

# Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea*

## Establishment of cell suspension culture of *Eucalyptus cinerea*

Fernando Orozco Sánchez\*, Rodrigo Hoyos Sánchez\*\*, Mario Arias Zabala\*\*\*

### RESUMEN

Se desarrolla un protocolo para la obtención y establecimiento de suspensiones celulares de *E. cinerea*. La concentración de las hormonas 2,4 D y BAP tienen un efecto significativo en la formación de callos friables de *E. cinerea*, obteniendo una respuesta periódica en la formación de callos friables con respecto a la concentración de las hormonas. Puede obtenerse hasta un 90% de formación de callos friables con varias combinaciones hormonales; primero, con concentraciones alrededor de 3,0 mg/L de 2,4 D y 1,0 mg/L de BAP, y segundo, alrededor de 6,0 mg/L de 2,4 D y 1,0 mg/L de BAP. A partir de los callos anteriores, se obtienen suspensiones celulares con un activo crecimiento celular, con tiempos de duplicación entre cuatro y siete días, y alcanzando densidades celulares de 15 g células secas/L. Las suspensiones de *E. cinerea* ofrecen una herramienta importante para la propagación de esta especie vía embriogénesis somática, estudio de biorreactores, producción de metabolitos secundarios y procesos de biotransformación.

**Palabras clave:** Biorreactores, terpenoides, biotransformación, metabolismo secundario.

### ABSTRACT

A protocol is developed for obtaining and establishment of *E. cinerea* cell suspension. The concentration of hormones 2,4 D and BAP have a significant effect in the formation of friable callus of *E. cinerea*, obtaining a periodic answer in the formation of friable callus with regard to hormones concentration. It can be obtained until 90% of formation of friable callus in several hormone combinations, first with concentrations around 3,0 mg/L of 2,4 D and 1,0 mg/L of BAP; and second, around 6,0 mg/L of 2,4 D and 1,0 mg/L of BAP. Using the last callus, cell suspensions are obtained with an active cellular growth, with times of duplication between 4 and 7 days and obtaining cell densities of 15 g of dry cells/L. The suspensions of *E. cinerea* offer an important tool for the propagation of this specie by somatic embryogenesis, bioreactors study, production of secondary metabolites and biotransformation processes.

**Key words:** Bioreactors, terpenoids, biotransformation, secondary metabolism.

### INTRODUCCIÓN

Las células de las plantas son importantes biocatalizadores que pueden ser usados para la obtención de productos farmacéuticos, bioinsecticidas, saborizantes, fragancias y colorantes para alimentos, como antocianina y azafrán. Las células de las plantas también pueden utilizarse para metabolizar un amplio conjunto de compuestos suministrados exógenamente

(proceso conocido como biotransformación), a través de varias reacciones para obtener compuestos de mayor valor agregado, con una mayor complejidad estructural y más fácilmente con respecto a la síntesis química (Lee, 1996; Yokoyama, 1996). La productividad de los anteriores compuestos, en base seca de células vegetales, se puede incrementar considerablemen-

\* Profesor, Escuela de Química. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Autopista Norte x Calle 65. Medellín, Colombia. E-mail: feorozco@unalmed.edu.co

\*\* Profesor, Departamento de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

\*\*\* Profesor, Escuela de Geociencias. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

te en los cultivos celulares con respecto a la productividad con plantas intactas. Sin embargo, la producción de los compuestos anteriores implica manipular una serie de variables y requiere un control y conocimiento cuidadosos de los medios de cultivo, biorreactores y de las rutas metabólicas secundarias. El primer proceso comercial que utilizó células vegetales fue la producción del colorante y compuesto antibacteriano shikonina, utilizando *Lithospermum erythrorhizon*, en 1983. Otros procesos comerciales a escala industrial incluyen la producción de fosfodiesterasa, ácido rosmarínico, ginseng y berberina (Kreiss y Reinhard, 1989; Sajc *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1995).

