

## Efecto de la Elicitación en la Síntesis de Solasodina en Cultivos de Raíces Transformadas de *Solanum eleagnifolium* Cav.

Juliana PARSONS, Ana M. GIULIETTI y Julián Rodríguez TALOU \*

Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,  
Universidad de Buenos Aires. Junín 956, Buenos Aires, Argentina, 1113.

**RESUMEN.** El objetivo de este trabajo fue estudiar de distintos elicitores sobre la producción de solasodina por cultivos de raíces transformadas de *Solanum eleagnifolium* Cav. Se ensayaron: quitosano 10 y 100 mg/l, hemicelulosa 0.1 y 0.2 mg/l, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17 y 170 mg/l, AgNO<sub>3</sub> 0,14 mg/l y homogenatos de los hongos *Hormonema sp.* y *Phytium sp.*, los cuales no produjeron diferencias significativas en la acumulación de solasodina respecto del control. Asimismo cuando se elicitó con un homogenato de *Sclerotinia sclerotiorum* se produjo una disminución de la concentración del alcaloide de 30% respecto al control, atribuible a la posibilidad de que la elicitación con este hongo haya inducido la producción de sesquiterpenos en vez de alcaloides como la solasodina.

**SUMMARY.** "Effects of Elicitation on Solasodine Production by *Solanum Eleagnifolium* Cav. Hairy Root Cultures". The effect of several elicitors on solasodine production by hairy root cultures of *Solanum eleagnifolium* Cav. was studied. When chitosan 10 and 100 mg/l, hemicellulase 0.10 and 0.20 mg/l, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17 and 170 mg/l, AgNO<sub>3</sub> 0,14 mg/l and *Hormonema sp.* and *Phytium sp.*'s homogenates were used as elicitors no effect on solasodine production was observed. When homogenates of *Sclerotinia sclerotiorum* were used the solasodine production decreased about 30% respect to the control. This behavior could be attributed to *Sclerotinia sclerotiorum* elicitation induced the sesquiterpenes biosynthesis instead of alkaloids production.

### INTRODUCCION

La solasodina es un alcaloide alternativo a diosgenina como materia prima para la síntesis de drogas esteroidales, ya que ambos son precursores de acetato de 16-dehidro-pregmolona, el primer precursor en la síntesis de esteroides como corticoesteroides, anticonceptivos, hormonas sexuales, espirololactona entre otros compuestos<sup>1-2</sup>.

Actualmente el principal precursor de la síntesis industrial de esteroides es la diosgenina, una saponina obtenida de la raíz de especies de *Dioscorea*. El consumo anual a nivel mundial de esteroides es de varios miles de toneladas calculado como diosgenina, demanda que se encuentra en continuo crecimiento, y que no logra ser satisfecha actualmente por la diosgenina producida. Este hecho, asociado al valor comercial de US\$ 1000/Kg de diosgenina<sup>3</sup>, promueven un

gran interés en el estudio de nuevas fuentes de precursores para la síntesis de esteroides.

La solasodina se encuentra naturalmente en sus formas glicosiladas, principalmente como solamargina y solasonina, en varias especies de Solanaceae<sup>4</sup>. En *Solanum eleagnifolium* Cav., una especie autóctona Argentina, se acumula como solamargina mayoritariamente en frutos inmaduros<sup>4</sup>. Además la solasodina ha sido obtenida en cultivos *in vitro* tanto en cultivos indiferenciados<sup>5</sup> como en raíces transformadas<sup>6</sup>, obteniéndose bajas concentraciones. A fin de incrementar su síntesis y acumulación en cultivos en suspensión, distintas estrategias han sido empleadas, tales como uso de distintos reguladores de crecimiento<sup>7-8</sup>, fuentes de carbono y otros nutrientes<sup>9</sup>, relación carbono:nitrógeno<sup>9</sup>, inmovilización<sup>10</sup> y elicitación<sup>11</sup>. Los aumentos más

**PALABRAS CLAVE:** Elicitación, Raíces transformadas, *Solanum eleagnifolium* Cav., Solasodina.  
**KEY WORDS:** Elicitation, Hairy roots, Solasodine, *Solanum eleagnifolium* Cav.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: jrtalou@ffyba.uba.ar

significativos han sido logrados a través de la elicitación <sup>11</sup>.

