

PRODUCCION DE CALLOS DE *Catharanthus roseus* (L) G. DON in vitro

GERARDO LOPEZ JURADO*

INTRODUCCION

El cortejo (*Catharanthus roseus* (L) G. Don, familia Apocynaceae), originario de Madagascar, ha sido ampliamente investigado por los productos del metabolismo secundario, lo que ha conducido al aislamiento de más de 90 indol alcaloides (Carew, 1966).

Los alcaloides extraídos del cortejo individualmente poseen un amplio espectro de efectos biológicos. De estos alcaloides, la vincristina y la vinblastina, los más investigados, son invaluable agentes para la quimioterapia de linfoma y leucemia linfocítica, las cuales están entre los tipos de cáncer más devastadores en la niñez (Loyola-V., 1987).

En plantas in vivo de *Catharanthus roseus* se encuentran solamente unos pocos miligramos de los alcaloides mencionados por kilogramo de tejido fresco (Heijden et al., 1989).

Los bajos rendimientos de los alcaloides vinblastina y vincristina en la plantas in vitro, aproximadamente 0,0005%, y el consecuente alto precio de ellas, vincristina US \$1.000.000 y vinblastina US \$3.500.000 por kilogramo (Heijden et al., 1989), han estimulado la investigación dirigida hacia la producción en gran escala de cultivo de células o tejidos principalmente producción de callos de *Catharanthus roseus*, cultivados in vitro, donde estos alcaloides se encuentran en mayor proporción (Carew, 1966).

* Ing. Agr., Ph. D. Profesor Titular Facultad de Ciencias Agrícolas.
Universidad de Nariño. Pasto, Colombia.

El trabajo tuvo como objetivo general desarrollar una metodología para la obtención en forma masiva de callos de cortejo *Catharanthus roseus* como materia prima para la obtención de alcaloides, y como objetivos específicos: a. examinar el comportamiento de diversos explantes, para la obtención de callos; b. analizar el efecto de diversos medios de cultivo en la producción de callos, y c. obtener callos en forma abundante para ser proporcionados como material para la extracción de alcaloides en otras investigaciones (Street, 1977 y Loyola-V., 1987).

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Nariño, entre marzo de 1990 y julio de 1991.

Obtención del material madre

Las plantas madres de cortejo *Catharanthus roseus* se seleccionaron de material que estaba creciendo en forma espontánea en el campo; las plantas seleccionadas se sembraron en un huerto cercano al lugar de trabajo y se regaron en forma conveniente. Estas plantas sirvieron como material para la obtención de los diferentes tipos de explantes que se probaron en el desarrollo del trabajo.

Selección del material vegetal

Para analizar el comportamiento de los diferentes tipos de explantes, incluidos: ápices de tallos, meristemos, yemas axilares, pecíolos y hojas, (Kyte, 1983; Hurtado y Merino, 1988) se tomaron las partes correspondientes, de plantas de cortejo completamente sanas.

Desinfección del material vegetal

Con el fin de determinar cuál era la mejor combinación para la desinfección (Hartman y Kester, 1981) de los diferentes explantes de cortejo y que al mismo tiempo no produjera daños en los mismos, se empleó un diseño de parcelas sub-sub-divididas, con cuatro

aplicaciones, correspondiendo a cada replicación 20 fracasos.

Los tratamientos principales estuvieron representados por el tiempo (1 y 5 minutos) que debería permanecer el material vegetal en alcohol antes de pasar a la solución de hipoclorito; los subtratamientos estuvieron constituidos por diversas concentraciones de hipoclorito de sodio-agua (1:1, 1:2 y 1:3); y como sub-subtratamientos el tiempo (1, 5 y 10 minutos) que debería permanecer el material vegetal en la solución de hipoclorito.

