

Crecimiento, actividad oxidasa y peroxidasa en callos de *Galipea longiflora* K. cultivadas en medio MS, con variación en la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato

Growth, oxidase and peroxidase activity in *Galipea longiflora* K. callus cultured in MS medium, varying concentrations of sucrose, nitrogen and phosphate

Marina Guarachi Condori ¹, Magali Paz Garcia ¹, Enrique Terrazas Siles ¹, Alberto Giménez Turba ¹

¹ Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Alberto Giménez Turba Ph.D. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Andrés Av. Saavedra # 2224, Miraflores. La Paz, Bolivia.

E-mail: agimenez@megalink.com

RESUMEN

Dentro de la amplia biodiversidad de la amazonía boliviana, se encuentra la especie vegetal *Galipea longiflora* Krause la cual presenta propiedades medicinales contra la leishmaniasis. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el efecto de la concentración de sacarosa, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 del medio MS, sobre el crecimiento, la actividad oxidasa y peroxidasa de callos de *G. longiflora*.

Con el incremento conjunto de los tres componentes se logró obtener el mayor coeficiente de crecimiento (6.57) comparado con el medio testigo (3.96), que resulta ser altamente significativo, el crecimiento fue evaluado por la variación en el peso húmedo.

La actividad oxidasa y peroxidasa fue determinada con el cromógeno ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). La oxidasa presenta mayor actividad en la tercera semana de cultivo; mientras que la actividad peroxidasa es mayor a la primera semana de cultivo, con la tendencia posterior a la disminución, repuntando cuando la fase estacionaria es alcanzada, el comportamiento enzimático es independiente de la variación de nutrientes ensayada. Sin embargo, la actividad oxidasa y peroxidasa es dependiente de la etapa de crecimiento en la que se encuentra la célula.

Palabras Clave: *Galipea longiflora* K., peroxidasa, oxidasa, ABTS

ABSTRACT

Inside the wide biodiversity of the Bolivian Amazon, the *Galipea longiflora* Krause plant presents medical

properties against the leishmaniasis. The aim of this work was to characterize the effect of sucrose, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 concentrations from MS medium on growth, oxidase and peroxidase activity of *G. longiflora* callus.

With the increase of all three components the major growth ratio (6.57) was obtained, compared to the control (3.96), result that turns out to be highly significant, and its growth was determined by variation in fresh weight.

Oxidase and peroxidase activity were determined with the chromogen ABTS (2,2'-bis azino (3-ethylbenzotiazolina-6-sulphonate)). The oxidase presents a major activity in the third week of cultivation, whereas the peroxidase activity is higher in the first week of cultivation, and a trend to a later decrease, rebounding when the stationary phase is reached. The enzymatic behavior is independent from the tested variation of nutrients. However, oxidase and peroxidase activity is dependent from the growth phase currently developed by the cell.

Key Words: *Galipea longiflora* K., peroxidase, oxidase, ABTS.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la amplia biodiversidad de la amazonía boliviana, se encuentra la especie vegetal *Galipea longiflora* Krause, que es utilizada tradicionalmente por los pobladores Chimanes y Tacanas debido a sus propiedades contra las diarreas parasitarias y como fortificante para adultos y niños; en esta especie se ha reportado la presencia de alcaloides quinolínicos que han sido aislados y caracterizados, los cuales

presentan una actividad biológica importante contra la leishmaniasis cutánea, además se reporta su actividad antifúngica y antibacteriana^{1,2,3}. La distribución de *G. longiflora* es muy limitada y parece ser exigente en cuanto a condiciones nutricionales y ambientales para su propagación en la naturaleza, adicionando que el tiempo de crecimiento requerido es muy prolongado. La consideración de estos factores hizo enfocar la búsqueda del cultivo de esta especie en condiciones de laboratorio y conocer las características metabólicas, con el fin de contar con una fuente alternativa continua de compuestos activos.