Sin embargo la biosíntesis de los metabolitos secundarios no siempre es inducida por la acción de elicitores <sup>12</sup>. Flores-Sánchez *et al.* <sup>13</sup> observaron que cultivos de *Uncaria tomentosa* sometidos a elicitación con pepsina incrementaban la producción de triterpenos como ácido ursólico y ácido oleanólico mientras que los esteroides se mantenían invariables, a pesar que todos derivan de un precursor común.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de quitosano, hemicelulosa y homogenatos fúngicos, como así también H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Ag NO<sub>3</sub> sobre la producción de solasodina en raíces transformadas de *S. eleagnifolium* Cav.

## MATERIALES Y METODOS

### **Material vegetal**

Semillas de *S. eleagnifolium* Cav. fueron recolectadas a partir de plantas silvestres crecidas en Potrero de los Funes Provincia de San Luis (Argentina). Las semillas se desinfectaron por inmersión en una solución 2%(v/v) NaClO con 0,05% Triton X-100 durante 20 min, y lavadas 3 veces con abundante agua destilada estéril. Por último las semillas se incubaron 12 h en una solución de ácido giberélico al 0.01% (GA<sub>3</sub>, Sigma) esterilizado por filtración.

Las semillas tratadas se sembraron en frascos de 350 ml conteniendo 50 ml de medio nutriente mineral MS <sup>14</sup>; suplementado con el complejo vitamínico descrito por Khanna & Staba <sup>15</sup>, desprovisto de reguladores de crecimiento, suplementado con 30 g/l de sacarosa (medio MSRT) y solidificado con 8 g/l de agar. Por cada frasco se sembraron 4 semillas en la superficie y se incubaron a 24 °C con 8 h de oscuridad y 6 h de luz con una intensidad de aproximadamente 150 μmol m<sup>-2</sup> seg<sup>-1</sup> provista por lámparas Phillips HPLN de 400 watts y lámparas incandescentes de 75 watts.

### **Obtención de cultivos axénicos de raíces transformadas**

La transformación se llevó a cabo usando *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 resistente a rifampicina de acuerdo a lo descrito por Hamill *et al.* <sup>16</sup>. Para ello la cepa mantenida a 4 °C fue repicada a medio LB líquido suplementado con 50 μg/ml de rifampicina (Sigma) e incubada a 37 °C durante 24 h. Esta suspensión fue utilizada para infectar hipocótilos de plántulas de 4 semanas de edad obtenidas según lo descrito en el punto anterior. A estos explantos se les prac-

ticaron heridas superficiales con un bisturí previamente sumergido en la suspensión de *A. rhizogenes* LBA 9402. El material vegetal así infectado se sembró en medio MSRT sólido sin reguladores del crecimiento y se incubó en las condiciones ya descritas. Al cabo de 3 semanas, se aislaron las raíces adventicias desarrolladas en los sitios de infección y se procedió a cultivarlas en medio MSRT sólido, sin reguladores del crecimiento, con el agregado de ampicilina 0,5% a fin de obtener cultivos axénicos. Las raíces fueron repicadas cada 2 semanas a medio MSRT sólido con concentraciones decrecientes de ampicilina (0,5, 0,1 y 0,05%). Luego de ello, segmentos de raíces (2-4 cm) conteniendo un ápice radical fueron transferidos a Erlenmeyers de 100 ml conteniendo 20 ml de medio MSRT líquido con 0,1% ampicilina, y luego de 2 semanas de incubación se repicaron a medio MSRT líquido con 0,05% ampicilina. Por último las raíces fueron transferidas a medio MSRT líquido sin el agregado de antibióticos. Los cultivos de raíces transformadas se repicaron cada 15 días a Erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio MSRT líquido suplementado con 30 g/l de sacarosa e incubados en las condiciones descritas previamente. Luego del establecimiento de los cultivos axénicos se obtuvieron clones, en los cuales se determinó la acumulación de solasodina en la biomasa y en el medio de cultivo. La selección de clones se efectuó en base al contenido en solasodina.

### **Cinética de crecimiento y producción de solasodina: clon A5**

Se inocularon aproximadamente 300 mg de peso fresco (PF) de ápices radicales de 15 días de edad en Erlenmeyers de 120 ml con 25 ml de medio MSRT libre de reguladores del crecimiento. La incubación se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se tomaron muestras por triplicado cada 4 días por espacio de 28 días. En todas las muestras se determinó la biomasa por Peso Seco (PS) y el contenido de solasodina en las raíces.