Las especies del género *Eucalyptus* producen algunos metabolitos secundarios de interés comercial, como los aceites esenciales, con aplicaciones industriales, medicinales, farmacológicas y en control biológico de plagas. Este género se constituye en un buen candidato para un proceso productivo no tradicional, pero es preciso desarrollar inicialmente la técnica de callogénesis y suspensión de células para estudiar la producción de estos compuestos. Entre sus metabolitos de interés se encuentran terpineno, cimeno, pineno, timol, carvacrol, cineol, eudesmol, macrocarpaes, sideroxilonaes, entre otros. (Menut *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1996). El 1,8-cineol es el principal componente del aceite esencial del eucalipto. El eucalipto ha sido utilizado también para la biotransformación de ácido trópico, precursor de los alcaloides tropánicos (Ushiyama y Furuya, 1989); ácido 1,8- $\beta$ -glicirretínico (Orihara y Furuya, 1990); óxido de cariofileno (Orihara *et al.*, 1994), 1,8-Cineol (Orihara y Furuya 1994),  $\beta$ -Thujaplicina, con actividad antifúngica y antibacteriana (Furuya *et al.* 1997); mentol y esteviol, para la obtención de gentiobiósidos; mentano glicósidos, triglicósidos y esteviósidos (Yokohama, 1996) y ácido kójico para la producción de fitoestrógenos (Nakajima *et al.*, 2001).

El rendimiento de los aceites esenciales en las hojas de eucalipto puede alcanzar 3,5% en base seca, como en *E. cinerea*. Este rendimiento es superior al de *E. globulus*, *E. citriodora* y *E. grandis*, con valores de 2,5, 2,0 y 0,25%, respectivamente (Mora *et al.*, 2002). En un estudio comparativo entre las cuatro especies anteriores, *E. cinerea* resultó ser la mejor fuente de 1,8-cineol, tanto por su rendimiento como por la concentración de este monoterpene, el cual es 72,42% en los respectivos aceites esenciales (Mora *et al.*, 2002). Con la presente investigación se defi-

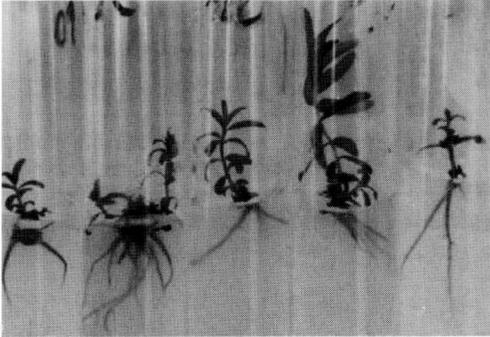
nen los procedimientos para establecer las suspensiones celulares de *E. cinerea*, que puedan ser utilizadas en la producción de metabolitos secundarios y procesos de biotransformación.

## METODOLOGÍA

Para establecer el cultivo *in vitro* de *E. cinerea* se procedió a la germinación de semillas *in vitro*. Luego, estas plántulas fueron micropropagadas utilizando un medio de cultivo desarrollado por los investigadores (artículo en proceso de publicación). La micropropagación se realizó utilizando microesquejes en medios dosificados con 1,1 g/L de sales de Murashige y Skoog (1962), ácido indol butírico (IBA: 0,1 mg/L), sacarosa (20 g/L), polivinilpirrolidona (PVP: 1,0 g/L), ácido nicotínico (0,5 mg/L), piridoxina (0,5 mg/L), glicina (2,0 mg/L) y agar (9,0 g/L). El pH se ajustó entre 5,6 y 5,8. Las hojas juveniles fueron utilizadas como explantes para la formación de callos. Los medios de cultivo utilizados en esta etapa correspondieron a una combinación de auxina (2-4 diclorofenoxiacético: 2-4 D entre 0,0 y 7,5 mg/L) y citoquinina (benzilaminopurina: BAP entre 0,0 y 1,5 mg/L), pH (5,6 - 5,8), agar (9 g/L), sacarosa (30 g/L), sales inorgánicas (Medio de Murashige y Skoog, 4,4 g/L), glicina (2,0 mg/L), ácido nicotínico (5,0 mg/L), tiamina (0,5 mg/L), piridoxina (0,5 mg/L) y PVP (1,0 g/L). Los callos obtenidos fueron establecidos en medios líquidos con una composición similar al medio de inducción de callos, libre de citoquinina. Las suspensiones celulares se iniciaron mediante la incubación de trozos de callos friables en el medio líquido continuamente agitado, de acuerdo con la metodología general de Szabados *et al.* (1991), 110 r.p.m., subcultivos periódicos (cada 15 días), en erlenmeyers de 100 ml y 250 ml, y ocupando sólo el 20 % de este volumen con medio de cultivo. Se conservaron en la oscuridad y una temperatura de 24°C. Inicialmente, las suspensiones celulares son heterogéneas, observando grandes agregados, células libres, alargadas, de gran tamaño y células pequeñas isodiamétricas. Después de repetir los subcultivos (seis meses), se obtuvo una suspensión celular fina y dispersa con alta velocidad de crecimiento. Para construir las curvas de crecimiento fueron utilizadas como inóculo suspensiones tamizadas con una malla de acero inoxidable No. 40 (tamaño de abertura 0,42 mm). Se evaluó el crecimiento mediante la determinación del peso seco de la biomasa contenida en 10 ml de medio (24 horas a 70°C) según el procedimiento de Torres (1989).