Se conoce que el curso de las reacciones metabólicas en la célula está definida por patrones que marcan la economía enzimática necesaria para la optimización de los procesos. Las células utilizan el principio de la catálisis para lo cual sus biocatalizadores son las enzimas.

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) constituyen un grupo de glicoproteínas muy extendido en la escala filogenética, cataliza reacciones bisustrato de carácter redox de diferentes sustratos fenólicos y sustancias relacionadas orgánicas e inorgánicas. En vegetales es destacada la peroxidasa del rábano (*Armoracia rusticana*) por su importante aplicación en el análisis colorimétrico de material biológico^{4,5,6}.

La primera actividad oxidasa (lacasa) (EC 1.10.3.2) fue reportada en 1883 en el látex de la planta *Rhus vernicifera*, son un grupo de glicoproteínas que catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos, se le atribuye un rol importante en la cicatrización frente al ataque de agentes patógenos o ruptura de la estructura vegetal^{7,8,9}.

En el presente estudio, reportamos el efecto de la variación de nutrientes en condiciones de cultivo *in vitro* en la formación de biomasa y en la producción de enzimas oxidativas de callos de *G. longiflora*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal. Fue empleado callos de *Galipea longiflora* K. previamente establecidos en el laboratorio a partir de explantes de hojas de plantines provenientes de la comunidad Santa Rosa de Maravilla del departamento de La Paz, Bolivia¹⁰.

Medio de cultivo. Los callos fueron mantenidos en el formulado de Murashige y Skoog (MS), suplementado con kinetina (0.1 mg/L) y 2,4 diclorofenoxiacético (5 mg/L), el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.1 , para luego adicionar agar (8 g/L), sacarosa (30 g/L) y esterilizar en autoclave (ALL AMERICAN).

Variación en la fuente de carbono, nitrógeno y fosfato. Se planteó un diseño experimental

completamente al azar con un arreglo trifactorial, con variación en la concentración de los nutrientes mayoritarios del medio de cultivo MS, (ver detalles de la variación de concentraciones en la Tabla 1).

Tabla 1. Arreglo trifactorial de las variaciones en la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato en el medio de Murashige Skoog.

Exp.	Sacarosa g/L	NH ₄ NO ₃ mg/L	KH ₂ PO ₄ mg/L
1	30	1650	170
2	30	1655.55	170
3	30	1650	226.6
4	30	1655.55	226.6
5	40	1650	170
6	40	1655.55	170
7	40	1650	226.6
8	40	1655.55	226.6

Como medio basal o testigo fue utilizado el formulado MS sin variación. Cada ensayo fue realizado en tres ensayos independientes, cada uno realizado por triplicado; a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, en oscuridad completa.

Determinación del peso húmedo. Aproximadamente 0.4 g de peso húmedo de callos fue sembrado en 10 mL de medio MS en cajas de Petri de 5 mm de diámetro. Cada 7 días fue determinado el incremento de masa celular (balanza analítica AND, Japan), para luego calcular el coeficiente de crecimiento (según peso húmedo) que es definido como:

$$\text{Coeficiente de crecimiento} = \frac{\text{Peso húmedo final (mg)}}{\text{Peso húmedo inicial (mg)}}$$

Cuantificación de la actividad oxidasa. Una vez determinado el peso de los callos, cada cúmulo celular fue colocado en 2 mL de solución fosfato de sodio pH 7 (19.06 mM/30,94 mM), homogeneizada en vortex (Genie 2, USA), sometida a ultrasonido (Branson 3200) por 30 minutos y posteriormente centrifugada (Jouan CR3) a 3000 rpm por 25 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante luego de la centrifugación fue usada para la cuantificar la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), con los siguientes volúmenes: 100 uL de ABTS (10 mM), 400 uL de tampón acetato de sodio pH 3,5 (0,84 mM/49.14 mM), 400 uL de agua destilada y deionizada; la reacción fue iniciada adicionando 100 uL de sobrenadante de callos, colocada en cubeta para la lectura en espectrofotómetro UV-VIS (Cintra 5, GBC Scientific Equipment) a 420 nm^{11,12}.