### **Elicitación**

Los ensayos de elicitación se llevaron a cabo con el clon A5 de raíces transformadas de *S. eleagnifolium* Cav. En todos los ensayos, se partió de cultivos de 14 días de edad, que corresponde a la fase exponencial media del crecimiento. Se inocularon aproximadamente 300 mg de PF de ápices radicales de estos cultivos en Erlenmeyers de 120 ml conteniendo 25 ml de medio

MSRT sin hormonas. A los 14 días de edad se agregó el elicitor correspondiente, y las muestras se cosecharon a distintos tiempos según el elicitor ensayado. Cada ensayo se realizó por triplicado y para cada muestra se determinó biomasa como PS y el contenido de solasodina en las raíces.

#### **Elicitación con quitosano**

Se preparó una solución 10 g/l de quitosano (homopolímero lineal poli D-glucosamina, extraído del exoesqueleto de cangrejo, Sigma) en ácido acético (AcH) al 1%. La solución fue esterilizada en autoclave durante 20 min. Se ensayó la capacidad elicitora del quitosano en las concentraciones finales de 100 y 10 mg/l. Para ello alícuotas de 250 µl de la misma y de una dilución 1/10 en AcH 1% fueron agregadas a los cultivos para alcanzar dichas concentraciones en el medio de cultivo. Como controles se utilizaron cultivos a los que se agregó H<sub>2</sub>O destilada y cultivos a los que se agregó AcH 1% en lugar de la solución del elicitor. Los tiempos de exposición al elicitor ensayados fueron de 48 y 96 h.

#### **Elicitación con Hemicelulasa**

Se partió de una solución 100 mg/ml de Hemicelulasa de *Aspergillus niger* (0,01-0,1 U/mg, Sigma) en agua destilada, esterilizada por filtración. El elicitor se ensayó a concentraciones finales de 0,1 y 0,2 mg/l. Como controles se utilizaron cultivos a los que se agregó agua destilada en lugar de la solución del elicitor. El tiempo de exposición al elicitor ensayado fue de 48 h.

#### **Elicitación con AgNO<sub>3</sub>**

A fin de evitar la fotooxidación de la plata libre en solución, el AgNO<sub>3</sub> fue agregado a los cultivos en una solución junto con tiosulfato de sodio (STS). Para ello se preparó una mezcla 1:4 de las soluciones 0,1M AgNO<sub>3</sub>:0,1M STS y se esterilizó por filtración. Se realizó el ensayo agregando 1 ml de la mezcla a cada erlenmeyer. Se utilizaron tres controles diferentes, agregando a los cultivos 1 ml de agua destilada, 1 ml de la solución 0,1M AgNO<sub>3</sub> o 1 ml de la solución 0,1M STS en lugar de la solución de AgNO<sub>3</sub>:STS. Los tiempos de exposición al elicitor ensayados fueron de 48 y 96 h. La concentración final de AgNO<sub>3</sub> fue de 0,14 mg/l.

#### **Elicitación con peróxido de hidrógeno**

Se agregó a los cultivos 13 o 130 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck) para alcanzar las concentraciones finales de 17 y 170 mg/l. Como controles se uti-

lizaron cultivos a los que se agregó agua destilada en lugar del elicitor. El tiempo de exposición al elicitor ensayado fue de 48 h.

#### **Elicitación con homogenatos de hongos: *Hormonema sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Pythium sp.***

Se seleccionaron los siguientes hongos a fin de llevar a cabo la preparación de los homogenatos: *Hormonema sp.*, proveniente del cepario de la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica -UBA-, mantenido en Sabouraud papa; *S. sclerotiorum* y *Pythium sp.*, suministrados por la Ing. Beatriz Pérez del INTA -Castelar- Bs. As. Argentina, mantenidos en Sabouraud papa. Para la preparación de los homogenatos, los distintos hongos fueron cultivados en 100 ml de medio líquido de Sabouraud- dextrosa 4% contenidos en erlenmeyers de 250 ml., incubados bajo agitación a 250 rpm y 28°C. En estas condiciones *Hormonema sp.* fue cultivado por 72 h, *S. sclerotiorum* por 7 días y *Pythium sp.* por 5 días. Los cultivos fueron autoclavados por 20 min y luego filtrados por papel Whatman N° 1. El sobrenadante de cultivo filtrado fue esterilizado por autoclave y utilizado como elicitor. En cada caso se determinaron los equivalentes de glucosa por mililitro de elicitor empleando el kit comercial para glicemia enzimática Wiener. Se utilizaron 2 ml de estos homogenatos por cada erlenmeyer a ser elicitado y los tiempos de exposición fueron de 48 y 96 h.

