

Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y plantas de campo de *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. y *Morus alba* L.

Alina Capote^{1*}, Naivy Pérez-Alonso¹, Anabel Pérez¹, Raúl Barbón¹, Enrique Salas¹, Dirk Wilken², André Gerth², Lutz Müller-Kuhr³, Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5.5 Santa Clara, Villa Clara. Cuba, CP 54 830.

²BioPlanta GmbH, Leipzig, Alemania.

³AnalytiCon Discoveries GmbH, Potsdam, Alemania.

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de células y tejidos, es una de las alternativas para la identificación de nuevos compuestos o para incrementar la producción de compuestos ya conocidos que sean de utilidad para la humanidad. El presente trabajo tuvo como objetivo producir biomasa de las especies *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L y *Morus alba* L. empleando distintos sistemas de cultivo *in vitro* y determinar el perfil metabólico en la biomasa producida *in vitro* y plantas en invernadero o campo mediante la técnica combinada de cromatografía líquida-espectrometría de masa. En *Morinda royoc* el cultivo de brotes fue el sistema de cultivo *in vitro* más factible para la producción de biomasa con mayor contenido de materia seca comparado con el cultivo de callos y células. Los rendimientos de los extractos en todas las especies fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo. Los perfiles de compuestos detectados en plantas de invernadero y brotes *in vitro* fueron similares en *Morinda royoc*, mientras que en *Psidium guajava* y *Morus alba* no mostraron similitud. Se pudo demostrar que el cultivo *in vitro* es una fuente potencial para la identificación y producción de nuevos compuestos.

Palabras clave: biomasa, guayaba, morera, perfil de metabolitos, sistemas de regeneración *in vitro*

ABSTRACT

The *in vitro* plant cell and tissue culture is an alternatives to identify new compounds or to increase production of well-known compounds useful for humankind. The aim of this work was to produce biomass of *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L var 'EEA18-40' and *Morus alba* L var 'Criolla' species. Different regeneration systems were used. Besides, profile of metabolites production in the *in vitro* cultured biomass and plants from field was determined by means of the combined techniques of liquid chromatography and mass spectrophotometer. In Shoots culture by *in vitro* culture system was more feasible for the production of biomass with bigger content of dry matter in *Morinda royoc*, compared with cells and callus system. Yields of extracts were always bigger in the *in vitro* culture systems than those obtained from field plants. Profiles of compounds detected in plants coming from greenhouses and *in vitro* cultured shoots were similar in *Morinda royoc*. Although, in *Psidium guajava* and *Morus alba* were different. Results demonstrated that *in vitro* culture is a potential source to identify and to produce new compounds.

Key words: biomass, guava, *in vitro* regeneration systems, metabolites profile, morus

Los compuestos activos obtenidos de plantas son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y cada día es mayor el número de plantas y metabolitos de interés. No obstante, la calidad y la cantidad de los compuestos obtenidos a partir de plantas colectadas en ambientes naturales o en campo son muy variables y están influenciadas por condiciones ambientales tales como el clima, la época, el tiempo y el suelo (Harborne, 2000).

Al utilizar el cultivo *in vitro* se independiza la producción de metabolitos de estos factores externos y permite disponer de condiciones controladas en el proceso de producción y extracción, además de posibilitar la obtención de nuevos compuestos no presentes en la planta madre (Massot *et al.*, 2000).

Dos métodos fundamentales de cultivo de tejidos han sido utilizados para la producción de metabolitos secundarios de plantas: el cultivo de células y el cultivo de órganos (Bourgau *et al.*, 2001). Muchos de los compuestos producidos durante el cultivo de células no se producen en las plantas intactas (Moreno-Valenzuela *et al.*, 1998; Tisserat y Vaughn, 2001).

El cultivo de órganos representa una alternativa interesante para la producción de productos secundarios de plantas. Dos tipos de órganos son considerados generales para estos objetivos: cultivo de brotes y raíces (Baiza *et al.*, 1999). El cultivo de brotes (cultivos de tejidos de rápida proliferación) ha sido investigado como fuente de aceites esenciales y alcaloides (Vanek *et al.*, 2005).

Las técnicas analíticas tales como la cromatografía han permitido el descubrimiento de más moléculas (Verpoorte y Alfermann, 2000). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es utilizada para la determinación de mezclas orgánicas complejas y es desde hace muchos años la más aplicada para el estudio de compuestos naturales (Weekwerth *et al.*, 2004; Le Gall *et al.*, 2005).