## Resultados y Discusión

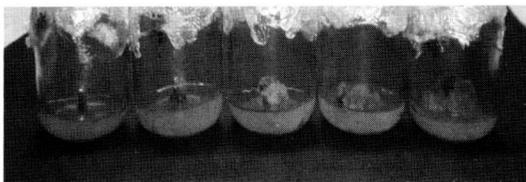
La fotografía 1 presenta plántulas micropropagadas de *E. cinerea*. Las fotografías 2 y 3 muestran callos obtenidos a partir de hojas juveniles.



**Fotografía 1.** Plántulas de *E. cinerea* utilizadas para el experimento de formación de callos.



**Fotografía 2.** Callo friable de *E. cinerea* obtenido mediante combinaciones de 2,4 D y BAP.



**Fotografía 3.** Diferentes callos de *E. cinerea* obtenidos mediante combinaciones de auxina y citoquinina.

Mediante experimentos factoriales se determinó el efecto que tiene la concentración de 2,4 D y BAP sobre diferentes variables respuesta (for-

mación de callos, callos friables, callos con raíces y brotes múltiples). En el presente trabajo sólo se presenta el porcentaje de formación de callos friables, ya que este material es el utilizado para el establecimiento de las suspensiones. La tabla 1 presenta el análisis de varianza de este experimento y las figuras 1 y 2, el porcentaje de formación de callos friables a diferentes concentraciones de 2,4 D y BAP.

**Tabla 1.** Análisis de varianza para el porcentaje de formación de callos friables de *E. cinerea*

Factor	Gl <sup>1</sup>	Suma cuadrados	Media cuadrados	Razón F <sup>2</sup>	NS <sup>3</sup>
2-4D	4	36806	9202	10,5822	1,3E-06
BAP	3	21858	7286	8,3791	9,1E-05
2-4D:BAP	12	11418	951	1,0943	0,3806
Residuales	63	54780	870		

<sup>1</sup> Gl. Grados de libertad

<sup>2</sup> Razón F. Relación entre las variaciones debidas a los cambios de cada variable y las variaciones no controladas o error experimental.

<sup>3</sup> NS. Nivel de significancia. Mayor que 0,05: el efecto de la variable es no significativo. Menor que 0,05: el efecto de la variable sí es significativo.

<sup>4</sup> Residuales. Variación debida al error experimental.

Del nivel de significancia se deduce que tanto las concentraciones de 2,4 D como el BAP tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de formación de callos friables (nivel de significancia < 0,001) y estadísticamente no hay evidencia de que exista una interacción entre los contenidos de las hormonas (2-4 D: BAP), es decir, la interacción no tiene un efecto significativo sobre la variable respuesta.

En las figuras 1 y 2 se aprecia el efecto que tienen el 2,4 D y el BAP sobre el porcentaje de formación de callos friables. Se observa un efecto periódico tanto de la auxina como de la citoquinina sobre el porcentaje de formación de callos friables, esto es, se encuentran máximos y mínimos en la formación de callos friables a medida que aumenta la concentración de las hormonas, siendo más claro este comportamiento periódico para la auxina. En las dos figuras se aprecia que los mayores valores de la variable respuesta se encuentran en dos zonas: primero, alrededor de 3,0 mg/L de 2,4 D y 1,0 mg/L de BAP; y segundo, alrededor de 6,0 mg/L 2,4 D y 1,0 mg/L de BAP.

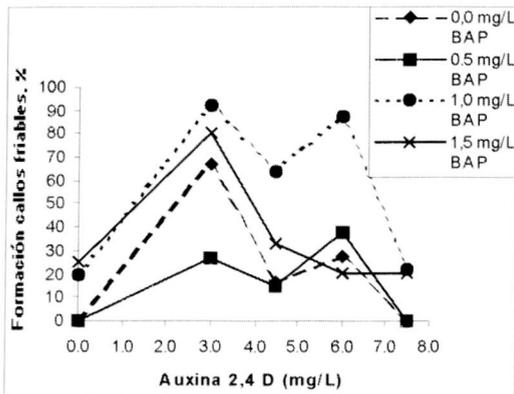


Figura 1. Porcentaje de formación de callos friables de *E. cinerea* contra diferentes concentraciones de 2,4 D y BAP.