#### **Determinación de biomasa**

La estimación de PF para la inoculación de los cultivos tanto como la de PS para la posterior determinación de solasodina, se efectuó de acuerdo a lo descrito por Nigra *et al.* <sup>5</sup>.

#### **Determinación de solasodina**

La solasodina en las muestras previamente hidrolizadas se determinó mediante una colorimetría tal como describen Nigra *et al.* <sup>5</sup>.

#### **Análisis estadístico**

Se usaron tres replicados en cada tratamiento y se realizaron análisis de varianza (ANOVA) en cada caso. Las variaciones entre los tratamientos fueron analizadas usando el Test de Tukey (p = 0,05).

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Selección de clones**

Se obtuvieron 11 clones de raíces transfor-

madras de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Se descartaron aquellos que se oscurecían rápidamente durante el cultivo. De los clones restantes, que presentaban las características típicas de las raíces transformadas (rápido crecimiento y alta densidad de pelos radicales), se eligieron 5 en base a su contenido en solasodina que varió entre 0,4 y 1,9 mg/g PS. El clon A5 fue el seleccionado y usado en los ensayos de elicitación debido a su mayor contenido en solasodina.

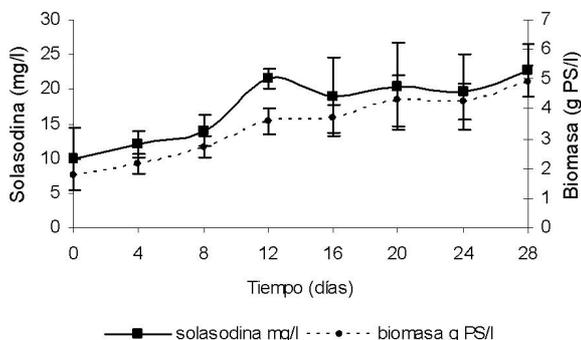
**Cinética de crecimiento y producción de solasodina: clon A5**

Para abordar el estudio de la producción de metabolitos secundarios por cultivos *in vitro* y su respuesta a distintos estímulos, es necesario conocer el perfil de producción a través del tiempo a fin de determinar en que fase del crecimiento del cultivo se produce el compuesto. Esta información es indispensable para el desarrollo de una estrategia de cultivo y producción efectiva y para el diseño de experimentos en los que se desea influir sobre la síntesis y acumulación del metabolito de interés.

En la Figura 1 se muestra el crecimiento del clon A5 de raíces transformadas de *S. eleagnifolium* y la producción de solasodina en función del tiempo. La solasodina en el medio de cultivo se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica analítica empleada.

Las raíces transformadas no poseen un crecimiento exponencial de su biomasa, típico de muchos sistemas de cultivo de raíces, sino que su biomasa aumenta en forma lineal en función del tiempo. La velocidad de crecimiento fue de 0,06 días<sup>-1</sup>, y el tiempo de duplicación de 11 días.

La producción de solasodina está asociada al crecimiento (Fig. 1), ya que la solasodina producida por unidad de biomasa se mantiene relativamente constante a lo largo de los 28 días de



**Figura 1.** Crecimiento y producción de solasodina del clon A5 de raíces transformadas de *S. eleagnifolium* Cav. (clon A5).

cultivo, entre 4,5 y 6,0 mg/g PS. A partir del día 12 de cultivo, esta tendencia disminuye, debido a una sostenida caída de la concentración de solasodina producida por unidad de biomasa. La productividad calculada hasta el día 12 fue de 1,8 mg/l/día.

