

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA E INTERÉS EN AGRONOMÍA EN EXUDADOS RADICULARES

R. Pérez-Santamarina⁽¹⁾, A. Gómez-Cadenas⁽²⁾

⁽¹⁾ Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII 48, 30203, Cartagena, España
ricardopsf@hotmail.com

⁽²⁾ Universitat Jaume I, Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Campus Riu Sec, Castellón, 12071, España.

RESUMEN

El objetivo de este proyecto es generar una colección de compuestos naturales con actividad biológica procedentes de exudados radiculares de plantas cultivadas *in vitro*. Para alcanzar dicho objetivo se han optimizado los protocolos de cultivo *in vitro* para *Nicotiana tabacum*, susceptible de producir una gran variedad de compuestos bioactivos en sus exudados radiculares. Se evaluó la capacidad de diferentes elicitors químicos (nitrato de plata (AgNO₃), metil-jasmonato y el ácido salicílico) adicionados al medio de cultivo para modificar la producción de exudados radiculares, tanto en cantidad como en composición química y se midió, para cada tratamiento (elicitor y concentraciones ensayadas), la actividad antioxidante, el perfil metabolómico y el efecto que tienen sobre el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos los exudados radiculares. A la vista de los resultados se descarta la utilización del (AgNO₃) como elicitor químico, dejando como elicitors el MeJA y el SA, ya que éstos inducen la producción de una gran cantidad de compuestos exudados al medio y estimulan la acumulación de compuestos que ya se exudaban de forma basal. Posteriormente se lleva a cabo un fraccionamiento de los exudados en tres fracciones diferentes atendiendo a la polaridad de los compuestos que las constituyen, realizando un análisis espectrométrico para determinar el compuesto químico responsable de la actividad biológica, la cual se evaluará utilizando distintos modelos vegetales *in vivo* e *in vitro*. El objetivo de este trabajo es determinar las fracciones donde queda retenida la actividad biológica.

Palabras clave: *in vitro*; bioactivo; elicitors; fracción.

1. Introducción

Tras haber establecido un protocolo eficiente para el fraccionamiento químico de las diferentes muestras biológicas en tres fracciones diferentes, atendiendo a la polaridad de los compuestos que las constituyen. Los estudios encaminados a estudiar el efecto de las diferentes fracciones sobre el crecimiento del hongo *P. citrophthora* pusieron de manifiesto que la actividad antifúngica presente en los exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro*, queda retenida en la fracción 1. De igual forma, los resultados obtenidos al estudiar la capacidad antioxidante nos permiten concluir que dicha actividad está presente únicamente en la fracción 1, que se corresponde con los compuestos más polares. No se detectó actividad antifúngica ni antioxidante en las fracciones 2 ni 3.

En este trabajo se ha llevado a cabo un subfraccionamiento de la fracción 1 obtenida de

las muestras de exudados radiculares, donde quedaba retenida la actividad biológica de los mismos (tanto antifúngica como antioxidante). Se ha llevado a cabo el análisis espectrométrico de cada una de las subfracciones para su caracterización química, así como la evaluación de su actividad biológica utilizando distintos modelos vegetales *in vitro*.

2. Materiales y Métodos

Para conseguir la separación de los compuestos presentes en la fracción 1, el fraccionamiento se llevó a cabo a pH 8. Se utilizaron columnas de carbono C18. Estas columnas retienen en su matriz aquellos compuestos apolares presentes en la muestra. Estos compuestos son liberados posteriormente al inyectar (MeOH) en la columna.

Para conseguir un adecuado fraccionamiento atendiendo a la hidrofobicidad de los compuestos a pH 8, de forma que queden

retenidos en la columna los compuestos orgánicos de carácter básico presentes en las muestras, se ha seguido el siguiente protocolo:

Paso 1: Acondicionamiento de la columna. Se hace pasar a través de la columna 1 ml de H₂O seguido de 1 ml de MeOH.

Paso 2: Se lleva la muestra a pH 8 (100 ml de Fracción 1) y se hace pasar todo el volumen a través de la columna. Se recoge el volumen que eluye, que corresponde a la Fracción 1.1.

Paso 3: A continuación se hace pasar 5 ml de MeOH al 50% en agua, obteniendo la Fracción 1.2, menos polar que la Fracción 1.1.