La actividad enzimática fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta \text{ abs}/t \times V_t \times 1 \text{ cm}}{\epsilon \times V_m}$$

Donde: $\Delta \text{ abs}$ = absorbancia de la muestra; $t = 1 \text{ min}$;
 $V_t = 1000 \text{ uL}$; $\epsilon = 3 \text{ 600/uL/cm}$; $V_m = 100 \text{ uL}$.

Cuantificación de la actividad peroxidasa. El procedimiento como el cálculo para determinar la actividad peroxidasa, es el mismo al anterior acápite, con la variante que fue reemplazado 100 uL de agua destilada por 100 uL de peróxido de hidrógeno (0,5 mM).

RESULTADOS

El efecto de la variación de las concentraciones de sacarosa, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 en el medio MS sobre la producción de biomasa es presentada en la figura 1. Con los coeficientes de crecimiento fue calculada la velocidad de crecimiento para realizar el análisis por regresión; basados en el análisis estadístico STATISTICA v.6 (StaSoft Inc., USA), de las variaciones ensayadas el intercepto del incremento de los tres nutrientes es altamente significativo con un valor de $P = 0.04354$ muy por debajo de 0,42977 de la P aceptada; de los tres componente evaluados, el que tiene mayor influencia sobre el aumento de la formación de masa celular es el KH_2PO_4 con el valor de $P = 0.262104$.

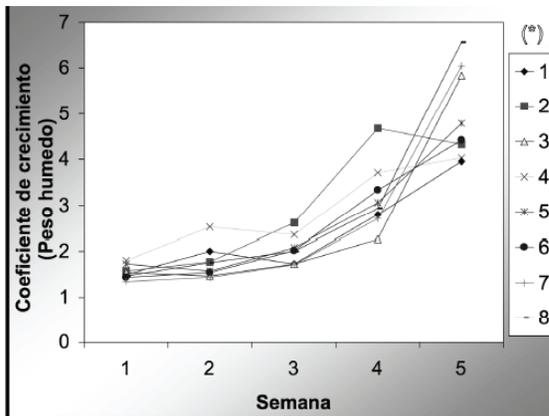


Figura 1. Efecto de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fósforo mediante un arreglo trifactorial en el medio MS (**ver Tabla 1), en el aumento de peso húmedo de callos de *G. longiflora* durante cinco semanas de cultivo.

Otra observación en la cinética de crecimiento de callos de *G. longiflora* es que solamente en las variantes 2 y 6 se alcanza la fase estacionaria a la cuarta semana de cultivo.

Por otro lado, la cuantificación de la actividad oxidasa, de manera general, presenta incremento

hasta la tercera semana para luego disminuir progresivamente (Figura 2); el punto de mayor actividad coincide con la etapa de cambio entre la fase de acondicionamiento y la fase de crecimiento activo, en este punto de inflexión el cambio de las características de la etapa de crecimiento podrían definir el cambio de perfil de actividad oxidasa a este tiempo de cultivo.

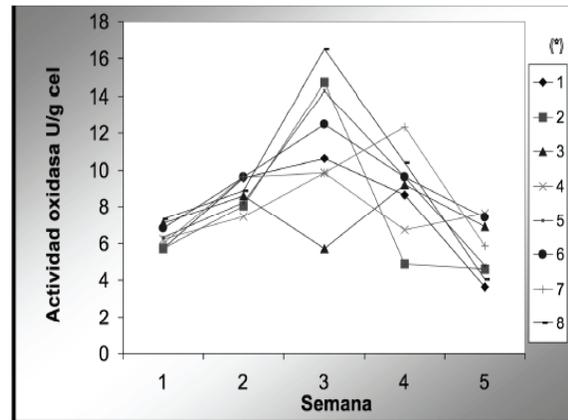


Figura 2. Efecto de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fósforo mediante un arreglo trifactorial en el medio MS (**ver tabla 1), en la actividad oxidasa de callos de *G. longiflora* durante cinco semanas de cultivo.