El presente trabajo tuvo como objetivo producir biomasa de las especies *Morinda royoc* L, *Psidium guajava* L y *Morus alba* L. empleando distintos sistemas de cultivo *in vitro* y determinar el perfil metabólico en la biomasa producida *in vitro* y plantas en invernadero o campo mediante la técnica combinada de cromatografía líquida-espectrometría de masa.

Para la producción de biomasa *in vitro* se siguieron tres sistemas de cultivo: multiplicación de brotes en medio de cultivo semisólido que se desarrolló en las tres especies en estudio y la inducción, multiplicación de callos y establecimiento multiplicación de suspensiones celulares solamente en la especie *Morinda royoc*.

Para la preparación de las muestras y obtención de los extractos se colectaron hojas de ramas jóvenes de plantas cultivadas en campo (*Psidium guajava*, *Morus alba*) o plantas de casa de cultivo (*Morinda royoc*), hasta obtener 10g de masa fresca foliar. Además, se tomaron las muestras de la biomasa producida *in vitro* (brotes, callos y suspensiones celulares).

La determinación de metabolitos secundarios en las distintas muestras se realizó en la compañía AnalytiCon (Potsdam, Alemania), mediante técnicas de cromatografía líquida y espectrofotometría de masa (HPLC-ESI-MS).

El extracto se obtuvo a partir de 1.5g de masa seca de cada una de las muestras, utilizando como

tampón de extracción Éter metil terbutil/metanol (MTB-Ether/Metanol) y posteriormente 10mg.ml⁻¹ del extracto fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO).

Las muestras fueron inyectadas automáticamente y separadas utilizando una columna de fase reversa (C18, Phenomenex, USA) y gradiente 5 a 50% de acetonitrilo. Los compuestos eluidos de la columna fueron detectados mediante un detector de diodo (Diode Array Detector) a 210-600 nm.

Los rendimientos de los extractos en todas las especies en estudio fueron siempre mayores en los sistemas de cultivo *in vitro* en comparación con los obtenidos en plantas en campo o casa de cultivo (Tabla 1). Los mayores rendimientos en el proceso de extracción de la biomasa producida *in vitro* pudieran estar asociados a las condiciones controladas en que se desarrolla el proceso, lo cual trae consigo una mayor homogeneidad y calidad del material vegetal.

En la especie *Morinda royoc* donde se comparan diferentes sistemas de cultivo *in vitro* se comprobó que a medida que el nivel de diferenciación celular era menor (brotes, callos y suspensiones celulares) se incrementó el rendimiento y la calidad de los extractos.

En los perfiles de los compuestos analizados en *Morinda royoc* a pesar de que hubo diferencias al detectarse picos de sustancias diferenciales para todas las muestras, se encontró una mayor similitud en los perfiles de metabolitos entre las muestras de las hojas de plantas en campo y los brotes *in vitro*, así como similitud entre los callos y las suspensiones celulares. Las diferencias observadas en los perfiles entre hojas de campo-brotes *in vitro* y callos-suspensiones celulares puede explicarse por las distintas fases de desarrollo, organización de tejido y diferenciación celular, lo que implica una regulación diferencial de regulación génica y por consiguiente diferencias en los compuestos obtenidos en los distintos sistemas de cultivo.

Tabla 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de cada una de las muestras de plantas en campo o invernadero y de la biomasa producida *in vitro*.

Especies	Sistemas de cultivo	Masa seca (g)	Extracto (mg)	Rendimiento (%)
<i>M. royoc</i>	Plantas en casa de cultivo	1.4	240.59	17.2
	Brotes <i>in vitro</i>	1.3	310.27	23.9
	Callos	1.9	547.89	28.8
	Suspensiones celulares	0.8	347.43	43.4
<i>P. guajava</i>	Plantas en campo	1.7	202.53	11.9
	Brotes <i>in vitro</i>	1.1	248.51	22.6
<i>M. alba</i>	Plantas en campo	1.3	206.67	15.9
	Brotes <i>in vitro</i>	1.2	260.25	21.7

En la especie *Morinda royoc* se lograron aislar en las muestras de las plantas en casa de cultivo iridoides con actividad biológica conocida. En los brotes *in vitro* se encontraron 19 compuestos que no se encontraron en las hojas de plantas de casa de cultivo. En el cultivo de callos y suspensiones celulares fue donde se encontró el mayor número de compuestos identificados, los cuales no se aislaron en las hojas de las plantas en campo ni en los brotes *in vitro*. Entre los compuestos encontrados están los aminoácidos, glicósidos flavonoides y cardiotónicos, antraquinonas y otras sustancias como la artemisinina de gran interés farmacéutico.

