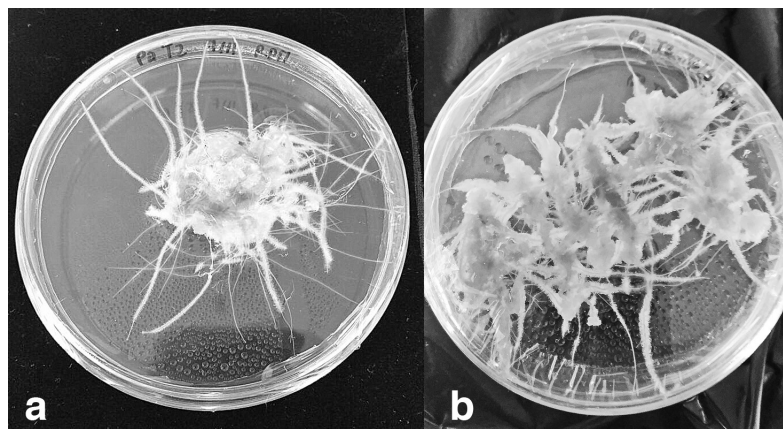


Figura 2. Crecimiento de raíces pilosas de *Phyllanthus acuminatus*: a. Raíz subcultivada con 15 semanas desde la agro-infección b. Raíces subcultivadas con 24 semanas desde la agro-infección



Figura 3. Multiplicación de raíces pilosas de *Phyllanthus acuminatus* después de 30 semanas y posterior al proceso de transformación genética, creciendo de forma individual en un medio MS sin reguladores

La transformación genética en la especie se alcanzó mediante un proceso de agro-infección mediado por la cepa Ar15834 de *Agrobacterium rhizogenes*. Setamam y colaboradores [16] señalan que la importancia del uso de esta bacteria radica en que resulta ser muy barato y resulta ser un método de transferencia directa de genes, lo cual disminuye el rearreglo de transgenes y favorece una integración eficiente de transgenes al genoma de la planta. Asimismo, se reporta que las raíces pilosas obtenidas a partir de *A. rhizogenes* se caracterizan por contar con gran estabilidad genética y biosintética, ya que el crecimiento mejora respecto del que proporciona un regulador y es más rápido [17].

El crecimiento de las raíces pilosas fue muy similar al observado por Garro y colaboradores, Bhattacharyya y Bhattacharya, y Kumar *et al.* [9] [14] y [15], quienes han llevado a cabo también procesos de transformación genética para la inducción de crecimiento de este tipo de raíces (*hairy roots*). En sus investigaciones se pudo observar la alta capacidad e independencia de las raíces para crecer sin el uso de reguladores de crecimiento, y destacó la gran cantidad de vellosidades o pelos radicales a lo largo de todo el segmento de raíz (figura 4). Estas raíces generaron además brotes radicales que crecieron y se ramificaron con mucha facilidad.

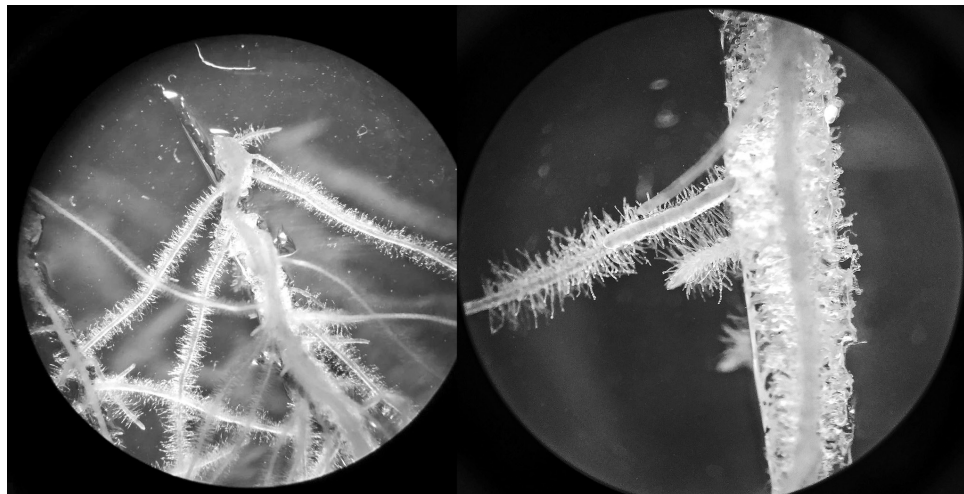


Figura 4. Raíces pilosas de *P. acuminatus* observadas en microscopía óptica (aumento 10X), creciendo en medio M&S 100% a las 20 semanas de inducción por transformación genética con *A. rhizogenes*.

Se ha demostrado que la transformación de raíces con la bacteria *A. rhizogenes* tiene grandes ventajas como que evita la variación somaclonal porque inhibe la inducción a callo [9]-[10]-[11]. Sin embargo, en los resultados obtenidos se observó que las raíces pilosas crecieron mejor y más rápido en presencia de callo (figura 2), y aquellas raíces cultivadas individualmente crecieron más lentamente.

Conclusiones

El cultivo celular de *P. acuminatus* se logró con éxito a partir de la germinación *in vitro* de semillas de campo.

Se realizó el cultivo en medio semisólido de raíces pilosas (hairy root) a partir de su inducción por transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, cepa Ar15834. La confirmación del resultado se realizó por medio de microscopía óptica y con base en la morfología típica mostrada.