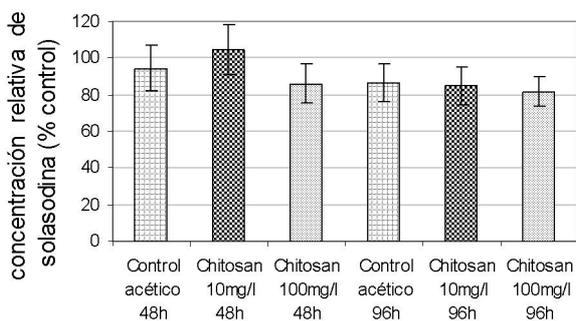
La concentración de solasodina observada en las raíces transformadas fue tres veces mayor que la reportada por Nigra *et al.*<sup>5</sup> para células indiferenciadas, similares a los hallados previamente por Alvarez *et al.*<sup>6</sup>, diez veces mayor que para las hojas y tallos de la planta, pero 8 veces inferior al encontrado en los frutos<sup>4</sup>. En raíces transformadas de *S. aviculare* Ahkam Subroto & Doran<sup>17</sup> encontraron niveles del alcaloide de 32 mg/g PS mientras que Kittipongpatana *et al.*<sup>18</sup> hallaron 6.2 mg/g PS.

**Elicitación con Quitosano**

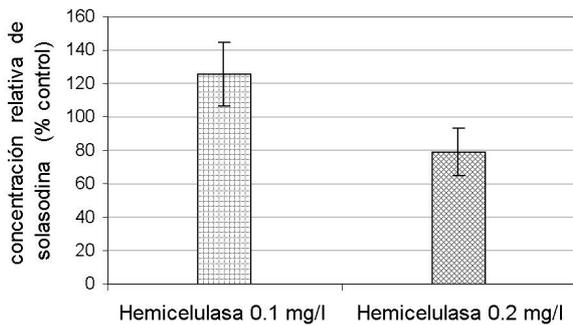
La Figura 2 muestra los resultados de la elicitación con quitosano en las concentraciones, 10 y 100 mg/l, a los tiempos de exposición, 48 y 96 h. En ninguno de los tratamientos, existe una diferencia significativa en la concentración de solasodina respecto del control (Test de Tukey, p = 0,05). Este resultado no concuerda con los obtenidos en otras especies vegetales donde se observaron incrementos significativos del contenido de alcaloides del tropano<sup>19</sup>, peroxidadas<sup>20</sup> y antraquinonas<sup>21</sup> en cultivos *in vitro*.

**Elicitación con Hemicelulosa**

La Figura 3 muestra la concentración relativa de solasodina en cultivos tratados con hemicelulosa 0,1 y 0,2 mg/l durante 48 h. En ninguna de las concentraciones ensayadas, se observó dife-



**Figura 2.** Concentración relativa de solasodina en cultivos de raíces transformadas de *S. eleagnifolium* Cav. (clon A5) tratadas con Chitosan 10 y 100 mg/l, y controles de ácido acético. El 100% representa la concentración de solasodina en cultivos control tratados con agua. Se usaron tres replicados en cada tratamiento y se realizó análisis de varianza (ANOVA) en cada caso. Las variaciones entre los tratamientos fueron analizadas usando el Test de Tukey (P = 0,05).

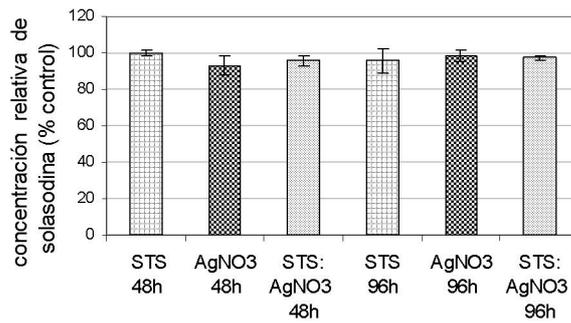


**Figura 3.** Concentración relativa de solasodina en cultivos de raíces transformadas de *S. eleagnifolium Cav.* (clon A5) tratadas con hemicelulasa 0,1 y 0,2 mg/l durante 48 h. El 100% representa la concentración de solasodina en cultivos control tratados con agua. Se usaron tres replicados en cada tratamiento y se realizó análisis de varianza (ANOVA) en cada caso. Las variaciones entre los tratamientos fueron analizadas usando el Test de Tukey (P = 0,05).

rencia significativa en la concentración de solasodina respecto del control (Test de Tukey, p=0.05). Concentraciones de 0.2 mg/l producen una disminución en la concentración del alcaloide. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos con otras especies de daturas elicidadas con celulasa y hemicelulasa. Whitehead *et al.*<sup>22</sup> obtuvieron un incremento en la acumulación de 3-hidroxilubimina en cultivos *in vitro* de *Datura stramonium* tratados con celulasa. Asimismo el empleo de hemicelulasa elicito raíces transformadas de *Brugmansia candida*<sup>23</sup> con incrementos en la concentración de hiosciamina y escopolamina.