La morindina es un compuesto específico del género *Morinda* y se identificó en el cultivo de callos y en suspensiones celulares.

Se comprobó que en el cultivo de callos y suspensiones celulares se obtiene un amplio espectro de sustancias, superior a los obtenidos en las muestras de hojas de plantas en campo y brotes *in vitro*, es decir en tejidos menos especializados la gama de compuestos producidos fue superior. Además, fue posible detectar compuestos no identificados hasta el momento, en brotes, callos y suspensiones celulares.

En la especie *Psidium guajava* las muestras de hojas de plantas en campo y los brotes multiplicados *in vitro* presentaron perfiles de expresión completamente distintos. El número de compuestos detectados en las muestras de las hojas de plantas en campo fue superior al de los brotes *in vitro*, sin embargo, en este sistema de cultivo se encontraron 23 compuestos no identificados en plantas en campo.

La mayoría de los compuestos identificados en ambas muestras pertenecen al grupo de los triterpenos, saponinas y ácidos considerados sustancias antioxidantes y pudieran tener un efecto en el fortalecimiento del sistema inmunológico y disminuir el riesgo de tumores malignos (Jiménez, 2001; Suntornsuk, 2002).

En *Morus alba* al igual que en *Psidium guajava* y contrario a lo observado en *Morinda royoc*, los perfiles de compuestos detectados en las muestras de hojas de plantas de campo y brotes multiplicados *in vitro* fueron diferentes. En las muestras de hojas provenientes de las plantas en campo, fue superior la gama de compuestos encontrados al compararlos con las muestras de los brotes *in vitro*. En los brotes *in vitro* se encontraron 24 nuevos compuestos que no aparecen en las muestras de plantas de campo, entre ellos compuestos aromáticos típicos del género *Morus*.

En todas las especies en estudio fue posible mediante el cultivo *in vitro* la identificación de compuestos que no se expresan en muestras de hojas de plantas en campo o casa de cultivo y a la vez fue detectada una amplia gama de compuestos nuevos, que no fue posible identificar y que constituyen una fuente importante de nuevas moléculas con posible función biológica.

REFERENCIAS

- Baiza A, Quiz-Moreno A, Ruiz J, Loyola-Vargas V (1999) Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59: 9-17
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851
- Harborne JB (2000) Class and functions of secondary products. En: Walton NJ, Brown DE (eds.) *Chemicals from Plants, Perspectives on Secondary Plant Products*, pp.1-25 Imperial College
- Jiménez A (2001) Guava fruit (*P. guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 49(11): 5489-93
- Le Gall G, Metzдорff S, Pedersen J, Bennett R, Colquhoun (2005) Metabolite profiling of *Arabidopsis thaliana* (L.) plants transformed with an antisense chalcone synthase gene. *Metabolomics* 1(2):181-198
- Massot B, Milesi S, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A (2000) Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62: 11-19
- MEGABOLITE® Base de Datos Compañía Analyticon Alemania
- Moreno-Valenzuela OA, Galaz-Avalos RM, Minero-García Y, Loyola-Vargas VM (1998) Effect of differentiation on regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root. *Plant Cell Rep* 18: 99-104
- Suntornsuk L (2002) Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *J. Pharm. Biomed.* 28(5): 849-55
- Tisserat B, Vaughn SF (2001) Essential oils enhanced by ultra-high carbon dioxide levels from Lamiaceae species grown *in vitro* and *in vivo*. *Plant Cell Rep.* 20: 361-368
- Vanek T, Langhansová L, Marsik P (2005) Cultivation of cultures of *Panax ginseng* in different bioreactors and in temporary immersion-Comparison of growth and saponin production. En: (eds) T. Hvos- Elf, W. Preil. *Liquid systems for in vitro mass propagation of plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Verpoorte R, Alfermann A W (2000) *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht
- Weekwerth W, Wenzel K, Fiehn O (2004) Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics* 4: 78-83