Paso 4: Finalmente se pasan 5 ml de MeOH al 100%, lo que permite recuperar la Fracción 1.3, que es la constituida por compuestos menos polares.

Una vez realizado el fraccionamiento de las muestras se obtiene, para cada una de ellas, las fracciones 1.1, 1.2 y 1.3, que constituirán el material de partida para llevar a cabo los ensayos de actividad biológica pertinentes.

2.1 Análisis cromatográfico

En el estudio se utilizaron tres replicas biológicas de las fracciones de exudados a analizar: **Fracción 1:** eluato de agua a pH=3 (**F1**); **Fracción 1.1:** eluato de agua a pH=8 (**F1.1**); **Fracción 1.2:** eluato de metanol:agua 50:50 (**F1.2**), y **Fracción 1.3:** eluato de metanol (**F1.3**).

Tras el análisis cromatográfico y el tratamiento estadístico de la información (captura de picos, alineamiento...) se llevó a cabo el análisis de componentes principales con el software "ginkgo", fig.1.

3. Resultados y Discusión

El análisis de componentes principales agrupa de forma inequívoca los valores correspondientes a las muestras correspondientes a Exudados-Fracción 1 (EXF1) y a Exudados-Fracción 1.1 (EXF11) separadas entre ellas, y muy diferenciadas del resto de fracciones y de las muestras sin exudados (blancos). En el centro de la gráfica de loadings se encuentran agrupados los blancos de las fases de elución y las fases de exudados correspondientes a las Fracciones 1.2 y 1.3 (EX12 y EX13), siendo, difíciles de discriminar puesto que no existen diferencias relevantes entre ellos. Los valores correspondientes a las muestras obtenidas del fraccionamiento de la Fase 1 de los exudados muestran una variabilidad importante, lo cual es coherente con los resultados obtenidos en los ensayos de

actividad biológica que se describen en los apartados siguientes.

Con el fin de comprobar si los valores correspondientes al fraccionamiento de las muestras de exudados se diferenciaban correctamente se ha filtrado la variabilidad correspondiente a los blancos. Como se observa en la Figura 2, todas las fracciones se distinguen perfectamente entre ellas, siendo la reproducibilidad entre replicas biológicas bastante alta. La representación gráfica muestra también que los valores correspondientes a las fracciones 1 y 1.1 están claramente diferenciados de las 1.2 y 1.3.

Se ha ensayado la actividad de las muestras obtenidas del subfraccionamiento de la fracción 1 obtenida de exudados radiculares de plantas de *Nicotiana tabacum* cultivadas *in vitro* después de la elicitación con ácido salicílico (SA), sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Phytophthora citrophthora* y *Alternaria alternata*.

Se han llevado a cabo diferentes ensayos con el fin de determinar si la actividad responsable de reprimir el crecimiento fúngico reside, de forma mayoritaria, en alguna de las subfracciones obtenidas.

Los resultados fueron evidentes desde los 7 días de iniciado el cultivo. El ketoconazol mostró un claro efecto fungicida para ambas cepas fúngicas (Figura 3). La fase 1 obtenida del fraccionamiento de los exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro* y elicitadas con 100 µM SA tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento del hongo *P. citrophthora*. Dicha acción antifúngica se reparte entre las 3 subfracciones (1.1, 1.2 y 1.3). Aunque las tres subfracciones tienen una actividad antifúngica menor que la fracción 1, es la subfracción 1.2 la que parece retener un mayor efecto sobre el desarrollo del hongo (Figura 4). En el caso del hongo fitopatógeno *A. alternata* los resultados de experimentos anteriores (ver informe previo) pusieron de manifiesto que la fracción 1, obtenida del fraccionamiento de los exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* cultivadas *in vitro* y elicitadas con 100 µM SA tenía un efecto antifúngico. Al llevar a cabo un nuevo fraccionamiento de esta fracción 1, no se observan diferencias significativas entre la capacidad antifúngica de ésta y de las subfracciones 1.1, 1.2 y 1.3 (Figura 5). Posteriormente se ensayó la actividad antioxidante de diferentes muestras procedentes del fraccionamiento químico, en función de su polaridad.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos en un ensayo en el que se midió la actividad antioxidante en las muestras de exudados procedentes de plantas cultivadas *in vitro*, y sometidos o no a un tratamiento de elicitación química con SA 100 μ M. En relación a su capacidad antioxidante, las muestras pueden agruparse en dos bloques, el primero engloba las diferentes fracciones de las muestras del agente elicitor SA, las correspondientes a los controles (fraccionamiento de H₂O) y las subfracciones F1.2 y F1.3. Todas estas muestras carecen de actividad antioxidante. En un segundo bloque se agrupan las muestras correspondientes a la fracción 1, fracción 1.1 de exudados de plantas elicidadas con SA y fracción 1.1 procedente de exudados de plantas sin elicitar, lo que pone de relieve que la actividad antioxidante presente en la fase 1, al realizar un nuevo fraccionamiento de ésta queda retenida en la fase 1.1.