Previo a la aplicación de los tratamientos, para la desinfección, antes mencionados, se hicieron los siguientes pasos: 1. enjuague en agua jabonosa, 2. enjuague en agua de grifo, y 3. enjuague en agua estéril (CIP, 1983). Los tratamientos con alcohol e hipoclorito se realizaron en condiciones completamente asépticas, dentro de una cámara de flujo laminar.

Corte del material vegetal

El corte de los diferentes explantes se realizó de la siguiente forma: con el uso de un microestereoscopio, previamente desinfectado y colocado dentro de la cámara de flujo laminar, se eliminaron de las yemas las hojas y las estípulas, usando un bisturí y pinzas esterilizadas.

Para la obtención del ápice terminal o axilar se dejaron tres primordios foliares. Para la obtención del meristemo se eliminaron los primordios foliares con la ayuda de una aguja curva, dejando de uno a dos primordios foliares, y con una microcuchilla se cortó finalmente el ápice terminal, en forma perpendicular al eje del meristemo o apice, según el caso.

Para obtener los explantes de hojas y pecíolos, se cortaron las hojas en pedazos de 0,5 cm, y los pecíolos en secciones de 2-3 mm.

Determinación del mejor explante

Para la determinación del mejor explante (ápices de tallos, meristemas, yemas axilares, pecíolos u hojas) de *Catharanthus*

roseus, se procedió así: con la ayuda de pinzas o de la punta del bisturí se trasladaron los diferentes explantes, después de haber sido cortados, rápidamente al frasco correspondiente que contenía el medio nutritivo sólido de Murashige y Skoog (1962). Se colocó un explante por frasco, con 40 repeticiones por tratamiento.

Con el fin de lograr un crecimiento armónico los diferentes explantes se colocaron en posición vertical.

Los frascos se cubrieron con papel de aluminio, se protegieron con papel vinipel y se marcaron en forma conveniente.

La desinfección, el corte y la siembra de los diferentes explantes se realizó bajo condiciones de estricta asepsia, dentro de la cámara de flujo laminar.

Cultivo de hojas

Una vez que se determinó que las hojas eran el mejor explante para la producción de callos, se procedió al cultivo de las mismas.

Los ensayos se hicieron con plantas de diferente fenotipo y edad.

Debido a las diferencias encontradas en el desarrollo de callos a partir de hojas de un mismo genotipo, se evaluó el sitio y el estado de desarrollo de las hojas de *Catharanthus roseus*, clasificadas así: según la posición en la planta en los tercios superior, medio e inferior; - parte de la hoja: basal, media, apical; - edad de la hoja: tierna, joven, adulta, y - coloración de las flores de la planta: blancas, rosadas.

Medios de cultivo utilizados

Aunque las plantas completas tienen requerimientos simples para el crecimiento, los cultivos de tejidos vegetales presentan necesidades más complejas y rara vez autotróficas (Staba, 1980).

En la presente investigación se probaron los medios de White (1934), Linsmaier y Skoog (1965) y BRVS2 (Robins y Hervey, 1969). El

medio de Murashige y Skoog (1962) sirvió como control.

Preparación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon utilizando las sales y concentraciones indicadas para cada medio de cultivo.

Todos los componentes de cada medio de cultivo se pesaron en una balanza analítica de alta precisión y se disolvieron en agua desionizada y destilada. La solución completa se ajustó al pH indicado para cada medio de cultivo utilizando soluciones 1 N de HCl y NaOH, previo a la adición del agar. La distribución del medio se hizo a razón de 25 ml/frasco.

La esterilización se hizo en un autoclave a 121°C, durante 15 minutos; al cabo de los 15 minutos se redujo lentamente la presión del autoclave, se sacaron los frascos y se los dejó quietos hasta que solidificaron.

Los frascos con los diferentes medios se guardaron bajo refrigeración (8 a 10°C) hasta su utilización.

Siembra del explante

La desinfección y la siembra de los diferentes explantes se efectuó en un cuarto aséptico, dentro de una cámara de flujo laminar de aire con presión positiva, previamente esterilizada con luz ultravioleta y alcohol al 96%.