En la Figura 3 se aprecia el efecto de la variación de las concentraciones de nutrientes en la actividad peroxidasa en 5 semanas de cultivo, la mayor actividad se presenta a la primera semana de cultivo, conforme el tiempo de cultivo aumenta la tendencia general de la actividad peroxidasa es a la disminución.

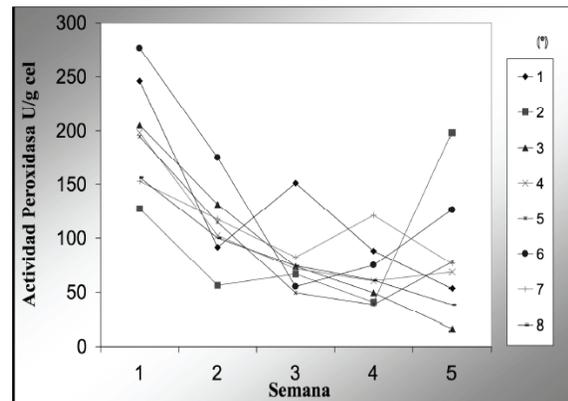


Figura 3. Efecto de la variación de la concentración de sacarosa, nitrógeno y fósforo mediante un arreglo trifactorial en el medio MS (**ver tabla 1), en la actividad peroxidasa de callos de *G. longiflora* durante cinco semanas de cultivo.

El análisis de ANOVA de 2 factores ($p < 0.05$) para la actividad enzimática indica que las diferencias no son significativas para las variación de las concentraciones de nutrientes ensayados, sin embargo, la diferencia es significativa con el tiempo de cultivo tanto para la oxidasa como para la peroxidasa.

DISCUSIÓN

Es esencial estudiar el efecto de los diferentes componentes de los medios de cultivo para seleccionar el más apropiado ya sea para el crecimiento celular o con el fin de obtener algún producto en particular. En los ensayos fue incrementado la sacarosa, que es el carbohidrato comúnmente empleado, tiene un rol significativo en el control del metabolismo secundario; el nitrógeno, uno de los más importantes elementos para el desarrollo de una planta, ambas formas (NH_4^+ o NO_3^-) a diferentes concentraciones tienen efectos relevantes sobre el crecimiento y metabolismo celular. A decir del fósforo, se añadió como fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4), es conocido el valor energético del fosfato en el curso de las reacciones metabólicas y el papel principal del potasio como activador de numerosas enzimas^{13,14,15}. De acuerdo a los resultados de crecimiento obtenidos en *G. longiflora* la sacarosa, NH_4NO_3 y KH_2PO_4 están implicados en diferente proporción en el aumento de formación de masa celular en el medio MS.

La variación en la actividad oxidasa y peroxidasa en cultivo de callos de *G. longiflora* es atribuida a la etapa de crecimiento en la que se encuentra la célula. De acuerdo a reportes en otras especies vegetales la relación peroxidasa y el crecimiento celular es inversa^{16,17,18}; ésto se verifica en *G. longiflora* al comparar el crecimiento en las variantes 2 y 6, que son las únicas que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento y es justamente cuando la actividad peroxidasa repunta a la quinta semana.

La marcada actividad de las peroxidases cuando la célula cesa su crecimiento, orienta a otorgarles un rol crucial en el metabolismo secundario, como fue demostrado en *Catharantus roseus*, en la cual se evidenció la participación de oxidasas y peroxidases en la síntesis de alcaloides¹⁹; también fue demostrada su participación en la reacción defensiva en *Capsicum annuum* L.²⁰. Todo ello proporciona pautas para la optimización de la obtención de un determinado producto, empleando procesos como el biodireccinamiento, la biotransformación entre otras herramientas de la biotecnología vegetal.

