



PATENTE DE INVENCION

Case No.24.154.

40 29 16

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para producir un metabolito vegetal quimico mediante cultivo en suspensión.

Solicitante

AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, residente en Berdan Avenue, Township of Wayne, Estado de New Jersey, EE.UU. de A.

Int. Cl. ² C 12 D

La presente invención se relaciona con la producción de sustancias químicas mediante el cultivo de tejidos vegetales bajo condiciones sumergidas aeradas en cultivo líquido. Más particularmente, la presente invención se relaciona con la producción de metabo -

5.

402916



litos vegetales químicos.

- Desde hace muchos años se sabe que es posible hacer crecer tejidos vegetales independientemente de las plantas originarias completas, cultivando los tejidos bajo condiciones que son en general similares a las utilizadas para cultivar microorganismos en la producción de antibióticos y similares. La técnica ha reconocido que este cultivo de tejidos vegetales representa potencialmente una fuente de metabolitos vegetales químicos valiosos, es decir sustancias químicas que son producidas durante el crecimiento normal de las plantas. Sin embargo, este potencial ha permanecido inaprovechado a pesar de la evidente ventaja de un ambiente de crecimiento completamente controlado que ofrece el cultivo de tejidos vegetales, en comparación con los métodos agrícolas convencionales.
- 5.
- 10.
- 15.
- Por ejemplo, se propuso producir valiosos metabolitos vegetales mediante el cultivo de órganos de raíz enteros bajo condiciones aerobias sumergidas en un medio nutritivo acuoso apropiado, en una manera estrictamente análoga a la utilizada en la producción de antibióticos. Aunque esta técnica ha logrado un moderado éxito en el laboratorio, parece improbable que sea susceptible de utilización comercial, principalmente debido a los problemas mecánicos de hacer crecer y manipular una gran masa de material de raíz fibroso grueso. Otra tentativa de solución ha involucrado hacer crecer células individuales no diferenciadas de la planta. Puesto que aún una sola célula de una planta contiene toda la información genética que es característica de la planta como conjunto, parece razonable esperar que el cultivo de células vegetales individuales, bajo condiciones
- 20.
- 25.
- 30.

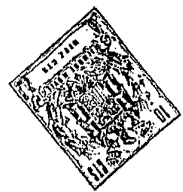


apropiadas, debería conducir a la producción de los metabolitos normalmente asociados con la planta. En efecto, se han publicado varios informes de la detección de metabolitos vegetales normales en sistemas de crecimiento de células nominalmente no diferenciadas dispersas. Sin embargo, aún si se considera los informes de este trabajo primitivo por su valor aparente, los niveles de concentración de metabolitos que se han logrado, han estado netamente por debajo de los logrados en el desarrollo normal de la planta. Por consiguiente, este cultivo de células no diferenciadas no ha encontrado aplicación práctica.

Se ha comprobado ahora, de acuerdo con la presente invención, que se puede obtener cantidades útiles de metabolitos vegetales mediante cultivo en suspensión, caracterizado como el procedimiento de generar primordiales de órganos de una planta que se sabe que elabora el metabolito, reduciendo el nivel de actividad de auxina en un medio nutritivo aerobio acuoso que tiene células no diferenciadas, en crecimiento, de racimos de células de dicha planta sumergidos en el mismo; y cultivar los primordiales de órganos resultantes, hasta que se obtiene las cantidades útiles de metabolitos vegetales.

Se logra esto inoculando un medio nutritivo acuoso con células no diferenciadas, en vigoroso crecimiento, de la planta que se sabe que elabora el metabolito. Se mantiene en el medio el crecimiento de las células no diferenciadas, durante un periodo de tiempo bajo condiciones aerobias sumergidas en presencia de una sustancia que provee actividad de auxina al medio. Se reduce entonces el nivel de actividad de auxina de manera que se produce rediferenciación de las cé-

-4402916



lulas vegetales, con la aparición de primordiales de órganos vegetales y con la concomitante elaboración del metabolito. Se mantiene el crecimiento de las células vegetales rediferenciadas en el medio durante un periodo de tiempo bajo condiciones aerobias sumergidas de modo de producir una composición a la cual se denomina "masa de cosecha entera". Este crecimiento da por resultado la acumulación de cantidades fítiles de los metabolitos a los cuales se aísla entonces y se los recoge mediante métodos convencionales.

5.

10.

Un "primordial", tal como se le utiliza en esta descripción, se define como un órgano rudimentario que es identificable como conteniendo elementos estructurales microscópicos análogos a los que se observan en el correspondiente órgano del embrión de planta normal en alguna etapa de su desarrollo. Por lo tanto, puede haber primordiales de raíz que son reconocibles como similares a tejido de raíz embrionario; primordiales cotilendónarios, similares a las etapas embrionarias del desarrollo cotilendónario; y primordiales de tallos y plúmulas, también análogos a las partes del embrión normal en alguna etapa de su desarrollo.

15.

20.

Bajo ciertas circunstancias, pueden aparecer primordiales más complejos, que contienen elementos de más de un componente embrionario, y en efecto, bajo ciertas circunstancias, pueden aparecer estructuras embrioidales enteras, a las cuales se considera entonces que son los primordiales de la planta entera.

25.

Para el procedimiento de la presente invención es esencial hacer crecer más todavía las células no diferenciadas o racimos de células bajo condiciones favorables para la rediferenciación y el desarrollo de los primordiales. Por ejemplo, se ha comprobado que en aquellos casos en los cua-

30.



- les no se produjo diferenciación de las células, o se vió impedida de producirse, no hay formación de metabolitos químicos normales. Estos resultados contradicen algunos de los trabajos publicados sobre cultivos de células individuales y, por el contrario, los experimentos de la presente invención prestan apoyo a la teoría de que el pequeño grado de formación de metabolitos químicos que se observa en sistemas de células nominalmente no diferenciadas, por los trabajadores anteriores, se debe probablemente a la presencia, aunque no reconocida, de centros diferenciados en los racimos de células del sistema. Sea como sea, se utiliza condiciones de crecimiento que dan por resultado un grado sustancial de formación de primordiales, mientras que la técnica anterior ha elegido condiciones de crecimiento que son favorables para el mantenimiento de células no diferenciadas, es decir que evitaban deliberadamente la formación de primordiales.
- 5.
- 10.
- 15.

- Como ejemplos de los tipos de metabolitos vegetales químicos, que se pueden obtener mediante los principios de la presente invención, se puede mencionar: alcaloides, tales como estricnina y brucina a partir de especies Strychnos los alcaloides de rauwolfia a partir de las especies de Rauwolfia ó Alstonia; vinblastina a partir de la especie Catharanthus (anteriormente la especie Vinca); alcaloides de atropa de miembros de la familia Solanaceae; gomas, a partir de las especies Beta vulgaris y Malva; colorantes de las especies Indigofera, Rhus, Beta y Lawsonia; aceites esenciales a partir de las especies Mentha, Lavandula y Rosa; plaguicidas a partir de las especies Chrysanthemum, Derris y Lonohocarpus; resinas a partir de las especies Pinus y Juniperus; caucho a partir de las especies Parthenium argentatum, Heva, Ficus
- 20.
- 25.
- 30.

402916



- y Taraxacum; agentes aromatizantes a partir de las especies Sassafras, Smilax y Betula; y glicósidos cardíacos a partir de Convallaria, Digitalis, etc. En los libros de texto normales se puede encontrar una extensa enumeración de metabolitos vegetales útiles. Sin embargo, la naturaleza de los metabolitos vegetales químicos obtenibles mediante la presente invención no puede definirse en términos de géneros o familias de plantas específicos, y aún menos en función de los productos verdaderos, puesto que la presente invención es de aplicación general al segmento completo formador de semilla del reino vegetal, o sea al filo Spermatophyta que consiste en aproximadamente 300.000 especies.
- 5.
- 10.