**Elicitación con AgNO<sub>3</sub>**

Debido a que la plata libre es oxidada rápidamente por la luz, en el ensayo se la utilizó en una mezcla con tiosulfato, el cual forma un complejo soluble estable con la plata, evitando su oxidación. A fin de descartar cualquier efecto del tiosulfato sobre la producción de solasodina, se utilizaron controles con tiosulfato de sodio. Asimismo se ensayó la plata libre como elicitor. El elicitor fue probado a una concentración, 0.14 mg/l y dos tiempos de exposición, 48 y 96 h. En ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. 4) se pudo observar un incremento en la acumulación de solasodina (Test de Tukey, p = 0,05). Sin embargo este compuesto ha sido empleado en la elicitación de distintos metabolitos secundarios producidos en cultivo *in vitro*<sup>24-26</sup>, tales como taxol por *Taxus chinensis*<sup>24</sup>, escopolamina y hiosciamina por *B. candida*<sup>25</sup> y transhionona por *Salvia miltiorrhiza*<sup>26</sup>.

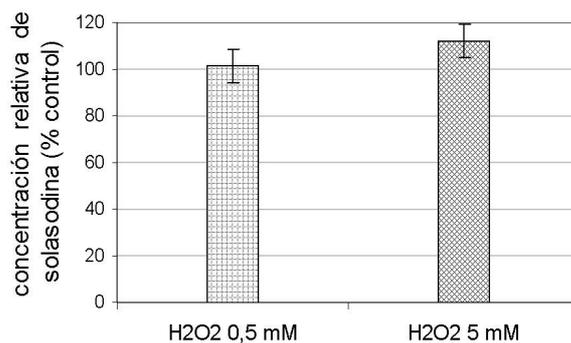


**Figura 4.** Concentración relativa de solasodina en cultivos de raíces transformadas de *S. eleagnifolium Cav.* (clon A5) tratadas con AgNO<sub>3</sub> (nitrato de plata), STS (tiosulfato de sodio) y con una mezcla 1:4 de AgNO<sub>3</sub>:STS. El 100% representa la concentración de solasodina en cultivos control tratados con agua. Se usaron tres replicados en cada tratamiento y se realizó análisis de varianza (ANOVA) en cada caso. Las variaciones entre los tratamientos fueron analizadas usando el Test de Tukey (P = 0,05).

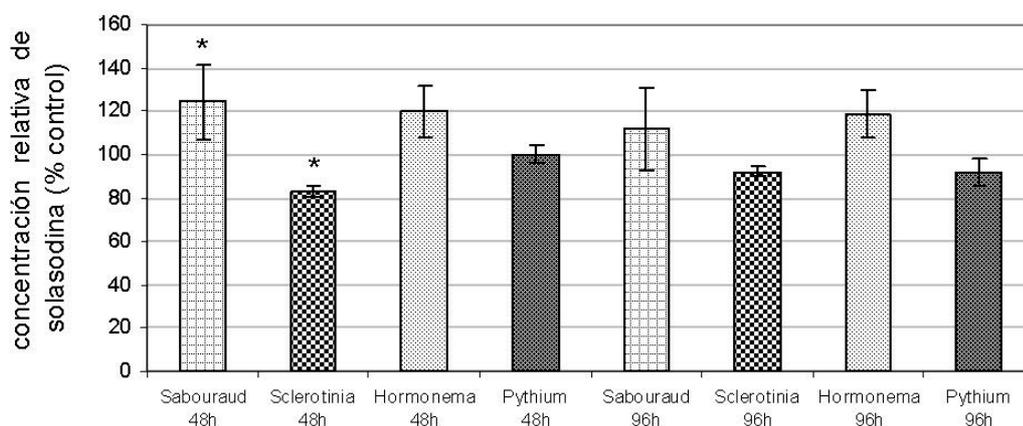
**Elicitación con peróxido de hidrógeno**

Las células vegetales al interactuar con potenciales patógenos, producen frecuentemente especies reactivas de oxígeno, entre ellas el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>27</sup>. Esta actuaría como una señal difusible encargada de inducir los genes responsables en la defensa celular<sup>28</sup>.