En conclusión en este estudio se determinó que al incrementar la concentración de sacarosa, nitrógeno y

fosfato existe interacción entre ellos en el medio de cultivo que hace que la formación de callos de *G. longiflora* sea mayor. La actividad enzimática no es influenciada significativamente al variar la concentración de sacarosa, nitrógeno y fosfato ensayadas en el medio de cultivo MS, las diferencias pudieran ser ampliadas si la variación en la concentración fuese mayor. La variación en el perfil de la actividad enzimática oxidativa está relacionada fundamentalmente con la etapa de crecimiento en la que se encuentra la célula.

AGRADECIMIENTOS

Al CIPTA por la colecta de material vegetal, al programa ASDI-SAREC proyecto “Biodiversidad Microbiana”; al IRD proyecto “Biolesh” por la beca de estudio concedida a GM.

REFERENCIAS

1. Fournet A, Barrios A, Muñoz V, Hocquemiller R, Roblot F, Cave A, Richomme P, Bruneton J. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytother Res.* 1994; 8(3): 174-178.
2. UMSA-CIPTA-IRD-FONAMA-EIA. Tacana, conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas. La Paz: Centro de Información para el Desarrollo; 1999.
3. Giménez A, Avila A, Ruiz G, Paz M, Udaeta E, Ticona J, Salamanca E, Paredes C, Rodríguez N, Quints K, Feraudy C, Gutiérrez I, Chuqui R, Quenevo C, Dalence M, Bascope M. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora* Krause. *Rev Bol Quim.* 2005; 22(1): 94-107.
4. Bennett R, Wallsgrove R. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol.* 1994; 127: 617-633.
5. Chabanet A, Catesson A, Goldberg R. Peroxidase and phenoloxidase activities in mung bean hypocotyl cell walls. *Phytochemistry.* 1993; 33(4): 759-763.
6. Chibbar R, Van Huystee R. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.* 1984; 75: 956-958.
7. Mayer A, Staples R. Laccase: new functions for and old enzyme. *Phytochemistry.* 2002; 60: 551-565.
8. Bligny R, Jacques G, Douce R. Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells, effects of a copper deficiency. *Biochem J.* 1986; 237: 583-588.
9. Mayer A. Polyphenol oxidases in plants and fungus: Going places? A review. *Phytochemistry.* 2006; 67: 2318-2331.
10. Paz M, Vázquez F, Chuqui R, Paredes C, Sauvain M, Gimenez A. Establecimiento de cultivos in vitro de *Galipea longiflora*, una Rutaceae de la Amazonia Boliviana. *Acta Farm Bonaerense.* 2007; 26:15-19.

11. Childs R, Bardsley W. The Steady-State kinetics of peroxidase with 2,2'-Azino-di- (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem J.* 1975; 145: 93-103.
12. Dogan S, Turan P, Dogan M, Asrtan O, Alkan M. Variations of peroxidase activity among Satura species. *J Food Eng.* 2007; 79:375-382.
13. Chen Y, Yi F, Cai M, Luo J. Effects of aminoacids, nitrate and ammonium on the growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis*. *J Plant Growth Regul.* 2003; 41:265-268.
14. Chattopadhyay S, Mehra R, Srivastava A, Bhojwani S, Bisaria V. Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 60:541-546.
15. Paul M, Stitt M. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plan Cell Environ.* 1993; 16: 1047-1057.
16. Andrews J, Malone M, Thompson D, Ho L, Burton K. Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing tomato fruit. *Plan Cell Environ.* 2000; 23(2): 415-422.
17. Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y, Kim S. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry.* 2006; 67: 219-224.
18. Van Huystee R. Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Annurev.* 1987; 38: 205-219.
19. Verpoorte R, Van der Heijden R, Memelink J. The plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic res.* 2000; 133(9): 323-343.
20. Ezziyyani M, Requena M, Candela M. Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Ann biol.* 2005; 27: 143-150.