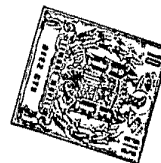
- Para poner en práctica el procedimiento de crecimiento sumergido de la presente invención, se emplea un medio acuoso que contiene una o más fuentes de carbono metabolizable tal como carbohidratos o derivados de ácido graso, y una fuente asimilable de nitrógeno tal como el ión de nitrato, ión de amonio, glicina o urea. Los requisitos de los diversos tipos de tejidos vegetales varían un poco en sus detalles. Sin embargo, como fuente de carbono preferida se puede utilizar materiales tales como glucosa, sacarosa, jarabe de maíz, almidón, dextrosa y otros materiales de esta naturaleza. Además, el medio nutritivo contiene sales minerales, incluyendo fosfatos, cloruros, sulfatos, y metales que incluyen sodio, potasio, calcio, magnesio y aquellos elementos necesarios en cantidades vestigiales. Los metales vestigiales están normalmente presentes como impurezas en todos menos los compuestos inorgánicos más altamente purificados. Se los puede agregar si en los medios se emplea sustancias químicas purificadas. El requisito mineral óptimo del cultivo
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

-4-2916



- particular utilizado puede determinarse mediante experimentación rutinaria. A menudo son bastante apropiadas las mezclas de sales metálicas, tales como las utilizadas en medios para fermentaciones de moho. Otro componente de los medios básicos, además de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y sales minerales, son las vitaminas. En general, pueden ser necesarias por lo menos una o más de las vitaminas comunes para crecimiento óptimo del tejido vegetal mediante el procedimiento de la presente invención. Incluyen tiamina, riboflavina, ácido pantoténico y niacina. Una mezcla de los mismos asegurará un crecimiento satisfactorio. Es particularmente útil una fuente de vitamina cruda tal como extracto de levadura. Como en el caso de las sales minerales, el requisito de vitamina del tejido particular que se utiliza podrá determinarse con relativa facilidad. En general, para el cultivo de los tejidos vegetales se utiliza una solución de carbohidrato, fortificada con sustancias minerales y vitaminas. Gamas apropiadas de sustancias nutritivas, en miliequivalentes por litro, son potasio 2 a 20; amonio 5 a 50; magnesio 0,2 a 2; calcio 0,5 a 5; fósforo 0,25 a 2,5; y nitrato 0 a 50. Se utiliza convenientemente los carbohidratos a razón de 5 a 50 g/lit y de preferencia 10 a 30 g/lit. Cuando se utiliza una sustancia que posee actividad de auxina, para activar el crecimiento apropiado de un material vegetal no diferenciado, se la deberá emplear en una concentración muy diluida en medios ya sea sólidos o líquidos. Es apropiado un nivel de 1×10^{-4} a $0,5 \times 10^{-7}$ y de preferencia aproximadamente 5×10^{-6} molar, aunque se puede emplear concentraciones un poco más elevadas o más bajas.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
30. El término "auxina", tal como se le utiliza aquí,

- 8402916



- es un término general para las fitohormonas que activan el crecimiento de las plantas o los constituyentes reguladores del crecimiento de las mismas. Las auxinas naturales, es decir las sustancias que manifiestan actividad reguladora del crecimiento y que se presentan en plantas enteras vivas, se considera por lo general que son ya sea ácido 3-indolacético o ciertos derivados del mismo tales como sus ésteres, glicósidos, etc. Las sustancias con actividad de auxina incluyen las auxinas naturales como así también compuestos químicos de origen sintético que poseen actividad fitohormonal activa-
5. dora del crecimiento. A veces se hace referencia a las sustancias con actividad de auxina como estimulantes del crecimiento celular de tipo embrionario. Las sustancias típicas con actividad de auxina, utilizables en la presente invención,
10. son ya conocidas y como ejemplo se puede mencionar ácido 3-indolacético, ácido 3-indolbutírico, ácido 1-naftalenacético, ácido p-clorofenoxiacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, y similares. Se conocen también en la técnica los compuestos "anti-auxina",
15. es decir compuestos que pueden inhibir o neutralizar la actividad fitohormonal de las sustancias con actividad de auxina. Anti-auxinas típicas, conocidas en la técnica, son por ejemplo ácido 1-naftoxiacético, ácido cinámico, ácido trópi-
20. co, ácido 2,3,5-triodobenzoico y ácido 2,4,6-triclorofenoxiacético.
25.

- En la literatura han sido descritos diversos -
medios nutritivos para el cultivo de células vegetales no
diferenciadas. Por ejemplo, una adaptación de uno de los me-
dios de la literatura, de P.R. White, consiste en los siguien-
tes ingredientes:
30.

402916



	<u>Componente</u>	<u>Concentración</u> <u>mg/lt</u>
	Nitrato de calcio	200
	Sulfato de magnesio	360
	Nitrato de potasio	80
5.	Cloruro de potasio	65
	Sulfato de sodio	200
	Fosfato monosódico	16,5
	Sulfato ferroso	2,5
	Ioduro de potasio	0,75
10.	Sulfato manganeso	4,50
	Sulfato de cinc	1,50
	Acido bórico	1,50
	Tiamina	0,1
	Piridoxina	0,1
15.	Acido nicotínico	0,5
	Glicina	3,0
	Sacarosa	20.000
	Acido naftalenacético	Según sea necesario
	También es útil el medio nutritivo basal conocido de	
20.	Heller, que contiene:	
	<u>Componente</u>	<u>Concentración</u> <u>mg/lt</u>
	Cloruro de potasio	750
	Nitrato de sodio	600
25.	Heptahidrato de sulfato de magnesio	250
	Hidrato de fosfato monosódico	125
	Dihidrato de cloruro de calcio	75
	Sacarosa	20.000,0
	más microsustancias nutritivas según se indica a continuación:	
30.	Cloruro férrico	1,0

- 10 - 4.2.16



	Sulfato de cinc	1,0
	Acido bórico	1,0
	Sulfato manganoso	0,1
	Sulfato cúprico	0,03
5.	Cloruro de aluminio	0,03
	Cloruro de níquel	0,03
	Ioduro de potasio	0,01
	Molibdato de sodio	0,05

- A estos medios, como así también diversos otros igualmente tabulados en la literatura, se los suplementa con compuestos de actividad de auxina o antiauxinas y/o citoquinenos, de acuerdo con lo necesario, para lograr finalidades particulares. Sin embargo, en términos generales, el medio básico particular utilizado no es de gran importancia, sirviendo solamente para llevar al óptimo los resultados de crecimiento con un material vegetal particular. Se ha comprobado que el medio de Linsmaier y Skoog (ver Ejemplo 29) o el de Gambory (ver Ejemplo 10) son apropiados como punto de partida desde el cual se puede desarrollar medios óptimos para materiales vegetales de toda especie.

- Para poner en práctica la presente invención, es necesario desarrollar primeramente un cultivo de células no diferenciadas, en vigoroso crecimiento, de la especie deseada y el estado de la técnica de los cultivos de tejidos vegetales ha avanzado ahora hasta el punto de que se puede llevar esto a cabo a voluntad mediante simple experimentación. Por ejemplo, se puede obtener un cultivo de células individuales de Catharanthus roseus, inoculando segmentos de tallos vivos libres de gérmenes de Catharanthus roseus sobre la superficie de una placa inclinada de agar constituida por un medio