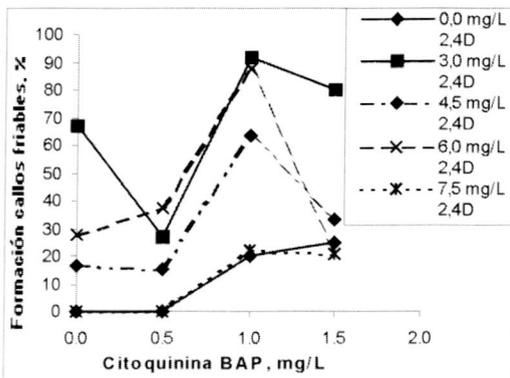


Figura 2. Porcentaje de formación de callos friables de *E. cinerea* contra diferentes concentraciones de BAP y 2,4 D.

Aunque los callos presentaron cierto grado de fenolización (conservando el material en la oscuridad), su textura permite usarlos para el establecimiento de las suspensiones. Se requiere realizar subcultivos cada quince días durante seis meses para adaptar las células al cultivo en suspensión y tener un material con un crecimiento activo. Este tiempo se considera normal y está acorde con el trabajo requerido para establecer suspensiones de otras especies vegetales, así por ejemplo, el banano puede necesitar entre 6 y 15 meses, desde la transferencia de callos a un medio líquido hasta tener un material en cantidad adecuada para cualquier aplicación (Schoofs *et al.* 1999). El establecimiento de las suspensiones de *E. cinerea* se logró usando un medio de cultivo que contiene la misma composición que el medio sólido en ausencia de BAP. La figura 3 presenta la curva de crecimiento para las suspensiones de *E. cinerea*, en la cual se evalúa el crecimiento celular durante seis semanas.

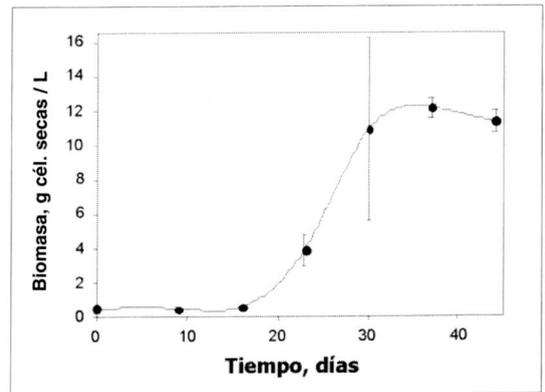


Figura 3. Curva de crecimiento de suspensiones celulares de *E. cinerea*. Las barras indican la desviación estándar.

En esta curva se observa una fase lag o de adaptación de las células de nueve días, una fase de crecimiento exponencial entre los días 9 y 30, y las fases estacionaria y de muerte celular, entre los días 30 y 44 aproximadamente, las cuales no se diferencian claramente una de otra. La forma de la curva coincide con las curvas típicas para este tipo de cultivos (Szabados, 1991). La densidad celular alcanzada (15 g células secas/L) es adecuada para muchas aplicaciones, y corresponde a un cultivo con densidad celular moderada de 15 a 20 g cél/L (Hu y Zhong, 2001). La fase exponencial puede modelarse mediante la siguiente ecuación:

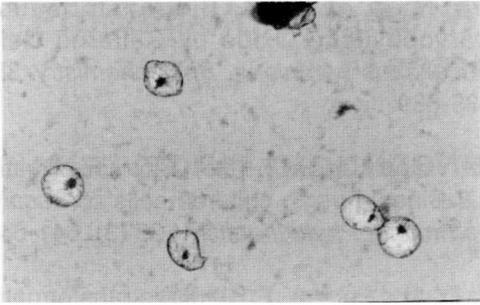
$$X = X_0 e^{\mu t}$$

$X$  = biomasa (g células secas/L)  
 $X_0$  = biomasa en el tiempo cero (g células secas / L)  
 $\mu$  = velocidad específica de crecimiento (día<sup>-1</sup>)  
 $t$  = tiempo (día).

