

## Cultivos *in vitro* de células transformadas de *Solanum chrysotrichum* para la producción de saponinas antimicóticas.

Yadira Dávila<sup>1</sup>, Jesús Arellano<sup>2</sup> y Ma. Luisa Villarreal<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de investigación en biotecnología-UAEM luisav@buzon.uaem.mx. <sup>2</sup>Centro de investigación sobre fijación de nitrógeno-UNAM.

Palabras clave: *Solanum chrysotrichum*, saponinas antimicóticas, *Rhizobium tumefaciens*.

**Introducción.** *Solanum chrysotrichum* Schldl. (Solanaceae), conocida comúnmente como “sosa” es una planta que crece en una limitada área de Chiapas (1). Estudios etnobotánicos aplicados en 200 comunidades indígenas de ese estado indican que extractos acuosos de hojas de *S. chrysotrichum* son utilizados en el tratamiento de micosis de piel, resultando de primera elección para curar *Tiña pedis* (2). Utilizando extractos metanólicos de hojas de *S. chrysotrichum* los estudios farmacológicos y químicos demostraron la existencia de 5 saponinas espirostanicas (SC-1, SC-2, SC-3, SC-4 y SC-5) y 2 glicosidos esteroidales con actividades antimicóticas diferenciales (3). Los cultivos de células vegetales ofrecen una alternativa para producir de forma controlada metabolitos con actividad terapéutica. En un estudio previo se establecieron cultivos de células en suspensión de *S. chrysotrichum* y se valoró la producción de la saponina SC-1, que resultó 50 veces superior a lo acumulado en plantas silvestres (4).

Una consecuencia lógica de esta serie de estudios consiste en probar procesos biotecnológicos para obtener concentraciones superiores de las saponinas bioactivas por medio de la transformación genética, que en esta investigación se aplicará vía el sistema *Rhizobium tumefaciens*.

**Metodología.** Movilización del plásmido pBI121 a las cepas B6 y C58 de *Rhizobium tumefaciens*.- Se prepararon células competentes de cada una de las cepas y por electroporación se introdujo el plásmido pBI121.

Transformación genética de *S. chrysotrichum*.- Se obtuvieron segmentos nodales de plántulas de 3 meses de edad, dichos explantes se infectaron con las cepas B6-pBI121 y C58-pBI121. Al obtener callos en condiciones selectivas para células transformadas, se procedió a establecer cultivos en suspensión y realizar una selección de las líneas celulares transformadas por ploteo Fig. 1. La transformación de cada una de las líneas se analizará por PCR y por la expresión de  $\beta$ -glucuronidasa. Las posibles líneas hiperproductoras de saponinas antimicóticas se identificarán por CLAR.

**Resultados y discusión.** En algunos explantes de *S. chrysotrichum* infectados con las cepas de *Rhizobium*, se obtuvieron callos que se mantuvieron en condiciones selectivas para identificar transformaciones.

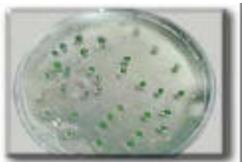


Fig. 1. Selección por ploteo de linajes celulares transformados.

Cuadro 1. Porcentaje de formación de callos después de la infección.

Plántulas utilizadas	# tallos infectados	Cepa utilizada	# callos	% Transformación
8	20	B6/pBI121	5	25
30	100	B6/pBI121	16	16
10	25	C58/pBI121	5	20
14	50	C58/pBI121	18	36
19	50	C58/pBI121	15	30
30	100	C58/pBI121	20	20
8	20	C58/pBI121	8	40

Algunos callos crecieron en medio selectivo y fueron subcultivados durante 2 meses hasta obtener biomasa suficiente para iniciar los cultivos de células en suspensión. Los cultivos líquidos se mantuvieron en un régimen de selección para la transformación genética y se subcultivaron durante 1 mes. Se hizo un ploteo para identificar linajes celulares genéticamente modificados los cuáles crecieron en un medio con doble selección y serán evaluados molecularmente mediante PCR. En cada linaje celular se cuantificará la producción de saponinas antimicóticas mediante CLAR.

**Conclusiones.** Los cultivos de callos de *S. chrysotrichum* obtenidos después de la infección con cepas de *R. tumefaciens* crecen en medio selectivos en ausencia de reguladores del crecimiento.

El porcentaje de formación de callos de *S. chrysotrichum* después de sufrir infección con cepas de *Rhizobium tumefaciens* varió del 16-40%.

**Agradecimiento.** Este proyecto de investigación fue financiado por CONACYT (35459-B).

### Bibliografía.

- Lozoya, X., y Aguilar. (1987). Encuestas sobre el uso actual de las plantas en la medicina tradicional mexicana. Rev. Med. IMSS. México. 25:283-291.
- Lozoya X., Navarro, V., García, M. E., y Zurita, M. (1991). *Solanum chrysotrichum* (Schld) a Mexican plant used for treatment of skin mycosis. J. of Ethnopharm. 36: 127-132.
- Zamilpa, A, Tortoriello, J, Navarro, V, Delgado, G, y Alvarez, L. (2003). New five steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimycotic activity. J. Natural Prod.
- Villarreal, M. L., Arias, C., Feria-Velasco, A., Ramírez, O. T. And Quintero, R. (1997). Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* (Schld). A plant producing an antifungal spirostanol saponin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50: 39-44.