-402916



- nutritivo que contiene una sustancia con actividad de auxina. Ventajosamente se agrega un citoquineno tal como quinetina o zeatina como factor auxiliar de división celular. El medio nutritivo contiene los elementos minerales principales y vestigiales comunes, una fuente asimilable de carbono y de nitrógeno tal como ión de amonio o nitrato, y de preferencia una o más vitaminas de la familia B. Después de algunos días a semanas de incubación entre 15 y 35°C, se observa que sobre el segmento de inoculum original se ha formado tejido "calloso" que consiste en un racimo de nuevo crecimiento celular no organizado. Se extirpa este nuevo crecimiento y se le transfiere asépticamente a una nueva placa inclinada de agar o de preferencia a un medio líquido que tiene la misma composición (omitiendo el agar) y se incuba sobre un sacudidor, también entre 15 y 35°C. Se produce nuevo crecimiento y subdivisión, y se llevan a cabo transferencias adicionales del material celular hacia nuevo medio, observando particulares precauciones para transferir de preferencia cualquier aglomerado más pequeño que se haya desarrollado en la etapa de incubación precedente. Después de varias transferencias de esta clase a nuevo medio, se comprueba que se produce la transformación del material a un modo más disperso de crecimiento y, en efecto, mediante una atención apropiada a los detalles, según será evidente para los entendidos en esta materia, es posible llegar a un sistema que consiste sustancialmente por entero en pequeños racimos de células no diferenciadas o de células individuales no diferenciadas dispersadas en el medio líquido. Este es el estado ideal para el mantenimiento del clono originario. Cualquier selección o mutación del organismo de la planta puede llevarse ahora a cabo con este -
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- material exactamente en la misma manera en que se han llevado a cabo operaciones de esta clase con microorganismos. Por consiguiente, la selección de nuevas líneas de células (cepas de células) a partir de una población de esta clase, ya sea con o sin procedimientos de mutación asociados, puede
5. llevarse a cabo en base a la morfología de las células, formación de pigmento (o falta del mismo), régimen de crecimiento, capacidad para crecer sobre un medio elegido, o en general en base a cualquiera de los factores que han sido utilizados clásicamente para la selección de cultivos microbianos industriales. Sin embargo, es especialmente deseable la selección que se basa en la capacidad de producir una mayor cantidad del metabolito deseado en la etapa diferenciada productiva, y se lleva a cabo esta selección mediante ensayo.
- 10.
15. También se llega por experimentación al medio y otras condiciones de crecimiento que son necesarios para hacer que las células vegetales individuales no diferenciadas o racimos de células se rediferencien hasta el punto de formar primordiales y por lo tanto entrar en la fase química de
20. la producción de metabolitos. Se puede llevar a cabo la fase de rediferenciación del crecimiento sobre medios sólidos, o en brei semisólido, o en medios líquidos, aunque se prefiere estos últimos medios. De preferencia se hace crecer las células no diferenciadas y los racimos, a los cuales se puede designar como "pre-embriones" en un sistema líquido aerado
25. sumergido exactamente en la misma manera que si fueran microorganismos que, en un cierto sentido, lo son como células libres. Para cultivo aerobio sumergido, no se solidifica el medio con un agente gelificante, aunque pueden resultar útiles
30. las bajas concentraciones de espesadores tales como agar o



- metil celulosa para modificar la viscosidad y por lo tanto el estado de corte en el sistema agitado. Por lo demás, el medio de crecimiento también contiene los iones elementales usuales minerales principales y vestigiales, carbón disponible, nitrógeno disponible, fuentes de azufre y fósforo, y una o más vitaminas B. En términos generales, se lleva a cabo la transición, desde el estado de células no diferenciadas al estado productor de metabolitos rediferenciados o químicos, disminuyendo el nivel de actividad de auxina del medio de crecimiento. Se puede lograr este menor nivel de actividad de auxina mediante la transferencia de las células no diferenciadas a un medio que tiene un menor nivel de actividad de auxina, o mediante dilución del medio de la etapa de crecimiento no diferenciado con un nuevo medio que no contiene actividad de auxina, o agregando un compuesto antiauxina al medio de la etapa de crecimiento no diferenciado después de haberse logrado un nivel satisfactorio de crecimiento no diferenciado. En el caso en que la sustancia de actividad de auxina es metabólicamente inestable, como por ejemplo el ácido 3-indolacético, se puede dejar simplemente que el nivel de actividad de auxina disminuya en forma natural, mediante la prolongación del tiempo de incubación. Es difícil o imposible especificar un nivel absoluto de actividad de auxina al cual se debe mantener el crecimiento no diferenciado, puesto que este nivel es diferente para diferentes compuestos con actividad de auxina y es también diferente para células de diferentes especies de plantas. Esta interdependencia de especies y de nivel de actividad de auxina, para el mantenimiento del crecimiento no diferenciado, es probablemente una consecuencia de diferente sensibilidad de las
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.

432916



- diferentes especies a los compuestos particulares con actividad de auxina y puede depender también del nivel de la auxina endógenamente producida que también varía de una especie a la otra. Por lo tanto, el nivel óptimo para una determinada sustancia con actividad de auxina, para mantener células de crecimiento no diferenciado de una determinada especie de planta, se determina mediante experimento. Mediante esta experimentación, utilizando la sustancia de actividad de auxina más popular, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, se ha comprobado -
5. que es suficiente aproximadamente $2 \text{ a } 20 \times 10^{-6} \text{ mol/lit}$ del
10. compuesto con actividad de auxina para mantener el crecimiento de células no diferenciadas para muchas especies de material vegetal. Con un nivel demasiado elevado de sustancia con actividad de auxina, aparecen signos de toxicidad tales como
15. crecimiento pobre o incluso muerte de células. A niveles demasiado bajos del compuesto con actividad de auxina, no se mantiene el modo deseado de crecimiento no diferenciado. A los compuestos con actividad de auxina, más intensamente activos, tales como el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, se
20. los debe utilizar a niveles más bajos de los mencionados más arriba para el ácido 2,4-diclorofenoxiacético. A la inversa, a las sustancias con actividad de auxina menos activas, tales como el ácido 1-naftalenacético, se las debe utilizar a niveles un poco más elevados que los mencionados para el ácido -
25. 2,4-diclorofenoxiacético.

Naturalmente, cuando se desea producir rediferenciación de un determinado material vegetal, reduciendo el nivel de actividad de auxina, será conveniente que el nivel del compuesto con actividad de auxina, en el medio de la etapa no

30. diferenciada, no sea considerablemente mayor que el necesario



- para mantener justamente el crecimiento en la forma no diferenciada. Por lo tanto se requiere solamente una dilución mínima, con medio libre de auxina, para disminuir el nivel de actividad de auxina al que permite que se produzca la rediferenciación. En términos generales, será necesaria una dilución de por lo menos dos veces con un nuevo medio libre de auxina, para disminuir la actividad de auxina desde el nivel de crecimiento no diferenciado al nivel que permite la rediferenciación. Los grados más altos de dilución permitirán el uso de niveles más altos pero menos críticos de actividad de auxina en la etapa no diferenciada. Naturalmente, cuando se suprime la actividad de auxina mediante el lavado de las células no diferenciadas, no se requerirá aumento en el volumen final. Esto también es verdad (es decir, no se requiere aumento de volumen), cuando se emplea adición de una antiauxina para reducir el nivel eficaz de la actividad de auxina.
- 5.
- 10.
- 15.

- Típicamente, para la inducción de crecimiento diferenciado, se inocula el medio apropiado (menor actividad de auxina) con 5 a 50% de su volumen de la etapa de crecimiento (no diferenciado) dispersa que se obtiene de acuerdo con lo descrito más arriba para Catharanthus roseus, y se incubaba entonces en un recipiente sacudido, girado o agitado, entre 15 y 35°C, y de preferencia entre 20 a 30°C, hasta que tiene lugar en la medida deseada el crecimiento diferenciado organizado. Bajo estas condiciones, el crecimiento organizado afecta la forma de pequeñas perlas, que tienen por lo general 0,5 a 4 mm en su dimensión más grande, que muestran una estructura microscópica o aún macroscópica que corresponde a una estructura que se observa en uno o más órganos de la planta intacta.
- 20.
- 25.
- 30.

- 402916



- Cuando se ha logrado un nivel satisfactorio de crecimiento en la etapa de crecimiento diferenciado, es decir cuando han sido formadas cantidades sustanciales del metabolito deseado, por lo general después de 3 días a 3 semanas, se cosecha la lechada de primordiales vegetales, y normalmente se trata entonces para recuperar el producto metabolito deseado. De acuerdo con la naturaleza del productometabolito, se puede llevar esto a cabo mediante extracción en solvente o mediante una breve cocción seguida por filtración para separar los sólidos vegetales usados, y precipitar específicamente el producto deseado, o separándolo por métodos de adsorción o de intercambio de iones. El método de aislación seguirá por lo general cualquier procedimiento que se utilice para la aislación del metabolito determinado con respecto al material vegetal entero, y de ninguna manera la presente invención reside en el método específico de aislación que se utilice.
- 5.
- 10.
- 15.

- En algunos casos puede resultar innecesario aislar el producto metabolito deseado con respecto a la masa de los primordiales vegetales. En efecto, esta masa misma puede ser el producto deseado; por ejemplo, se puede aplicar el procedimiento de la presente invención a la cepa de maíz de alto contenido de lisina para obtener como resultado la conversión neta de sacarosa e ión de amonio o de nitrato, que son económicos, a proteína de alta calidad.
- 20.
- 25.