Incubación

Los frascos previamente cubiertos con papel aluminio y papel vinipel, se colocaron en estantes especiales para el crecimiento, con luz y temperaturas controlables.

La temperatura de incubación varió entre 24 y 30°C, tanto durante el día como durante la noche. La iluminación se dió con lámparas fluorescentes de 40 W. El fotoperíodo fue de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, el cual se consiguió en forma automática. La

humedad relativa fué de aproximadamente 50%.

Desarrollo de los explantes

Después de la primera semana de incubación y hasta la séptima semana, se hicieron observaciones principalmente en cuanto a la formación de callos en los diferentes explantes, anotando: porcentaje de frascos de ensayo no contaminados, aparición de callos, características de los mismos como tamaño, color, posición en el explante, aspecto general del explante analizado, y características del medio de cultivo utilizado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Desinfección del material vegetal

De los varios tratamientos analizados para la desinfección del material vegetal de *Catharanthus roseus*, para la producción de callos, se encontraron diferencias estadísticas significativas para: el tiempo que el material vegetal debía permanecer en alcohol; la concentración de hipoclorito de sodio; el tiempo que debía permanecer el material vegetal en las diferentes concentraciones de hipoclorito, y para sus interacciones.

Se encontró que el mejor tiempo que el material debe permanecer en alcohol era de cinco minutos (Tabla 1).

La concentración de hipoclorito de sodio suficiente y necesaria para una mejor desinfección fue la concentración 1:3 (Tabla 2).

El tiempo en que el material puede permanecer en el desinfectante, sin producirle ningún daño al material vegetal fue de 10 minutos (Tabla 3).

La mejor combinación para la desinfección de las hojas de *Catharanthus roseus* para la producción de callos, se consideró aquella que cumpliera al mismo tiempo dos características: a) que produjera una buena desinfección en el material vegetal y, b) que no

impidiera el desarrollo normal de callos.

Con las concentraciones 1:1 y 1:2 (v/v) de hipoclorito de sodio-agua se produjo muerte del explante en un gran porcentaje, no dando oportunidad al material vegetal restante para la producción de callo.

De los variados tratamientos estudiados, el que mejor funcionó para la desinfección de las hojas de *Catharanthus roseus* fue el siguiente: 1.- Lavar con agua jabonosa (10 min) 2.- Enjuagar con agua de grifo (varias veces) (Dodds y Robert, 1984), 3.- Enjuagar con agua estéril (varias veces), 4.- Colocar en alcohol 70% (5 min), 5.- Desinfectar con hipoclorito de sodio comercial 1:3 v/v (10 minutos), 6.- Lavar con agua esterilizada (varias veces), 7.- Cortar, sembrar.

Con la anterior metodología se logró obtener hasta un 95% de control de la contaminación para todos los materiales evaluados.

Determinación del mejor explante

Se examinó el comportamiento de diversos tipos de explantes, incluidos ápices de tallos, meristemos, yemas axilares, pecíolos y hojas. Después de las primeras pruebas desarrolladas durante 15 semanas, se encontró que el mejor explante para el desarrollo de callos fueron las hojas.

Se descartaron como posibles explantes los restantes, así: los ápices de tallos, meristemos y yemas axilares, por la dificultad de conseguir un número suficientemente grande de plantas de *Catharanthus roseus* homogéneas así sea fenotípicamente; y los pecíolos, por no servir como material somático para el desarrollo de callos.

Cultivo de hojas

a. Posición de hojas en la planta

El análisis de variancia sobre el efecto de la posición de las hojas en los tercios superior, medio e inferior de la planta sobre la producción de callos determinó que había diferencias estadísticas altamente

significativas.