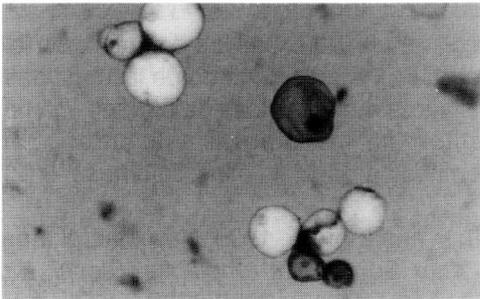
La ecuación obtenida para el cultivo es la siguiente:

$$X = 0,0793e^{0,1667t} \quad R^2 = 0,9203$$

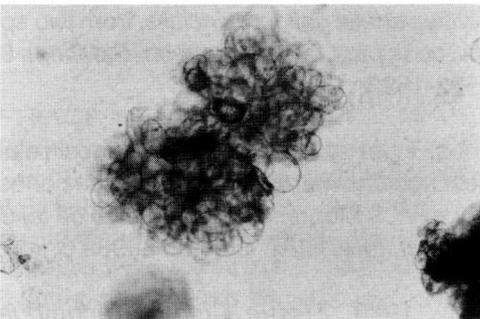
La velocidad específica de crecimiento para un cultivo de células en suspensión es de 0,2 día<sup>-1</sup>. El tiempo de duplicación ( $td$ ) se obtiene de la relación  $td = \ln 2 / \mu = 4,2$  días. En otras curvas de crecimiento, se obtuvieron tiempos de duplicación entre cuatro y siete días, sugiriendo esto que posiblemente se han formado diferentes líneas celulares, debido probablemente a una mejor adaptación fisiológica de las células o alguna variación somaclonal. Las suspensiones se han conservado con un crecimiento activo durante más de doce meses, manteniendo las condiciones de cultivo estables y la densidad celular baja (menor que 12 g de



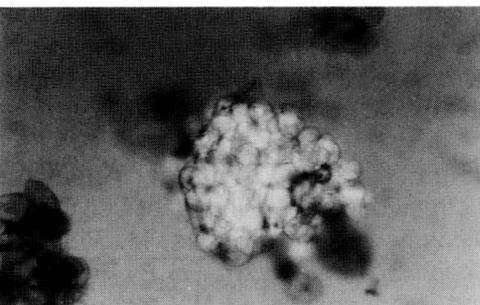
**Fotografía 4.** Células individuales de un cultivo de células en suspensión de *E. cinerea*. Tinción con Azul de Evans.



**Fotografía 5.** Aglomerados de pocas células en un cultivo de células en suspensión de *E. cinerea*. Tinción con Azul de Evans.



**Fotografía 6.** Microcallos en un cultivo de células en suspensión de *E. cinerea*. Sin tinción.



**Fotografía 7.** Microcallos en un cultivo de células en suspensión de *E. cinerea*. Tinción con Azul de Evans.

células secas por litro). Las fotografías 4 a 7 presentan diferentes aspectos de las suspensiones celulares.

La tinción con Azul de Evans permite apreciar las células muertas con un color oscuro y las células viables con un color blanco. Con este método se determinó una viabilidad de las células en suspensión entre 30 y 70%. A pesar de encontrarse un cultivo en el valor de viabilidad de 30%, se pudieron establecer suspensiones con un activo crecimiento celular.

## CONCLUSIONES

La concentración de las hormonas 2,4 D y BAP tiene un efecto significativo en la formación de callos friables de *E. cinerea*. Sin embargo, estadísticamente no hay evidencia de que exista una interacción entre estas dos hormonas. Utilizando hojas juveniles como explantes, se obtuvo un comportamiento periódico en la formación de callos friables con respecto a la concentración de las hormonas, es decir, el comportamiento de la variable respuesta varió de forma ondulatoria con la concentración de las hormonas. Puede obtenerse hasta un 90% de formación de callos friables en varias zonas, primero con concentraciones alrededor de 3,0 mg/L de 2,4 D y 1,0 mg/L de BAP; y segundo, alrededor de 6,0 mg/L de 2,4 D y 1,0 mg/L de BAP. A partir de los callos anteriores, se obtuvieron suspensiones celulares con un activo crecimiento, con tiempos de duplicación entre cuatro y siete días, alcanzando densidades celulares de 15 g células secas/L. Los diferentes tiempos de duplicación sugieren que posiblemente se han formado diferentes líneas celulares, debido probablemente a una mejor adaptación fisiológica de las células o alguna variación somaclonal. Las suspensiones de *E. cinerea* ofrecen una herramienta importante para la propagación de esta especie vía embriogénesis somática, y un punto de partida para el estudio de biorreactores y la producción de importantes metabolitos secundarios (1,8-cineol, timol, carvacrol, macrocarpales, sideroxilona, etc.) que son utilizados en perfumería, medicina, control biológico de algunas plagas (hongos e insectos), y como materias primas en procesos químicos. Además, estas suspensiones ofrecen la posibilidad de biotransformar ciertas sustancias químicas para la obtención de productos de mayor valor agregado (ácido trópico, ácido 1,8  $\beta$ -glicirretínico,  $\beta$ -Thujaplicina, esteviósidos, mentol, etc.). De acuerdo con el conocimiento de los autores, éste es el primer reporte para la obtención y mantenimiento de suspensiones celulares de *E. cinerea*.