Se ensayó el peróxido de hidrógeno como elicitor, a las concentraciones de 17 y 170 mg/l. A las 48 h de exposición no se observaron cambios significativos en la acumulación de solasodina en las raíces transformadas de *S. eleagnifolium* (Fig. 5).



**Figura 5.** Concentración relativa de solasodina en cultivos de raíces transformadas de *S. eleagnifolium Cav.* (clon A5) tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno) durante 48 h. El 100% representa la concentración de solasodina en cultivos control tratados con agua. Se usaron tres replicados en cada tratamiento y se realizó análisis de varianza (ANOVA) en cada caso. Las variaciones entre los tratamientos fueron analizadas usando el Test de Tukey (P = 0,05).



**Figura 6.** Concentración relativa de solasodina en cultivos de raíces transformadas de *S. eleagnifolium* Cav. (clon A5) tratadas con homogenatos de hongos fitopatógenos. Se usaron tres replicados en cada tratamiento y se realizaron análisis de varianza (ANOVA) en cada caso. Las variaciones entre los tratamientos fueron analizadas usando el Test de Tukey ( $P = 0,05$ ). Se usaron tres replicados en cada tratamiento y se realizó análisis de varianza (ANOVA) en cada caso. Las variaciones entre los tratamientos fueron analizadas usando el Test de Tukey ( $P = 0,05$ ).

#### **Elicitación con homogenatos de hongos: *Hormonema* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* y *Pythium* sp.**

Los homogenatos fúngicos han sido ampliamente utilizados para la elicitación de metabolitos secundarios. Pitta-Alvarez & Giulietti<sup>29</sup> utilizaron la misma cepa de *Hormonema* sp. en la elicitación de alcaloides del tropano en cultivos de raíces transformadas de *B. candida*. Distintas cepas de la especie *Pythium* han sido utilizadas en distintos ensayos de elicitación y se ha descrito una proteína producida por *Pythium*, la oligandrina, que actúa como un potente elicitor<sup>30</sup>.

La Figura 6 muestra los resultados del tratamiento del clon A5 con los homogenatos *Hormonema* sp., *S. sclerotiorum* y *Pythium* sp. preparados según lo descrito en Materiales y Métodos. En ninguno de los tratamientos se pudo observar un incremento en la producción de solasodina respecto del control. Más aun, en los cultivos tratados con el homogenato de *S. sclerotiorum* se produjo, a las 48 h de exposición, una disminución de la concentración de solasodina del 30% respecto del control (Test de Tukey,  $p = 0,05$ ). Esta disminución puede correlacionarse con los resultados descritos por Threlfall & Whitehead<sup>31</sup>, quienes describen una reducción en la biosíntesis de esteroides como consecuencia de la exposición de cultivos de *Nicotiana tabacum* a elicitors fúngicos y celulasa. Asimismo, Choi *et al.*<sup>32</sup> describen una respuesta dual de los esteroides frente a distintos elicitors. La elicitación de discos de papa con ácido araquidónico o altas concentraciones de metil jasmonato inhiben la expresión de la isoenzima  $\beta$ -

Hidroxi- $\beta$ -metilglutaril CoA reductasa (HMGR 1) involucrada en la biosíntesis de compuestos esteroideos, mientras que bajas dosis de metil jasmonato inducen la HMGR 1 y la acumulación de esteroides.

#### **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos muestran que el efecto de la elicitación en cultivos *in vitro* de *S. eleagnifolium* Cav. depende del tipo de material vegetal empleado, ya que suspensiones celulares elicidadas produjeron incrementos de 5 a 7 veces en la concentración de solasodina<sup>11</sup>. La razón del no efecto ó efecto negativo de la elicitación sobre la producción de solasodina en raíces transformadas de *S. eleagnifolium* Cav. podría atribuirse al hecho de que la elicitación induce la producción de sesquiterpenos, las cuales son fitoalexinas en Solanaceae, y no de alcaloides<sup>33-34</sup>.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Mann, J.B. (1978) *Adv. Agronomy*. **30**: 207-45.
2. Fernandes, P., A. Cruz, B. Angelova, H.M. Pinheiro & J.M.S. Cabral (2003) *Enzyme Microb. Tech.* **62**: 1-18.
3. Ramachandra, R.S. & G.A. Ravishankar, (2002) *Biotechnology Advances* **20**: 101-153.
4. Giulietti, A.M., H.M. Nigra & O. Caso (1991) "Solanum eleagnifolium Cav. (Silverleaf Nightshade): In Vitro Culture and the Production of Solasodine", en *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 15: Medicinal and Aromatic Plant III* (Bajaj YPS, ed.) Springer-Verlag, Berlín, págs. 432-50.