No se encontraron diferencias apreciables en la producción de callos a partir de hojas provenientes de los tercios medio e inferior de la planta, pero sí diferencia altamente significativa en la producción de callos de las hojas provenientes de los tercios anteriores, con las hojas localizadas en el tercio superior de la planta (Tabla 4).

Se encontró que con el material proveniente del tercio inferior de la planta había un mayor porcentaje de contaminación comparado con el material del tercio medio superior.

El material del tercio superior produjo callos, pero en un tiempo mayor al necesario para la producción de callos provenientes del tercio medio e inferior. Por tanto, es preferible usar como material de explante las hojas colocadas en el tercio medio de la planta.

b. Parte de la hoja

La parte de la hoja en que se encontró más rápida formación de callos (2-3 semanas) fue la parte media. Realizado el análisis de variancia se encontró que sí había diferencias en cuanto a la formación de callos a partir de la parte basal, media y apical de la hoja.

Según la prueba de Tukey (Tabla 5) la parte media y la parte apical de la hoja no muestran diferencias estadísticas significativas en cuanto a la formación de callos, lo mismo que la parte apical y la basal entre ellas, pero sí una diferencia entre la parte media con relación a la parte apical y basal.

c. Edad de las hojas

En cuanto a la edad de las hojas de *Catharanthus roseus*, para la producción de callos, se encontraron diferencias altamente significativas.

Realizada la prueba de Tukey (Tabla 6) no se encontraron diferencias significativas entre las hojas jóvenes y las hojas adultas, pero sí entre éstas y las hojas tiernas; esto es que para la producción de callos es

mejor la utilización de hojas jóvenes las cuales producen callos de mejor calidad y en mayor cantidad.

d. Coloración de las flores de las plantas

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en cuanto a la formación de callos a partir de hojas provenientes de plantas de *Catharanthus roseus* con flores de colores blanco o rosado.

Por tanto, cuando se trata de usar hojas de *Catharanthus roseus*, como explante para la producción de callos, no importa de donde provengan las hojas en cuanto a la coloración de las flores de las plantas.

Medios de cultivo

Debido a que se conocía muy poco sobre los requerimientos nutricionales, hormonales y físicos del medio nutritivo para el cultivo *in vitro* de hojas de *Catharanthus roseus*, se ensayaron varios medios con el fin de determinar el óptimo para obtener un buen desarrollo de los explantes para la formación de callos.

Realizado el correspondiente análisis de variancia se encontraron diferencias altamente significativas para los diferentes medios de cultivo.

La prueba de Tukey (Tabla 7) confirmó que había diferencias altamente significativas entre el medio de White y los demás medios analizados; que no había ninguna diferencia en cuanto a la producción de callos entre los medios de Murashige y Skoog, y Linsmaier y Skoog, pero sí de éstos y el medio BRVS₂; y que el medio BRVS₂ era el medio menos apropiado para la producción de callos a partir de hojas de *Catharanthus roseus*.

Se encontró que el medio más adecuado, y ensayado con los mejores resultados, estaba compuesto por las sales del medio basal descritas por White (1934), además, ácido nicotínico (0,5 mg/L), piridoxina-HCl (0,5 mg/L), Tiamina-HCl (10 mg/L), glicina (2 mg/L), cinetina (0,05 mg/L), 2,4-D (1 mg/L), agar (8 mg/L), sacarosa (20 mg/L),

con un pH de 5,5.

Condiciones ambientales de cultivo

Se ensayaron varias condiciones ambientales de incubación para asegurar un desarrollo rápido y abundante de callos, y al mismo tiempo evitar la oxidación del material.

La combinación que mejores resultados dio tuvo las siguientes características: oscuridad inicial (2 semanas) y temperatura de 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) y luego condiciones de luz 16 horas y 8 horas de oscuridad (5 semanas) y 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) de temperatura.

Subcultivo

Los callos obtenidos en los diferentes tratamientos se cultivaron transfiriéndolos enteros o parte de ellos a un medio sólido fresco, con el objeto de que adquirieran un crecimiento más rápido.