**AGRADECIMIENTOS**

La presente investigación fue financiada por la Dirección de Investigaciones (DIMED) y el Laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de las Plantas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín y la Empresa Phytón Ltda.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Furuya, T. *et al.* 1997. Biotransformation de  $\beta$ -thujaplicina by Cultured Cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*. 46 (8): 1355-1358.
- Hu, W. W. and Zhong, J. J. 2001. Effect of Bottom Clearance of Performance of Airlift Bioreactor in High Density Culture of *Panax notiginseng* Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92 (4): 393, 2001.
- Lee, H. B. 1996. *Fundamentals of Food Biotechnology*. VCH Publishers. United Kingdom, 431 p.
- Menut, *et al.* 1995. Aromatic Plants of Tropical Central Africa. 23. Chemical Composition of Leaf Essential Oils of *Eucalyptus goniocalyx* F. Muell an *Eucalyptus patents* Benth. Grown in Rwanda. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1267-1271.
- Mora, A. L. *et al.* 2002. Estudio comparativo de los aceites esenciales de varias especies de eucalipto. Abstract en: *IX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, Cartagena de Indias, Colombia*. Febrero 20-22, 2002, trabajo PN24, p. 165.
- Murashige, T. and Skoog, F. A. 1962. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murata, M. *et al.* 1992. Macrocarpals, antibacterial compounds from *Eucalyptus*, inhibit aldosa reductasa. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (12): 2062-2063.
- Nakajima, N., Ishihara, K., Hamada, H. 2001. Functional Glucosylation of Kojic Acid and Daidzein with the *Eucalyptus* Membrane-Associated UDP-Glucosyltransferase Reaction System. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92 (5): 469-471.
- Orihara, Y. *et al.* 1994. Biotransformation of Caryophyllene Oxide by Cultured Cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*. 35 (3): 635-639.
- Orihara, Y. and Furuya, T. 1994. Biotransformation of 1,8 Cineole using cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry*. 35 (3): 641-644.
- Orihara, Y. and Furuya, T. 1990. Biotransformation of 18  $\beta$  Glycyrrhetic acid by cultured cells of *Eucalyptus perriniana* and *Coffee arabica*. *Phytochemistry*. 29 (10): 3123-3126.
- Shoofs, H. *et al.* 1999. Cuellos de botella en la regeneración y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de banano y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellas. *Infomusa*. 8 (2): 3-7.
- Singh, I. P. and Etoh, H. 1995. New Macrocarpal-1 from *Eucalyptus amplifolia*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 (12): 2330-2332.
- Singh, I. P. *et al.* 1996. Potent attachment-inhibiting and promoting substances for the Blue Mussel, *Mytilus edulis galloprovincialis*, from two species of *Eucalyptus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60 (9): 1522-1523.
- Szabados, L. *et al.* 1991. Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En: Roca, W. y Mogrinski, L. A. *Cultivo de tejidos en la agricultura*. CIAT, Colombia. 969 p.
- Torres, K. 1989. *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops*. Chapman & Hall. USA. 285 p.
- Ushiyama, M. and Furuya, T. 1989. Biotransformation of (RS) Tropic Acid in Suspension Cultures of *Coffee arabica*, *Datura innoxia*, *Eucalyptus perriniana* y *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 28 (9): 2333-2339.
- Yokohama, M. 1996. Industrial Application of Biotransformation Using Plant Cell Culture. En: Dicosmo, F. and Misawa, M. *Plant Culture Secondary Metabolism*, Ed. By Frank Dicosmo and Mananaru Misawa N.Y. 232 p.