

SEPARACION E IDENTIFICACION DE FITOALEXINAS EN TEJIDO CALLOSO DE CHILE (*Capsicum annum*) MEDIANTE CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

M. en C. Juan José Martínez Guerra

I.B.Q. Norma Angélica Chávez Vela *

I.B.Q. Luis Gabriel Valdivia Martínez *

INTRODUCCION

El cultivo de chile hoy en día es un cultivo con distribución y uso mundial. En México ha sido un ingrediente obligado en la comida mexicana desde hace miles de años. El chile es una hortaliza muy importante en el país, ya que involucra gran superficie de cultivo, mucha mano de obra y económicamente es pilar de ciertas regiones, tanto para cultivadores como para comerciantes e industrias. Sin embargo, existen problemas de sanidad y de diversidad organoléptica, lo que conduce a pérdidas cuantiosas que lesionan económicamente tanto al productor como al consumidor final.

La marchitez del chile es el principal problema del cultivo a nivel nacional y el responsable de la disminución de los rendimientos hasta en un 40%. Los síntomas característicos de dicha enfermedad son: necrosamiento muy marcado en el tallo y al efectuarse un corte transversal se observa coloración oscura. El agente causal de esta marchitez es el hongo *Phytophthora capsici*. Otros hongos que producen efectos similares son: *Phytophthora infestans*, *P. citricola*, *Glomerella cingulata*, *Fusarium oxysporum* y otros.

El trabajo experimental que realizamos fue con la finalidad de estudiar algunos aspectos de la relación bioquímica que se establece en una planta (chile) parasitada por un hongo.

En los vegetales el daño mecánico y los ataques microbianos inducen respuestas de defensa conocidas en conjunto como "respuesta hipersensitiva de las plantas". Una de estas reacciones es la síntesis de fitoalexinas.

El papel que las fitoalexinas desempeñan en los vegetales, se ha establecido claramente debido al trabajo experimental que se ha realizado en diversos laboratorios del mundo. Se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Son compuestos que inhiben el desarrollo de los hongos en el tejido hipersensitivo y se forman solamente cuando las plantas llegan a estar en contacto con el parásito.
- La reacción de la planta se presenta en células vivas.
- La reacción defensiva está limitada al tejido colonizado por el hongo.
- La fitoalexina no es específica en su toxicidad hacia los hongos.

La principal fitoalexina del chile es el capsidiol, que es un sesquiterpeno bicíclico.

El estudio de las fitoalexinas en plantas completas es muy difícil debido al tiempo que se requiere y a que no se pueden

controlar muchas variables del medio ambiente, como por ejemplo: los nutrientes, acidez del medio, humedad, temperatura, iluminación, etc. Por esta razón, los estudios se realizaron con tejido calloso obtenido a partir de hipocótilos de plántulas de chile.

Los objetivos del trabajo fueron:

- Estandarizar un método para separar y detectar fitoalexinas producidas por tejido calloso de chile.
- Identificar la presencia de capsidiol (principal fitoalexina del chile) en tejido calloso.
- Adaptar una técnica analítica para la cuantificación de las fitoalexinas producidas por tejido calloso de chile.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Este estudio se realizó con chile de variedad Mirasol por ser uno de los principales que se cultivan en Aguascalientes.

Obtención de plántulas de *Capsicum annum* in vitro a partir de semilla

En condiciones asépticas se sembraron semillas de chile, previamente desinfectado, en medio Murashige y Skoog (MS) y se incubaron durante 40 a 45 días a 25°C de temperatura con una luminosidad constante de 3564 lux (330 pie candelas).

Obtención de tejido calloso de chile

A las plántulas obtenidas, en condiciones asépticas se les quitaron las hojas y las raíces, dejando únicamente el hipocótilo el cual se cortó en secciones de 5 mm de longitud y se sembró en medio MS sólido, el cual contenía las hormonas 2,4-diclorofenoxiacético y benciladenina en concentraciones de 6.25 μM y 0.44 μM respectivamente, las cuales son ideales para promover el crecimiento del tejido calloso a esta concentración.

Se incubaron los explantes por espacio de 4 semanas a 25°C con iluminación permanente, al cabo de este tiempo, ya había crecimiento de tejido calloso. Después de este tiempo los callos se sembraron en condiciones iguales por espacio de otras tres semanas.

Inducción de fitoalexinas

Una vez que los tejidos callosos fueron incubados durante el tiempo descrito en el inciso anterior, se separaron en dos grupos: grupo experimental (E) al que se le añadió una suspensión, en agua destilada, de esporas de *Fusarium oxysporum* que es un hongo patógeno del chile, y grupo blanco (B) al que sólo se le añadió agua destilada.

Después del tratamiento, los dos grupos de callos se incubaron a una temperatura de 25 a 30°C durante 48 horas.

Bioensayo

a) Extracción de Fitoalexinas

Después de la incubación de 48 horas, los callos se homogeneizaron en acetato de etilo. Dicho homogeneizado se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad con aire seco. El extracto seco se rediluyó en 10 ul de acetato de etilo por cada gramo de tejido calloso que se tuvo. Los extractos obtenidos fueron protegidos de la luz y se mantuvieron en refrigeración para ser utilizados en los ensayos que a continuación se describen.

b) Separación de fitoalexinas

Este ensayo se realizó utilizando cromatografía en capa fina (TLC) y únicamente se empleó la tercera parte de los extractos. El solvente empleado para la separación fue cloroformo-metanol (25:1).