La transferencia del callo o del fragmento del mismo debe ser una masa de entre 5 y 8 mm, para asegurar la renovación del crecimiento sobre el medio fresco. Cuando se transfirió una masa de tejido calloso menor de 3 mm, la velocidad de crecimiento fue muy lenta y en algunos casos no creció.

Los callos en general fueron de color blanco o blanco cremoso y de buena friabilidad, esto es de consistencia suave. Cuando el callo es friable permite la transferencia directa a la superficie del medio fresco, únicamente utilizando una espátula o un bisturí esterilizados.

Las nuevas células se formaron en la periferia de la masa de callo existente, la cual se encuentra sometida a un gradiente nutricional que va desde las células que están en contacto directo con el medio nutritivo, hasta las que crecen en la superficie del callo.

Cuando los callos se dejaron crecer por mucho tiempo en el mismo medio y en asociación con el tejido original, se presentó una detención en el crecimiento, ocasionada por el consumo de nutrientes esenciales, al igual que por la pérdida de agua, la secreción de

metabolitos por el callo y la desecación gradual del agar.

Por esta razón se aconseja el subcultivo a un medio fresco después de cierto tiempo para que no mueran y crezcan en mejores condiciones, tiempo que se ha estimado para la especie objeto de esta investigación de tres a cinco semanas.

CONCLUSIONES

Se logró determinar una metodología de desinfección de material vegetal para lograr hasta un 95% de control de contaminación.

El mejor explante para el desarrollo de callos fueron las hojas.

Con referencia al material somático, los mejores resultados, en cuanto a la formación de callos, se obtuvieron con: a. las hojas colocadas en el tercio medio de la planta, b. la parte media de la hoja, c. las hojas con una edad intermedia entre jóvenes y adultas.

Las hojas provenientes de plantas con flores blancas o rosadas producen la misma cantidad de callos.

Se determinó como el medio más adecuado para el desarrollo de callos, el medio basal de White.

El período de incubación más adecuado para el desarrollo de callos fue de dos semanas con oscuridad inicial y cinco semanas con fotoperíodo de 16/8 y 24°C de temperatura.

La resiembra debe hacerse entre 3 y 5 semanas, y el callo debe tener entre 5 y 8 mm.

BIBLIOGRAFIA

CAREW, D. P. Growth of callus tissue of *Catharanthus roseus* in suspension cultures. *J. Pharm. Sci.* 55:1153. 1966.

- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). Producción de semilla mediante cultivo de tejidos. CIP Circular 11(4):4. 1983.
- DODDS, J. H. and ROBERTS, L. W. Experiments in plant tissue culture. Cambridge, University Press, 1984. 178 p.
- HARTMAN, H. T. and KESTER, P. J. Propagación de plantas: principios y prácticas. 2 ed. México, CECSA, 1981. 814 p.
- HEIJDEN, R. Van Der; VERPOORTE, R. and HOOPEN, H. J. G. T. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus* (L) G> Don: a literature survey. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 18:231-280. 1989.
- HURTADO M., D. V. y MERINO, M., M. E. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas, 1988. 232 p.
- KYTE, L. Plant from test tubes: an introduction to micropropagation. Portland, Oregon, Timber Press, 1983. 132 p.
- LINSMAIER, E. M. and SKOOG, F. Organic growth factor requirements for tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 18:100-127. 1965.
- LOYOLA-VARGAS, V. M., *et al.* Tissue culture and tumor induction in *Catharanthus roseus*. In International Congress of plant tissue culture tropical species. Abstracts. Bogotá, 1987. pp. 11.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15:473-497. 1962.
- OCHOA A., N. Establecimiento de cultivos *in vitro*. In Villalobos, V. M. (ed.). Fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. México, Colegio Postgraduados Chapingo, 1985. pp. 64-71.