- Se describirá más en detalle la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos específicos, en los cuales todas las partes y porcentajes son en peso a menos que se indique lo contrario.
- 30.

EJEMPLO 1



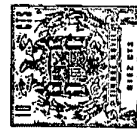
Inducción del crecimiento calloso de *Beta vulgaris*
sobre un material vegetal normal y mantenimiento
sobre un medio solidificado

- Se hace germinar semillas de remolacha roja común, *Beta vulgaris* variedad Detroit Select Globe, sobre papel de filtro húmedo y, cuando han emergido por completo, se esteriliza las plantas jóvenes, así germinadas, mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min. (Después de este punto, todas las operaciones que involucran tejido vivo se llevan a cabo bajo condiciones de rigurosa asepsia). Se transfiere estas plantas jóvenes sobre un círculo de papel de filtro estéril húmedo y se las corta en las partes componentes de segmentos radicales, los segmentos de hipocotilo y segmentos de cotiledón, y se transfiere cada uno de estos segmentos a platillos de petri separados de 10,2 cm que contienen 30 ml, cada uno, del siguiente medio.

<u>Medio MS</u>		
	<u>Componente</u>	<u>Concentración</u> <u>mg/lit</u>
20.	Los iones de minerales principales y fuentes de nitrógeno	Nitrato de potasio 950
		Nitrato de amonio 720
		Heptahidrato de sulfato de magnesio 185
		Dihidrato de cloruro de calcio 220
25.		Fosfato de potasio 68
	Elementos vestigiales	Heptahidrato de sulfato ferroso 30
		Hidrato de sulfato manganoso 7
		Heptahidrato de sulfato de cinc 4
30.		Acido bórico, anhidro 2



- | | | |
|-----|--|---|
| | Elementos vestigiales | <ul style="list-style-type: none"> Molibdato de amonio 0,1 Ioduro de potasio 0,4 Pentahidrato de sulfato cúprico 0,12 |
| 5. | Fuente de carbono | — Sacarosa 20.000 |
| | Agente solidificante | <ul style="list-style-type: none"> Agar 10.000 |
| 10. | Vitaminas | <ul style="list-style-type: none"> Biotina 0,1 Cloruro de colina 1 Inositol 1.000 Acido nicotínico 1 Acido pantoténico 1 Piridoxina 1 Riboflavina 1 Tiamina 1 |
| 15. | Compuesto con actividad de auxina | <ul style="list-style-type: none"> Acido 2,4-diclorofenoxiacético 6 |
| | Citoquinina | — Quinetina 0,06 |
| | Agua destilada, c.s.p. | 1 lt. |
| 20. | Se esteriliza el medio mediante tratamiento en autoclave durante 20 min. a una presión de vapor de 1,05 kg/cm ² . Se incuba las placas inoculadas a 25°C en luz amortiguada y, después de tres semanas, se puede observar terrones de tejido calloso sobre los extremos de varias de las - | |
| 25. | piezas de inoculum originales. Se contamina unas pocas placas con hongos o sobrecrecimiento bacteriano y se las descarta. El callo que aparece sobre las placas no contaminadas es transferido a frascos de 100 ml que continen cada uno 30 ml del mismo medio de agar y se continúa la incubación durante | |
| 30. | 5 semanas más bajo las mismas condiciones. Después de este | |



tiempo se produjo suficiente crecimiento para que resultara posible el subcultivo en otros varios frascos.

EJEMPLO 2

Inducción de crecimiento no organizado en un medio líquido y selección de subclonos que tienen las propiedades deseadas de crecimiento

5.

10.

15.

20.

25.

30.

Desde cada uno de los varios frascos de agar subcultivado del Ejemplo 1, se transfiere un terrón de un diámetro de aproximadamente 8 mm, de tejido calloso de color castaño oscuro, a un frasco de Erlenmeyer de 250 ml que contiene 60 ml. de un medio que posee la composición indicada más arriba, pero omitiendo el agar. A estos frascos, que contienen ahora el medio líquido inoculado, se los dispone sobre un sacudidor rotativo que trabaja a razón de 120 r.p.m. con un círculo de sacudimiento de 25 mm y se incuban con sacudimiento continuo en luz difusa durante 4 semanas a 25°C. Al término de este tiempo, se observa diferentes resultados en los varios frascos, lo cual refleja en cierto grado la selección inadvertida de tipos de células durante las etapas previas. Se puede observar que algunos frascos contienen solamente un terrón grande de callo, algunos contienen el terrón originario más algunos fragmentos más pequeños aparentemente idénticos que representan sectores que han crecido a partir del original y que se desprendieron durante la incubación, y algunos frascos contienen fragmentos desprendidos por rotura que son ellos mismos de diverso aspecto, representando probablemente una segregación adicional de tipos de células.

Se elige aquellos frascos que contienen fragmentos más pequeños y aquellos que contienen fragmentos de diferentes aspectos con respecto a los terrones originarios, para su cultivo adicional y, después de 6 de estas etapas de se-



- lección adicional, transferencia e incubación, se obtiene una línea de células que poseen las propiedades deseadas de crecimiento rápido en frascos sacudidos y crecimiento bajo la forma de células individuales y pequeños aglomerados completamente no pigmentados, que tienen un diámetro menor de 0,5 mm. Estos aglomerados no muestran estructura fina bajo el microscopio fuera de las células componentes. El régimen de crecimiento es tal que, desde menos de 1% en volumen de células en el inoculum, el volumen de células después de dos semanas de incubación sobre el sacudidor rotativo es 20% del volumen líquido total. Estas propiedades permanecen estables al realizar la transferencia en masa en el mismo medio.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 3

15. Reinducción de crecimiento diferenciado como primordiales vegetales en cultivo líquido aerado sumergido
- Se deja sedimentar el contenido de uno de los frascos de material celular de Beta vulgaris no organizado y no pigmentado, disperso, según se le obtiene de acuerdo con el Ejemplo 2, y se separa por decantación y se descarta el líquido claro sobrenadante. Se lava dos veces las células y racoimos de células sedimentados, agregando cada vez 60 ml de medio líquido libre de auxina (el medio del Ejemplo 1, omitiendo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y también el agar) y decantando el líquido libre después de dejar que se sedimente el material celular. Se utiliza entonces las células, así lavadas, en partes iguales para inocular diez frascos de Erlenmeyer de 250 ml, cada uno de los cuales contiene 60 ml del medio líquido libre de auxina, y se incuban estos frascos sobre el sacudidor rotativo, de acuerdo con lo descrito más arriba, durante tres semanas a 25°C. Durante este perio-
- 20.
- 25.
- 30.



5. do de incubación, las células y racimos de células del inoculum se multiplican intensamente, y hacia el término de este período se produce rediferenciación, de modo de obtener una lechada de partículas de color anaranjado y rojo brillantes que, bajo un microscopio de bajo poder, se puede ver que consisten casi enteramente en diminutos primordiales de raíz, cada uno de los cuales contiene abundantemente el pigmento normal del cultivo originario de Beta vulgaris utilizado.

EJEMPLO 4

10.

Aislación del pigmento

- Se filtra la lechada de primordiales de raíces provenientes de 10 frascos del ejemplo precedente, en cuyo punto se puede observar que la totalidad del pigmento se encuentra en la fracción celular y nada en el filtrado, al cual se descarta. Con la masa celular se vuelve a formar una lechada en 500 ml de agua y se hace hervir la mezcla, lo cual da por resultado que el pigmento es desprendido hacia el líquido. La filtración da por resultado células agotadas, a las cuales se descarta, y un filtrado de color rojo brillante al cual se trata adicionalmente haciéndolo pasar lentamente a través de una columna de resina intercambiadora de cationes Dowex 50X2[®] de 2,54 x 15,2 cm que retiene esencialmente la totalidad del pigmento bajo la forma de una banda roja brillante de 5,08 cm cerca de la parte superior de la columna. La elución del pigmento desde la columna se lleva a cabo mediante el uso de una solución al 1% de bicarbonato de sodio y se aísla el pigmento con respecto a la misma mediante acidificación hasta pH 5, secado por congelación de la solución, y extracción del pigmento betanidina libre con respecto al producto secado por congelación, mediante metanol. La betanidina
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



dina es útil como colorante vegetal para fines de coloración de alimentos.