4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de la actividad biológica, se llevó a cabo un nuevo fraccionamiento de esta fase. A diferencia del primer fraccionamiento, que se llevó a cabo a pH 3, el subfraccionamiento de la fase 1 tuvo lugar a pH 8. El análisis de componentes principales de los datos obtenidos en los cromatogramas, una vez procesados matemáticamente, muestra que están mucho más próximas las fracciones 1 y la 1.1, y que éstas se separan de la 1.2 y 1.3. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el análisis de la actividad antioxidante. La capacidad antioxidante que, después del primer fraccionamiento quedaba restringida a la fase 1 (más polar a pH 3), se manifiesta, tras el segundo fraccionamiento a pH 8, únicamente en la subfracción 1.1, no detectándose actividad antioxidante en las fracciones 1.2 ni 1.3.

Los resultados obtenidos al estudiar el efecto de las diferentes subfracciones sobre el crecimiento de dos cepas de hongos fitopatógenos fueron muy diferentes. En el caso de *Phytophthora citrophthora* la adición de la fracción 1.1 al medio PDA permitió un desarrollo del hongo muy similar al observado en los controles, no observándose el efecto antifúngico de la fracción 1. Por el contrario, en el caso del hongo *Alternaria alternata* no se observaron diferencias significativas entre la capacidad antifúngica de las fracciones 1 y 1.1. Puesto que la subfracción 1.1 mantiene la capacidad antioxidante de la fracción 1 y su efecto sobre el crecimiento de diferentes cepas

de hongos depende de la especie fúngica, será de gran interés conocer cuál es el efecto de esta fracción sobre el desarrollo de hongos beneficiosos para el desarrollo de las plantas.

5. Agradecimientos

A la empresa A. Codiagro S.C.V.L. la financiación de este proyecto.

Dr. Aurelio Gómez Cadenas por su inestimable participación en este trabajo.

Al departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural de la universidad Jaume I.

6. Referencias bibliográficas

- [1] Gagnon H, Ibrahim RK. (1997) Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry* 44: 1463-1467.
- [2] Kim OT, Kim MY, Hong-MH, Ahn JC, Hwang B. (2004) Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. *Plant Cell Rep* 23: 339-344.
- [3] Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. (2006) processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem.* 78: 779-87.
- [4] Gómez-Cadenas A, Pozo O, García P, Sancho J.V (2002). Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by capillary liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* 13, 228-234.

Figuras

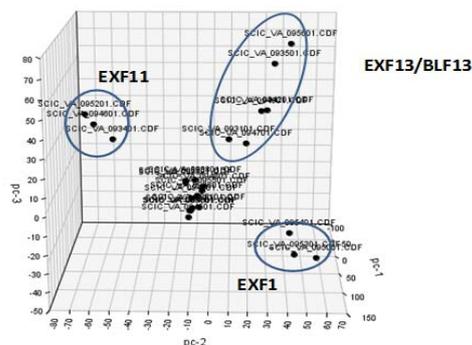


Figura 1. Representación de los picos cromatográficos tras el análisis de componentes principales.