Se recomienda continuar la investigación con el análisis de los perfiles bioquímicos de muestras vegetales *in vitro* y de campo, para poder determinar la eficiencia de los sistemas biotecnológicos propuestos en la producción de compuestos fenólicos de interés medicinal.

En una etapa posterior se espera alcanzar el escalamiento en medio líquido de los cultivos organogénicos de raíces pilosas.

Agradecimientos

Agradecemos a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por el aporte de los recursos necesarios para la realización de este estudio, dentro de un proyecto de investigación VIE-TEC.

También se agradece el apoyo y colaboración de la empresa Laboratorios LISAN, S.A. con quienes se ha establecido un convenio de investigación conjunta que permitirá el análisis de los compuestos bioactivos presentes en la raíces pilosas de *P. acuminatus*.

Al Dr. Edmundo Lozoya y la M. Sc. Marta Betancourt, en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Irapuato-México), por la donación de la cepa Ar15834 de *Agrobacterium rhizogenes*, así como por su apoyo y colaboración con el grupo de investigación en las técnicas de transformación genética de plantas.

Referencias

- [1] B. Arias, "Diversidad de usos, prácticas de recolección y diferencias según género y edad en el uso de plantas medicinales en Córdoba, Argentina", en *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 8, n.º 5, pp. 389-401, 2009.
- [2] M. Jiménez, S. Alvarenga, y E. Alan, "Establecimiento del protocolo de micropropagación para la planta *Phyllanthus ninuri* (Euphorbiaceae)", *Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago*, n.º 37, 2007.
- [3] S. Ramasamy, N. Abdul, N. Zainal, and S. Manickam, "Effect of extracts from *Phyllanthus watsonii* Airy Shaw on cell apoptosis in cultured human breast cancer MCF-7 cells", *Experimental and Toxicologic Pathology*, no. 65, pp. 341–349, 2011.
- [4] G. Abhyankar, P. Suprasanna, B. Pandey, K. Mishra, K. Rao, and V. Reddy, "Hairy root extract of *Phyllanthus amarus* induces apoptotic cell death in human breast cancer cells", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, no. 11, pp. 526–532, 2010.
- [5] Y. Alarcón, "Chilillo (*Phyllanthus acuminatus* Vahl) uso medicinal en Costa Rica e impacto sobre su conservación", (Tesis de maestría en Conservación y Manejo de Vida Silvestre), Universidad Nacional de Costa Rica, 2013.

- [6] M. Cala, A. Vásquez, J. Martínez y E. Stashenko, “Caracterización de compuestos fenólicos por electroforesis capilar de la especie *Phyllanthus acuminatus* (Euphorbiaceae) y estudio de su actividad antioxidante”, *Scientia et Technica*, Año XIII, n.º 33, Universidad Industrial de Santander, Colombia, 2007.
- [7] M. Arias, A. Aguirre, M. Angarita, C. Montoya y J. Restrepo, “Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios”, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, pp. 109-121, 2008.
- [8] E. Catapan, L. Márcio, B. Silva, F. Netto, and A. Viana, “Micropropagation, callus and root culture of *Phyllanthus urinaria* (Euphorbiaceae)”, in *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil, 2002, pp. 301–309.
- [9] G. Garro, K. Ramijan, B. Blanco, K. Lam y S. Alvarenga, “Implementación de un protocolo para la producción de raíces pilosas (*hairy roots*) de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) mediante transformación con *Agrobacterium rhizogenes*”, *Tecnología en Marcha*, vol. 25, n.º 3, pp. 28-38, 2012.
- [10] G. Calva y J. Pérez, “Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro”, *Revista Digital Universitaria*, Universidad, vol. 6, n.º11, p. 16, 2005.
- [11] L. Caro, A. Marinangeli, N. Curvetto y L. Hernández, “*Agrobacterium rhizogenes* vs inducción auxínica para la rizogénesis *in vitro* de *prosopis chilensis* (mol.) Stuntz”, *MULTEQUINA 9*, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, Buenos Aires, Argentina, pp. 47-53, 2000.
- [12] T. Murashigeand F. Skoog, , “A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures”, *Physiologia plantarum*, vol. 15 no. 3, pp. 473-497, ¿año?.
- [13] Á. Matilla (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. Consultado el 13 de marzo de 2017. Obtenido desde: <http://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2016/08/Matilla-2008.pdf>
- [14] R. Bhattacharyya and S. Bhattacharya, “Development of a potent *in vitro* source of *Phyllanthus amarus* roots with pronounced activity against surface antigen of the hepatitis B virus”, *In Vitro Cell: Dev. Biol-Plant*, no. 40, pp. 504-508, 2004.
- [15] A.Kumar, K. Poulouse, A. Sabovljevic, and J. Madassery, “Transformation through agroinfection on decapitated shoot apex of field-growing *Phyllanthus amarus*”, *Acta Physiol. Plant.*, no. 33, pp. 2011-2017, 2011.
- [16] N. M. Setamam, N. J. Sidik, Z. A. Rahman, and C. R. C. M. Zain, , “Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum species* explants”, *BMC research notes*, vol. 7, no. 1, pp. 414, 2014.
- [17] A. Thwe, M. V. Arasu, X. Li, C. H. Park, S. J. Kim, N. A. Al-Dhabi, and S. U. Park, “Effect of different *Agrobacterium rhizogenes* strains on hairy root induction and phenylpropanoid biosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn*)”, *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, 2016.