EJEMPLO 5

Crecimiento a mayor escala de primordiales de Beta vulgaris

5. En la manera descrita en el Ejemplo 2 se prepara inóculum lavado y se emplea un frasco del mismo para -
inocular una etapa intermedia que consiste en 500 ml del
medio líquido del Ejemplo 3 contenido en una botella de vidrio de borosilicato de 1 lt. Después de sacudir durante 8
10. días a 120 r.p.m. a 25°C, se emplea los contenidos totales de esta botella para inocular 10 lt del mismo medio, contenido en una damajuana de vidrio de borosilicato de 20 lt y se incuba entonces utilizando un agitador magnético para la agitación y haciendo entrar aire estéril a razón de 1 lt/min,
15. a través de una regadera sumergida. El producto es una lechada roja de primordiales de raíz que es completamente análoga a la obtenida en los frascos de laboratorio con sacudidor.

EJEMPLO 6

20. Derivación de cultivos de células no diferenciadas de Digitalis purpurea mediante cultivo de antera

25. De una planta de Digitalis purpurea crecida en el campo se retira un botón de flor no abierta y se esteriliza superficialmente mediante una breve inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Bajo condiciones -
asépticas, se disecciona el botón y se transfieren las anteras a la superficie de agar de un platillo de petri que contiene 15 ml del medio MS solidificado descrito en el Ejemplo 1. Después de 18 días de incubación a 28°C, se puede observar el crecimiento de varios pequeños terrones callosos de las explantas de antera. Después de otros 20 días, se produjo un creci-
- 30.



miento adicional intenso de los terrones de callos no diferenciados. Se separa los racimos de callos y se los transfiere a nuevos platillos de agar del mismo medio y se alimenta con este medio por transferencia cada 14 días.

5.

EJEMPLO 7

Crecimiento de células no diferenciadas de *Digitalis purpurea* como cultivo disperso en frascos con sacudidor

Se utiliza racimos de callos de un diámetro de aproximadamente 8 mm de una placa de agar del Ejemplo 6 como inoculum para cada uno de 5 frascos de Erlenmeyer que contienen 25 ml del medio estéril líquido que posee la siguiente composición.

10.

Medio MMS

<u>Componente</u>	<u>Concentración mg/lt</u>
Nitrato de potasio	950
Heptahidrato de sulfato de magnesio	185
Dihidrato de cloruro de calcio	220
Fosfato monopotásico	68

15.

Además, los elementos vestigiales tales como sacarosa, vitaminas, compuesto con actividad de auxina, y citoquimeno del medio MS.

20.

Después de 18 días de incubación, los frascos muestran que se combinaron los mejores y más dispersos crecimientos, y se deja sedimentar el material celular, se separa el líquido claro sobrenadante vertiéndolo, y se lava la masa celular con 50 ml de nuevo medio MMSR libre de auxina que tiene la siguiente composición.

25.

Medio MMSR

<u>Componente</u>	<u>Concentración mg/lt</u>
Nitrato de potasio	950

30.



	Heptahidrato de sulfato de magnesio	185
	Dihidrato de cloruro de calcio	220
	Fosfato monopotásico	68
	Heptahidrato de sulfato ferroso	30
5.	Hidrato de sulfato manganoso	7
	Heptahidrato de sulfato de cinc	4
	Acido bórico	2
	Molibdato de amonio	0,1
	Ioduro de potasio	0,4
10.	Pentahidrato de sulfato cúprico	0,12
	Sacarosa	20.000
	Biotina	0,1
	Cloruro de colina	1,0
	Inositol (peso)	1.000
15.	Acido nicotínico	1,0
	Acido pantoténico	1,0
	Piridoxina	1,0
	Riboflavina	1,0
	Tiamina	1,0
20.	Quinetina	0,06

25. Durante 5 min. se sacude la suspensión de células reconstituidas y se deja nuevamente sedimentar, se separa el sobrenadante claro vertiéndolo y se le descarta. Se lava una vez más la masa celular en la misma manera con el medio MMSR.

EJEMPLO 8

Crecimiento de células de *Digitalis purpurea* bajo condiciones de rediferenciación

30. Se utiliza la masa celular lavada, del ejemplo precedente, para inocular 20 frascos (frascos de Erlenmeyer de 250 ml) cada uno de los cuales contiene 25 ml del medio MMSR.



5. Se incuban estos frascos sobre el sacudidor rotativo bajo luz amortiguada a 28°C durante 10 días, en cuyo momento se puede ver que cada frasco contiene una multitud de pequeñas partículas, consistiendo cada partícula en una pequeña masa callosa con una o varias raíces primordiales irradiantes.

EJEMPLO 9

Detección de glicósidos esteroidales en primordiales de raíces cultivados de Digitalis purpurea

10. Se reúne los contenidos de los frascos de suspensión de primordiales de raíces de Digitalis purpurea del precedente ejemplo, y se los filtra por gravedad a través de un filtro de papel ondulado. Durante la noche se seca a 50°C la masa de sólidos recogida, obteniéndose 14 g de sólido seco. Se somete a reflujo 100 mg de este producto con 3 ml de etanol acuoso al 70% durante 1 h y se separa por centrifugación el extracto etanólico. Se evapora el extracto etanólico en una corriente de nitrógeno hasta un volumen de 0,9 ml. y se extrae dos veces en cloroformo este residuo acuoso. Se salpica el extracto clorofórmico completo sobre una placa cromatográfica de capa delgada de ácido silícico y se revela el cromatograma con una mezcla solvente que consiste en 50 partes de ciclohexano, 50 partes de acetona, y 2 partes de ácido acético glacial. Después de la revelación, se seca la placa de capa delgada y se la rocía con una solución saturada de vainillina en ácido fosfórico acuoso al 50%. Se calienta la placa, así rociada, en un horno de aire caliente a 120°C durante 15 min., en cuyo momento se puede ver puntos de color gris azulado oscuro a Rf 0,32 y Rf 0,50, en alineamiento exacto con los puntos testigo de digitoxina y digoxina sobre la misma placa. Se puede observar otros glicósidos de esteroide a Rf 0,0, 0,05 y 0,80, pero no se los identifica positivamente.



EJEMPLO 10

Derivación de un cultivo de células no diferenciadas de *Datura stramonium*

- Se corta plantas jóvenes crecidas en tiestos - de *Datura stramonium* 1 cm por encima del nivel del suelo y se esteriliza superficialmente el retoño cortado mediante inmersión, durante 1 min., en una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Se lava entonces el retoño completo en agua estéril y se explanta porciones cuadradas de 5 mm de lado, de varias hojas, sobre la superficie de un medio de agar G (Gamborg) en platillos de petri de 100 mm.

Medio G

	<u>Componente</u>	<u>Concentración</u> <u>mg/l</u>
	Nitrato de potasio	2500
	Sulfato de amonio	134
15.	Monohidrato de fosfato monosódico	150
	Heptahidrato de sulfato de magnesio	250
	Dihidrato de cloruro de calcio	150
	Etilendiaminatetraacetato ferroso	28
	Monohidrato de sulfato manganoso	10
20.	Acido bórico	3
	Heptahidrato de sulfato de cinc	2
	Dihidrato de molibdato de sodio	0,250
	Pentahidrato de sulfato cúprico	0,025
25.	Hexahidrato de cloruro cobaltoso	0,025
	Ioduro de potasio	0,750
	<u>meso</u> -Inositol	100
	Acido nicotínico	1
	Tiamina	10
30.	Piridoxina	1

402916



Agar purificado	1000
Sacarosa	20,000
Acido 2,4-diclorofenoxiacético	1
Quinetina	0,060

5. Se ajusta el pH a 5,5 de acuerdo con lo necesario.

Después de 5 semanas de incubación en la oscuridad a 28°C, se observa vigoroso crecimiento de racimos callosos sobre la superficie y los bordes de los explantes de hoja.