5. Nigra, H.M., O. Caso & A.M. Giulietti (1987) *Plant Cell Report.* **6**: 135-7.
6. Alvarez, M.A., J. Rodriguez Talou, N. Paniego & A.M. Giulietti (1994) *Biotechnol. Lett.* **16**: 393-6.
7. Nigra, H.M., M.A. Alvarez & A.M. Giulietti (1989) *Plant Cell Report.* **8**: 230-3.
8. Alvarez, M.A., H.M. Nigra & A.M. Giulietti (1993) *Nat. Prod. Lett.* **2**: 9-19.
9. Nigra, H.M., M.A. Alvarez & A.M. Giulietti (1990) *Plant Cell Tiss. Org.* **21**: 55-60.
10. Quadri, L. & A.M. Giulietti (1993) *Enz. Microb. Tech.* **15**: 1074-7.
11. Paniego, N., J. Rodriguez Talou & A.M. Giulietti (1995) *Fitoterapia* **66**: 162-6.
12. Radman, R., T. Saez, C. Bucke & T. Keshavarz (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**: 91-102.
13. Flores-Sánchez, I.J., J. Ortega-López, M.C. Montes-Horcasitas & A.C. Ramos-Valdivia, (2002) *Plant Cell Physiol.* **43**: 1502-9.
14. Murashige, T. & F. Skoog (1962) *Physiol. Plant.* **15**: 473-94.
15. Khanna, P. & J. Staba (1968) *Lloydia* **31**: 180-9.
16. Hamill, J.D., A.J. Parr, M.J.C. Rhodes, R.J. Robins & N.J. Wallon (1987) *Biotechnol.* **5**: 800-4.
17. Ahkam Subrotoy, M. & P. Doran (1994) *Plant Cell Tiss. Org.* **38**: 93-102.
18. Kittipongpatana, N., R.S. Hock & J.R. Porter. (1998) *Plant Cell Tiss. Org.* **52**: 133-43.
19. Pitta-Alvarez, S. I. & A.M. Giulietti (2000) *Plant Cell Tiss. Org.* **59**: 31-38.
20. Flocco, C.G. & A.M. Giulietti (2003) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **110**: 175-183.
21. Vasconsuelo, A., A.M. Giulietti, G. Picotto, J. Rodriguez-Talou & R. Boland (2003) *Plant Sci.* **165**: 429-36.
22. Whitehead, I.M., A.L. Atkinson & D.R. Threlfall (1990) *Planta* **182**: 81-8.
23. Pitta-Alvarez, S.I., T. Spollansky & A.M. Giulietti (2000) *Biotechnol. Lett.* **22**: 1653-6.
24. Zhang, C.H., X.G. Mei, L. Liu & L.J. Yu (2000) *Biotechnol. Lett.* **22**: 1561-4.
25. Pitta-Alvarez, S. I., T. Spollansky & A.M. Giulietti (2000) *Enz. Microbiol. Tech.* **26**: 254-8.
26. Zhang C, Q. Yan, W.K. Cheuk & J. Wu (2004) *Planta Med.* **70**: 147-51.
27. Kauss, H., M. Fauth, A. Merten & W. Jeblick (1999) *Plant Physiol.* **120**: 1175-82.
28. Levine A, R. Tenhaken, R. Dixon & C. Lamb, (1994) *Cell.* **79**: 583-593.
29. Pitta-Alvarez, S.I. & A.M. Giulietti (1998) *Phytother. Res.* **20**: 18-20.
30. Picard, K., M. Ponchet, J.P. Blein, P. Rey, Y. Tirilly & N. Benhamou (2000) *Plant Physiol.* **124**: 379-96.
31. Threlfall, D.R. & I.M. Whitehead (1988) *Phytochemistry* **27**: 2567-80.
32. Choi, D., R.M. Bostock, S. Avdiushko & D.F. Hildebrand (1994) *L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2329-33.
33. Signs, M.W. & H.E. Flores (1989) *Plant Physiol.* **895**: 135-9.
34. Furze, M.J., M.J.C.Rhodes, A.J.Parr, R.J.Robins, I.A.Whitehead & D.R. Threlfall (1991) *Plant Cell Reports* **10**: 111-4.