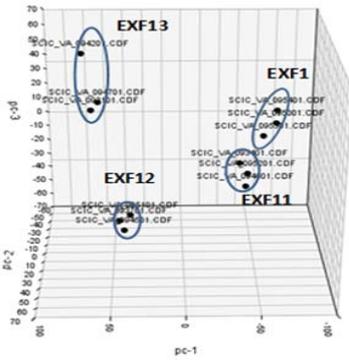


Figura 2. Representación de los picos cromatográficos tras el análisis de componentes principales una vez filtrados los valores correspondientes a los blancos.

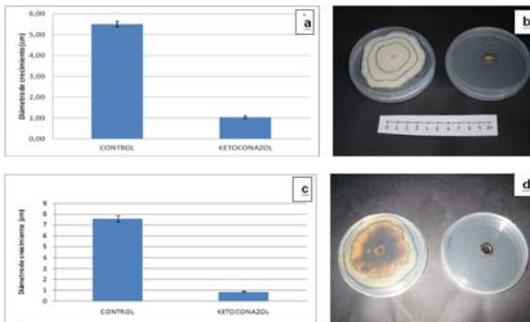


Figura 3. Efecto del fungicida ketoconazol sobre el crecimiento de *Phytophthora citrophthora* (a,b) y *Alternaria alternata* (c,d) después de 7 días en cultivo. a,c: diámetro del halo de crecimiento, b,d: imagen del cultivo.

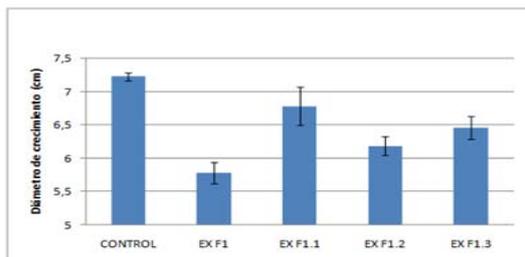


Figura 4. Efecto de las diferentes fracciones obtenidas de exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* elicitados con $100 \mu\text{M}$ SA sobre el crecimiento del hongo *P. citrophthora*.

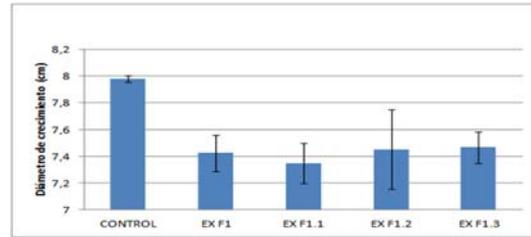


Figura 5. Efecto de las diferentes fracciones obtenidas de exudados radiculares de plantas de *N. tabacum* elicitados con $100 \mu\text{M}$ SA sobre el crecimiento del hongo *A. alternata*.

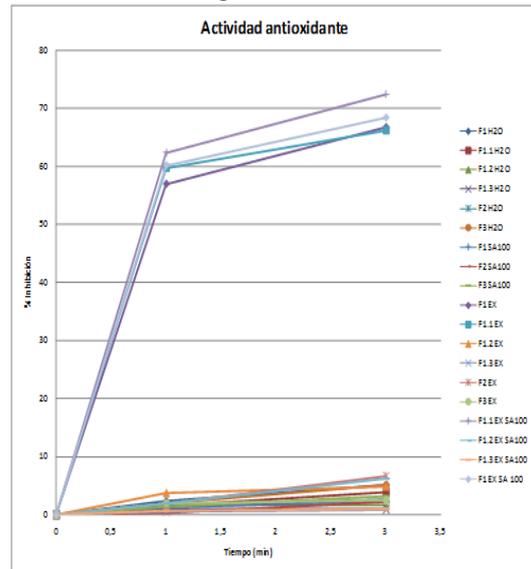


Figura 6. Actividad antioxidante (determinada como el porcentaje de descenso de la absorbancia a 1 y 3 minutos con respecto de la medida a tiempo 0). Las muestras denominadas FX H₂O corresponden a agua milli-Q fraccionada. Las muestras denominadas FX SA100 corresponden a agua milli-Q con SA $100 \mu\text{M}$, sin planta, fraccionada. Las muestras denominadas FX EX corresponden a exudados sin elicitar fraccionados. Las muestras denominadas FX EX SA 100 son exudados elicitados con SA $100 \mu\text{M}$ fraccionados (FX corresponde a las fracciones F1, F2 y F3 del primer fraccionamiento).