10. Se separa varios de estos terrones callosos y se transfieren asépticamente cada uno a frascos de Erlenmeyer a 250 ml que contienen 50 ml del medio G líquido (composición como la expuesta más arriba pero omitiendo el agar) y se incuban los frascos sobre el sacudidor rotativo en luz amortiguada a

15. 25°C. A medida que crece el material calloso no diferenciado, se le subcultiva hacia frascos similares en un ciclo de 14 días, seleccionando el material más disperso a medida que aparece, y después de 3 de estas selecciones y transferencias, se obtiene una línea de células que manifiesta el modo deseado de crecimiento como células individuales y pequeños racimos de células.

EJEMPLO 11

Rediferenciación de *Datura stramonium* en cultivo en suspensión para formar primordiales de raíz

25. Se selecciona un frasco de cultivo de células no diferenciadas dispersas de *Datura stramonium* según se le obtiene en el ejemplo precedente, seis días después de la transferencia precedente, y se filtra asépticamente por gravedad sobre un filtro de malla de nilón de 100 micrones. Se

30. lava la masa celular con un medio G que carece de ácido -

-402916



- 2,4-diclorofenoxiacético y se emplea las células resultantes, libres de auxina, para inocular una serie de 5 frascos que contienen el medio G pero que tienen respectivamente concentraciones totales de ácido 2,4-diclorofenoxiacético agregado de 0,002, 0,004, 0,008, 0,016 y 0,032 mg/lt. Se incuban estos frascos sobre el sacudidor rotativo bajo luz amortiguada a 28°C durante 10 días, en cuyo momento los tres frascos, con los niveles más bajos de actividad de auxina agregada, muestran una copiosa formación de primordiales de raíz.

10.

EJEMPLO 12

Aislación de hiosciamina y/o su producto racémico, la atropina, a partir de células diferenciadas cultivadas de *Datura stramonium*

15.

A través de un papel ondulado se filtra por gravedad uno de los frascos del ejemplo precedente (que contiene originalmente 0,004 mg/lt de ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y se lava con agua la masa recogida de primordiales de raíz y se tritura la masa de tejidos húmeda resultante (7 g en condición húmeda) con 5 ml de ácido sulfúrico acuoso 0,1 normal. Se separa el líquido libre mediante centrifugación

20.

y se le hace alcalino mediante hidróxido de amonio concentrado, y se extrae tres veces en porciones de 10 ml de cloroformo. Se retroextrae los extractos clorofórmicos combinados, con 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 normal de modo de obtener un concentrado acuoso de productos alcaloidales, y a estos últimos se los hace a su vez alcalinos mediante hidróxido de amonio concentrado y se los extrae en 0,6 ml de cloroformo.

25.

Se evapora el extracto clorofórmico hasta aproximadamente 50 lt y se salpica la cantidad completa sobre el origen de una placa cromatográfica de capa delgada de ácido silícico.

30.

Se revela la placa con una mezcla solvente que consiste en 9



- partes de cloroformo y 1 parte de dietilamina. Después de secar la placa, así revelada, se la rocía con solución de iodoplatinato (0,5 ml de solución de cloruro de platino al 10% agregada a 25 ml de solución de yoduro de potasio al 2%)
5. para revelar varios puntos de alcaloide, de los cuales el más fuerte aparece en Rf 0,45, en alineación exacta con un punto testigo de atropina sobre la misma placa. El alcaloide, comúnmente hallado en el estado natural en plantas de Datura stramonium, es la 1-hiosciamina ópticamente activa, pero comúnmente se emplea este material en medicina en su forma racemizada que se conoce como atropina. La cromatografía no distingue entre las formas activa y racémica.
- 10.

EJEMPLO 13

15. Rediferenciación de Datura stramonium en cultivo en suspensión para formar primordiales vegetales enteros

- Como inoculum se utiliza explantes estériles de hojas de Datura stramonium en frascos sacudidores con medio del Tipo G que contiene 2 mg/lit de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se forman callos dentro de 8 días y se los transfieren
20. al mismo medio y se los incuban durante otros 10 días de modo de obtener una suspensión no diferenciada dispersa de células libres y de pequeños racimos de células. Se lava este material celular con un medio del tipo G libre de auxina y se le utiliza como inoculum para frascos sacudidores que contienen
25. el medio del tipo G libre de auxina. Después de 16 días de incubación sobre el sacudidor de movimiento alternativo a 25°C, el examen microscópico demuestra la presencia de grandes cantidades de primordiales vegetales enteros, es decir cuerpos similares a embriones que corresponden, por su estructura, a la "etapa de corazón" y "etapa de torpedo" del
- 30.

402916



desarrollo normal de embriones vegetales.

EJEMPLO 14

Derivación de cultivos de células no diferenciadas de
Rauwolfia serpentina

- Se descaroza frutas despulpadas comerciales -
5. frescas de Rauwolfia serpentina, cascando cuidadosamente el carozo duro y retirando la semilla interna intacta. Se esteriliza superficialmente estas semillas mediante inmersión, durante 5 min, en hipoclorito de sodio al 1% y se lava con agua estéril. Se hace germinar las semillas estériles mediante incubación sobre papel de filtro húmedo estéril en
10. platillos de petri en una incubadora a 28°C. La germinación comienza en 8 días y aproximadamente después de 18 días las plantas jóvenes han emergido por completo del recubrimiento de las semillas. Se transfiere intactas las plantas jóvenes estériles a la superficie de agar de platillos de petri que
15. contienen medio de agar MMS al cual se agregó 10% en volumen de leche de coco estéril. Después de 2 semanas, han aparecido masas callosas sobre las raíces, tallo y cotiledones de las plantas jóvenes y se corta este material calloso y
20. se le transfiere a un nuevo medio de la misma clase en platillos de petri. Se realiza dos otras de estas transferencias a intervalos bisemanales y se transfiere entonces porciones seleccionadas de callo a porciones de 50 ml de un medio de leche de coco MMS líquido en 250 ml de frascos de
25. Erlenmeyer. En varios de estos frascos aparece un crecimiento de células no diferenciadas dispersas y se mantiene entonces este material mediante transferencia bisemanal a un medio G.

EJEMPLO 15

30. Crecimiento de Rauwolfia Serpentina como material rediferenciado

402916



Se combina dos frascos del crecimiento dispersado de Rauwolfia serpentina, del ejemplo precedente, y se lava la masa de células por decantación con tres cambios de medio G que carece de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se utiliza la masa de células, lavada de modo de librarla de auxina, como inoculum para frascos de un medio G libre de auxina al cual se han realizado las siguientes adiciones:

	<u>Frasco</u>	<u>Actividad de auxina agregada</u>
	1	sin adición
10.	2	0,1 mg/lt de ácido 1-naftalenacético
	3	1,0 mg/lt de ácido 1-naftalenacético
	4	5,0 mg/lt de ácido 1-naftalenacético
	5	1,0 mg/lt de ácido 3-indolacético
	6	5,0 mg/lt de ácido 3-indolacético
15.	7	10,0 mg/lt de ácido 3-indolacético
	8	20,0 mg/lt de ácido 3-indolacético
	9	0,5 mg/lt de ácido 2,4-diclorofenoxiacético
	10	1,0 mg/lt de ácido 2,4-diclorofenoxiacético
20.	11	5,0 mg/lt de ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

Por incubación sobre el sacudidor rotativo durante 8 días, los nueve primeros frascos (Nº 1 a 9) muestran diversos grados de rediferenciación (según queda en evidencia por el aspecto de los primordiales de raíces), desde leve en los frascos Nº 5 y 9 hasta intenso en los frascos - Nº 1 y 8. Estos resultados están de acuerdo con las intensidades relativas en general reconocidas de la actividad de auxina de las tres sustancias utilizadas, o sea que el ácido 2,4-diclorofenoxiacético es considerablemente más activo que el ácido 1-naftalenacético y que este es a su vez consi-



- derablemente más activo que el ácido 3-indolacético. Por consiguiente, transfiriendo células de Rauwolfia serpentina desde un medio G que contiene 1 mg/lt de ácido 2,4-diclorofenoxiacético a un medio del tipo G que no contiene actividad de auxina o a un medio del tipo G que contiene 20 mg/lt de ácido 3-indolacético, se produce una neta disminución de la actividad de auxina y tiene lugar la rediferenciación deseada.
- 5.