- ROBBINS, W. J. and HERVEY, A. Auxin and growth of excised roots of *Bryophyllum calycinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 64:495-497. 1969.
- STABA, J. E. Plant tissue culture as a source of biochemicals. Boca Raton, Fla., CRS Press, 1971. 1980. s. p.
- STREET, H. E. Plant tissue and cell culture. 2nd ed. Berkeley, Los Angeles, University of California Press, 1977. V.2.
- WHITE, P. R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology* 9:586-600. 1934.

TABLA 1. PRUEBA DE TUKEY PARA EL EFECTO DE TIEMPO EN ALCOHOL PARA LA DESINFESTACION DE HOJAS DE *Catharanthus roseus* PARA LA PRODUCCION DE CALLOS.

Tiempo en alcohol (min)	% callos (promedio)
5	61,25 A(*)
1	39,22 B

(*) Promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 0,05% de probabilidad.

Comparador Tukey(0,05) = 2,868

TABLA 2. PRUEBA DE TUKEY PARA EL EFECTO DE LA CONCENTRACION DE HIPOCLORITO DE SODIO PARA LA DESINFESTACION DE HOJAS DE *Catharanthus roseus* PARA LA PRODUCCION DE CALLOS.

Concen. hipoclorito (v/v)	% callos (promedio)
1:3	61,25 A(*)
1:2	39,22 B
1:1	20,21 C

(*) Promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 0,05% de probabilidad.

Comparador Tukey(0,05) = 3,457

TABLA 3. PRUEBA DE TUKEY PARA EL EFECTO DE TIEMPO EN HIPOCLORITO DE SODIO PARA LA DESINFESTACION DE HOJAS DE *Catharanthus roseus* PARA LA PRODUCCION DE CALLOS.

Tiempo en hipoclorito (min)	% callos (promedio)
10	56,04 A(*)
5	50,00 B
1	45,42 C

(*) Promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 0,05% de probabilidad.

Comparador Tukey(0,05) = 3,475

TABLA 4. PRUEBA DE TUKEY PARA EL EFECTO DE POSICION DE LAS HOJAS EN LOS TERCIOS SUPERIOR, MEDIO E INFERIOR DE LA PLANTA DE *Catharanthus roseus* PARA LA PRODUCCION DE CALLOS.

Posición hojas (tercios)	% callos (promedio)
Medio	61,25 A(*)
Inferior	88,75 A
Superior	81,25 B

(*) Promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 0,05% de probabilidad.

Comparador Tukey(0,01) = 6,33

TABLA 5. PRUEBA DE TUKEY PARA EL EFECTO DE POSICION DE LA PARTE APICAL, MEDIA Y BASAL DE LA HOJA DE *Catharanthus roseus* PARA LA PRODUCCION DE CALLOS.

Parte de la hoja	% callos (promedio)
Media	88,75 A(*)
Apical	85,42 A B
Basal	84,58 B

(*) Promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 0,05% de probabilidad.

Comparador Tukey(0,05) = 3,609

TABLA 6. PRUEBA DE TUKEY PARA EL EFECTO DE LA EDAD DE LAS HOJAS DE *Catharanthus roseus* PARA LA PRODUCCION DE CALLOS.

Edad hojas (madurez)	% callos (promedio)
Joven	87,50 A(*)
Adulta	83,75 A
Tierna	32,50 B

(*) Promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 0,01% de probabilidad.

Comparador Tukey(0,01) = 5,448

TABLA 7. PRUEBA DE TUKEY PARA EL EFECTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE CALLOS A PARTIR DE HOJAS DE *Catharanthus roseus* .

Medios de cultivo	% callos (promedio)
White	91,25 A(*)
Murashige y Skoog	57,50 B
Linsmaier y Skoog	57,50 B
BRVS ₂	12,50 C

(*) Promedios seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel del 0,01% de probabilidad.

Comparador Tukey(0,01) = 5,50