EJEMPLO 16

10. Demostración de la presencia de reserpina en material de Rauwolfia serpentina rediferenciado

- Se decanta el líquido del frasco n° 8 del ejemplo precedente y durante 6 hr se seca a 40°C y bajo presión reducida el material sólido que lleva los primordiales de raíz. Se muele la masa secada hasta un polvo en un mortero, se le humedece con 5 ml de hidróxido de amonio concentrado y se le tritura con 30 ml de benceno. Se separa la fase benéfica por centrifugación y se la evapora hasta sequedad a 40°C en una corriente de nitrógeno. Con el residuo se forma una lechada en 2 ml de ácido clorhídrico puro normal y se extrae el ácido acuoso en 2 ml de cloroformo (la sal de clorhidrato de la reserpina es soluble en cloroformo). Se evapora el extracto cloroformico hasta sequedad, se retoma el residuo en 0,1 ml de cloroformo, y se aplica bandas de esta solución a través de la línea original de una placa cromatográfica de capa delgada de ácido cilícico de 5,08 x 20,3 cm. Por revelación en una mezcla solvente que consiste en butanol normal (16 partes), ácido acético (1 parte) y agua (4 partes), se obtiene un cromatograma que, bajo una lámpara de U.V. de 365 nm., muestra siete bandas fluorescentes incluyendo una que tiene el mismo RF (0,61) que un espé
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- cimen auténtico de reserpina cromatografiado en la misma manera sobre otra placa. La banda fluorescente a Rf 0,61 evidentemente no es reserpina pura, siendo el color de la fluorescencia considerablemente más azul que el de la reserpina pura. Por consiguiente, se elimina esta banda de la placa por raspado, se lixivia el adsorbente con 2 ml de metanol, y se examina el eluato metanólico mediante espectrometría de masa de alta resolución. El espectro de masa muestra una sola familia de crestas en la región 600 a 650 de la masa, estando esta familia en excelente acuerdo con las que se observan para la reserpina pura. Se adapta la cresta de masa principal de la familia de modo de encontrar una masa exacta de 608,2724 de unidades de masa en excelente acuerdo con lo esperado para la reserpina, para la cual la masa exacta calculada para el ión molecular es 608,2733 unidades de masa. Por consiguiente, se ha demostrado que la Rauwolfia serpentina cultivada en suspensión y rediferenciada, elabora reserpina.
- 5.
- 10.
- 15.

EJEMPLO 17

20. Derivación de cultivos de células no diferenciadas de Catharanthus roseus
-

- En la siguiente manera se utiliza, como fuente de tejido vegetativo, plantas comerciales de Catharanthus roseus (que se conoce también como Vinca rosea). A una planta joven comercial de Catharanthus roseus de una altura de aproximadamente 100 mm se la decapita 10 mm por encima de la línea del suelo y se esteriliza superficialmente la parte superior completa de la planta mediante inmersión durante 2 min a una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Se lava la parte superior de la planta con agua estéril, se corta asépti-
- 25.
- 30.

40-2916



- camente porciones y se las transfiere a la superficie del medio G de agar contenido en platillos de petri. Después de 18 días de incubación a 25°C, los crecimientos callosos, que han aparecido, son transferidos directamente a porciones de 50 ml de un medio G en frascos de Erlenmeyer de 250 ml y se incuba a 25°C sobre el sacudidor rotativo. Se observa rápidamente crecimiento no diferenciado vigoroso muy disperso, independientemente de que la pieza de planta original fuera derivada del callo, pecíolo u hoja. Se mantiene la suspensión de células no diferenciadas, mediante transferencia a un nuevo medio G líquido cada 7 días.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 18

Crecimiento de *Catharanthus roseus* como material rediferenciado

15. A un frasco de 7 días de edad de un cultivo en suspensión de *Catharanthus roseus* no diferenciado, se agrega 50 ml de nuevo medio G que carece de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Mediante esta medida, se diluye la actividad de auxina, que está presente en el frasco original, hasta la mitad de su valor original. Se descarta la mitad de la suspensión de células así aumentada, y se vuelve a disponer la otra mitad sobre el sacudidor rotativo durante un periodo adicional de 7 días. Habiendo tenido lugar este tiempo un vigoroso recrecimiento, se agrega nuevamente 50 ml de medio del tipo G libre de auxina, se mezcla, y se descarta la mitad de la suspensión resultante. Se vuelve a disponer sobre el sacudidor rotativo, durante otro periodo de 7 días, la otra mitad que contiene ahora a lo sumo 1/4 de la cantidad inicial de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se repite 3 veces más este ciclo de dilución con el medio libre de auxi
- 20.
- 25.
- 30.

402916



na e incubación dando por resultado un frasco que contiene solamente 1/32 del ácido 2,4-diclorofenoxiacético original, o en otras palabras aproximadamente 0,31 mg/lit de esa actividad de auxina. A este nivel de actividad de auxina, y por incubación adicional durante 4 días, se produce una evidente rediferenciación del material *Catharanthus roseus* con el aspecto de primordiales de raíz. La *Catharanthus roseus* es la fuente de los importantes agentes contra tumores, es decir vinblastina y vincristina.

10. EJEMPLO 19

Crecimiento de *Phytolacca americana* como células no diferenciadas en un cultivo en suspensión

Se obtiene semillas de *Phytolacca americana* de una fuente comercial y se las estratifica en musgo de turba húmedo a 5°C durante 3 meses. Se esteriliza entonces la superficie de la semilla por inmersión en agua bromada durante 1 min, se lava con agua estéril y se dispone sobre papel de filtro estéril en platillos de petri para su germinación. La germinación se produce prontamente y se corta las plantas jóvenes emergidas en sus partes componentes de radícula, hipocotilo, y cotiledones, y se dispone directamente estas partes en porciones de 5 ml de un medio del tipo G líquido con 6 mg/lit de ácido 2,4-diclorofenoxiacético contenido en tubos de ensayo de 2,54 x 20,3 cm sobre un sacudidor de movimiento alternativo (carrera de 2,54 cm, 100 carreras/min) a 28°C. Después de 14 días se han formado masas callosas y se han desprendido piezas originales, estando en progreso un vigoroso crecimiento no diferenciado.

20. EJEMPLO 20

30. Rediferenciación de *Phytolacca americana*



La transferencia del callo no diferenciado, del precedente ejemplo al medio del tipo G que contiene solamente 0,5 mg/lt de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, da por resultado la rediferenciación con el aspecto de primordiales similares a cotiledones.

5.

La transferencia del tallo no diferenciado del precedente ejemplo a un medio del tipo G que contiene 1 mg/lt de ácido 1-naftalenacético da por resultado una pronta rediferenciación, según queda en evidencia por la copiosa formación de primordiales de raíces. La Phytolacca americana es la fuente del alcaloide fitolaccina y del reactivo de investigación mitógeno de fitolaca.

10.

EJEMPLO 21

Crecimiento de Ficus elástica como material no diferenciado en un cultivo en suspensión

15.

Se corta una hoja del tercer internodo de una planta Ficus elástica crecida en tiesto, se esteriliza superficialmente por inmersión en hipoclorito de sodio al 1%, y se suprime asépticamente una porción de 5 x 5 cm. Se corta esta porción en piezas cuadradas de 1 cm de lado y se las usa para inocular frascos de sacudidor con medio G. Después de 21 días de incubación sobre el sacudidor de movimiento alternativo, se observa un vigoroso crecimiento alternativo, se observa un vigoroso crecimiento del material calloso no diferenciado. La Ficus elástica es la fuente comercial de goma elástica.

20.

25.

EJEMPLO 22

Crecimiento de Ficus carica como material no diferenciado en un cultivo en suspensión

30.

Se corta una hoja joven de un árbol de Ficus



- carica se esteriliza superficialmente y no utiliza papelón para inocular plantas de medio G de agar. En 15 días aparecen terrones callosos en vigoroso crecimiento. Se los transfiere a un medio G líquido en frascos de sacudidor, con lo cual se produce un crecimiento adicional en un modo bien dispersado. Por transferencia al tipo G que contiene 0,5 mg/lit de ácido 1-naftalenacético, se produce rediferenciación con el aspecto de primordiales de raíz. La Ficus carica, el higo común, es la fuente comercial de la enzima coagulante de la leche, la ficina.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 23

Crecimiento de *Camptotheca acuminata* en un cultivo en suspensión

- Se esteriliza superficialmente semillas de *Camptotheca acuminata* por inmersión durante 10 min, en hipoclorito de sodio al 1%, se lava con agua estéril, y se hace germinar sobre papel de filtro húmedo en platillos de petri. Se transfiere intactas las plantas jóvenes emergidas, a frascos de sacudidor que contienen el medio G y se las incuba a 28°C sobre el sacudidor rotativo. Se produce el crecimiento vigoroso de callos, y después de transferencia, se obtiene una línea de células que muestra la forma deseada de crecimiento disperso. *Camptotheca acuminata* es la fuente de una importante droga anticáncer, la camptotecina.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 24

Crecimiento de *Sassafras albidum* en un cultivo en suspensión disperso

- De un árbol de *Sassafras albidum* crecido en la foresta, se obtiene retoños aletargados verdes recién crecidos, por inmersión en etanol al 70%, y luego en hipoclorito
- 25.
- 30.



de medio al 1%. Se corta los retoños en secciones transversales de un espesor de 2 a 5 mm y a estas secciones estériles se las dispone sobre un medio G de agar para que formen callos. Se transfiere los terrones de callos, cuando se han formado, a un medio G líquido en frascos de sacudidor sobre el sacudidor rotativo. La incubación adicional da por resultado cultivos dispersos de células no diferenciadas y racimos de células. El *Sassafras albidum* es una fuente del agente aromatizante aceite de sasafrás y de safrol.

5.

10.

EJEMPLO 25

Crecimiento de *Artemesia absinthium* en un cultivo de células
no diferenciadas

Se hace germinar semillas estériles de *Artemesia absinthium* y se transfiere las plantas jóvenes al medio G líquido, incubando de acuerdo con lo descrito más arriba, se forma tejido caloso, y al transferirlo al medio G crece vigorosamente como células dispersadas y racimos de células.

15.

EJEMPLO 26

Rediferenciación de *Artemesia absinthium*

Se emplea células no diferenciadas y lavadas, del ejemplo precedente, para inocular frascos de un medio del tipo G que contiene solamente 0,5 mg/lit de ácido 1-naf-talenacético como actividad de auxina. Se produce prontamente la rediferenciación, según queda en evidencia por el aspecto de los primordiales de raíces. Se utiliza *Artemesia absinthium* como aroma en vermouth.

20.

25.

EJEMPLO 27

Crecimiento de *Nicotiana tabacum* en un cultivo de células
no diferenciadas

30.

Se esteriliza superficialmente semillas de Nico



5. tiana tabacum y se las hace germinar sobre papel de filtro húmedo. Se transfieren porciones de tallo de las plantas jóvenes a un medio MS de agar de modo que se forman masas callosas. Se las transfieren al medio MS líquido en frascos de sacudidor y se las somete a selección de modo de obtener una línea de células de crecimiento disperso que material no diferenciado.

EJEMPLO 28

10. Rediferenciación de *Nicotiana tabacum* para formar primordiales de retoño

15. Se utiliza células lavadas, del ejemplo precedente, para inocular frascos de un medio MS libre de auxina y, después de incubación en luz amortiguada sobre un sacudidor de rotación lenta (60 r.p.m.) durante 5 semanas, se observa una vigorosa formación de primordiales de retoños verdes. *Nicotiana tabacum* es una fuente comercial del alcaloide nicotina.

EJEMPLO 29

20. Derivación y crecimiento en un cultivo suspendido de células no diferenciadas, de *Lavandula officinalis*

25. Se esteriliza superficialmente semillas comerciales de *Lavandula officinalis* mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 1% y se las hace germinar sobre un papel de filtro húmedo. Se corta las plantas jóvenes emergidas en segmentos de 1 cm y se dispone estos segmentos sobre la superficie del medio MS de agar que contiene 6 mg/lit de ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Después de 6 semanas se transfieren los racimos callosos, que se han formado, a frascos de sacudidor individuales con medio MS líquido y se elige para su transferencia posterior los frascos que muestran un modo -

30.



5. más disperso de crecimiento. Se realiza 10 de estas selecciones y transferencias consecutivas con intervalos de aproximadamente 1 semana, y se transfiere la línea de células más vigorosas a medio LS que contiene 6 mg/lt de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, en que se produce el crecimiento todavía más rápido y vigoroso.

MEDIO LS

	<u>Componente</u>	<u>Concentración mg/lt.</u>
10.	Nitrato de amonio	1650
	Nitrato de potasio	1900
	Dihidrato de cloruro de calcio	440
	Heptahidrato de sulfato de magnesio	370
	Fosfato monopotásico	170
15.	Etilendiaminatetraacetato ferroso	65
	Acido bórico	6,2
	Tetrahidrato de sulfato manganeso	22,3
	Tetrahidrato de sulfato de cinc	8,6
	Ioduro de potasio	0,83
20.	Dihidrato de molibdato de sodio	0,25
	Pentahidrato de sulfato cúprico	0,025
	Hexahidrato de cloruro cobaltoso	0,025
	Sacarosa	30.000,0
	Quinetina	0,030

25.

NOTA

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace
- 30.



- constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Inglaterra, con fecha 18 de Mayo de 1.971 bajo el nº 15.626/71, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN METABOLITO VEGETAL QUIMICO MEDIANTE CULTIVO EN SUSPENSION; caracterizándose por lo siguiente:
- 5.
10. 1.- Procedimiento para producir un metabolito vegetal químico mediante cultivo en suspensión, caracterizado porque comprende las etapas de: (a) generar primordiales de órganos de una planta que se sabe que elabora el metabolito, mediante la reducción del nivel de actividad de auxina en un medio nutritivo aerobio acuoso que tiene células no diferenciadas en crecimiento o racimos de células, de dicha planta, sumergidos en el mismo; y (b) cultivar los primordiales de órganos resultantes hasta que se producen cantidades substanciales del metabolito.
- 15.
20. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además las etapas de: (a) inocular un medio nutritivo acuoso con células no diferenciadas, en crecimiento vigoroso, de una planta que se sabe que elabora el metabolito; (b) mantener el crecimiento de dichas células de planta no diferenciadas, en el medio, durante un periodo de tiempo bajo condiciones aerobias sumergidas en presencia de una sustancia que provee actividad de auxina al medio; (c) reducir el nivel de actividad de auxina en el medio de modo que se produce rediferenciación de las células de la planta con el aspecto de primordiales de órganos de -
- 25.
- 30.

MM



planta y con concomitante elaboración del metabolito; (d) producir una masa de cosecha entera, manteniendo el crecimiento de dichas células de planta rediferenciadas en el medio durante un período de tiempo bajo condiciones aerobias sumergidas, con la resultante acumulación del metabolito; y (e) recuperar el metabolito con respecto a la masa de cosecha entera resultante.

5. 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la sustancia que provee actividad de auxina, se elige del grupo consistente en ácido 3-indolacético, ácido 3-indolbutírico, ácido 1-naftalenacético, ácido p-clorofenoxiacético, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético.

10. 4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la reducción del nivel de actividad de auxina, en el medio, se logra diluyendo cada parte del medio con por lo menos una parte igual de nuevo medio que no tiene actividad de auxina.

15. 5.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque se reduce el nivel de actividad de auxina en el medio mediante el agregado de un compuesto antiauxina a dicho medio.

20. 6.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque la reducción del nivel de actividad de auxina en el medio, se logra separando las células de planta no diferenciadas con respecto al medio y resuspendiendo dichas células de planta no diferenciadas en un nuevo medio que tiene reducida actividad de auxina.

25. 7.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque se mantiene el medio nutritivo acuoso a



12 SET. 1974

una temperatura de 15 a 15°C.

8.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el medio nutritivo acuoso contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio y vitaminas.

9.- Procedimiento para producir un metabolito vegetal químico mediante cultivo en suspensión, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria

Esta Memoria consta de 43 hojas escritas a máquina por una sola cara.

12 SET. 1974

Madrid

AMERICAN CYANAMID COMPANY

J. GOMEZ ACEBO Y MUDET
p. p. Firmado: L. Gaeta Fernández