Los cromatogramas obtenidos se analizaron bajo luz ultravioleta (U.V.), marcándose las posiciones de la muestra E que absorbieron esta luz y que estuvieron ausentes en la muestra B. Finalmente se calcularon los Rf's de las regiones con estas características.

c) Detección de fitoalexinas

Las regiones que absorbieron luz U.V. de la muestra E, y ausentes en la muestra B, se rediluyeron en 5 ml de acetato de etilo.

Estas muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 rev/min con la finalidad de separar el sílice. Se decantó el acetato a un tubo de ensayo y se evaporó a sequedad. Cada muestra se redisolvió en una cantidad de acetato de etilo igual a la que se tenía antes de correr la cromatografía.

De cada muestra redisuelta se tomaron 50ul y se mezclaron con 1.5 ml de Agar Papa Dextrosa (PDA) fundido. Una vez solidificado el PDA, se sembró hongo y se incubó a 30°C durante 5 días. Se observaron y compararon las cajas para ver si en alguna de éstas hubo inhibición del crecimiento del hongo.

El ensayo que se ha descrito, se llevó a cabo con dos tipos diferentes de hongos: *Fusarium oxysporum* (patógeno del chile) y *Helminthosporium sp* (no patógeno).

Identificación de capsidiol

Esta prueba se realizó únicamente si en el bioensayo hubo resultados positivos, es decir, si alguno de los compuestos separados inhibió el crecimiento de hongo.

Se llevó a cabo una separación utilizando cromatografía en capa fina (TLC) en las condiciones ya descritas. Posteriormente se roció la placa con spray de vainilla y se calentó a 110 °C por 2 a 3 minutos. Se revisó la placa para ver si hubo aparición de una mancha de color azul, cuando la hubo se determinó si correspondía a alguna región que hubiera inhibido el crecimiento del hongo en el bioensayo.

Cromatografía de líquidos de alta resolución como alternativa de cuantificación de fitoalexinas sesquiterpénicas

Mediante diversos ensayos (barridos espectrofotométricos, separaciones con diferentes fases móviles, etc.) se encontraron las condiciones más convenientes para el análisis, debido a que en la literatura consultada no hay datos reportados

sobre la determinación de este tipo de sustancias por este método.

Mediante una columna empacada con sílica unida a cadenas de 18 carbonos (columna C-18) se logró la separación del capsidiol. La fase móvil seleccionada fue una solución acuosa con metano al 60% bombeada a 1.3 ml/min. La detección se efectuó a 250 nm. El registro de la separación se llevó a cabo en un integrador computarizado que se programó a una sensibilidad de 250 mV y con un tiempo de lectura máximo de 10 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Inducción de fitoalexinas de tejido calloso

Los tejidos callosos que fueron inducidos (grupo E) a diferencia de los que no lo fueron (grupo B), presentaron cierto grado de necrosis a las 24 horas de su inducción. Este necrosamiento se atribuye a la activación de polifenoloxidasas que se activan muy probablemente por el ataque del patógeno.

Bioensayo

La muestra E, al separarse por cromatografía en capa fina con cloroformo metanol (25:1), presentó cuatro regiones que absorbieron luz U.V. y que inhibieron el crecimiento de hongos. Estas regiones no se presentaron en el extracto B. Las relaciones al frente de estas regiones, así como las coloraciones que presentaron al analizarse bajo luz ultravioleta fueron:

REGION	ABREVIACION	RF
Rojo	R ₁	0.03
Morado	M	0.23
Rojo	R ₂	0.26
Verde	V	0.74

Es importante aclarar que después de tomarse los Rf's de las regiones, éstas deben protegerse contra la luz, puesto que se pueden alterar, lo que afecta los ensayos posteriores.

Identificación de Capsidiol

Esta prueba fue fundamental para nuestro estudio, puesto que como ya se mencionó con anterioridad, el capsidiol es la principal fitoalexina del chile (*Capsicum annum*).

Este ensayo fue positivo y el capsidiol resultó ser el que tiene un Rf de 0.23 y que bajo luz U.V. presentó un color morado.

Con esto demostramos que el tejido calloso de chile es capaz de producir este sesquiterpeno, tal y como lo hacen las plantas íntegras de este vegetal.

El compuesto que presentó un color verde y un Rf de 0.74 con cloroformo metanol (25:1), se observó en una cantidad más o menos considerable al igual que el capsidiol, y según la literatura consultada, probablemente sea capsicanol o lo que es lo mismo hidroxycapsidiol puesto que este compuesto al igual que el capsidiol se ha encontrado en cantidades considerables.

Cromatografía líquida de alta resolución como alternativa para cuantificar capsidiol

La región correspondiente al capsidiol, así como la región verde, se analizaron por HPLC por ser las que en mayor cantidad se observaron en el cromatograma, además de que se encontraban más separadas de otros compuestos, lo que no

aseguraba un grado mayor de pureza. Además de estas muestras, se analizó un extracto crudo (sin separar) E y uno de muestra B.

En la muestra B se detectó un solo pico prominente, mientras que en la E, capsidiol y región verde, se detectaron tres picos. Los picos que se registraron de cada muestra, así como sus tiempos de retención y áreas son los siguientes:

MUESTRA	PICO	TIEMPO DE RETENCION (MIN)	AREA
Blanco	1	2.073	448,749
Problema	1	2.073	930,223
	2	3.523	971,541
	3	8.416	1'363,104
Región V	1	2.072	592,975
	2	3.527	3'052,778
	3	8.416	2'173,370
Región M (Capsidiol)	1	2.073	851,202
	2	3.526	1'915,956
	3	8.417	4'639,831

Como se puede apreciar el primer pico de todas las muestras es el mismo y no es fitoalexina, puesto que se encuentra en la muestra B; los dos picos restantes que se encuentran en las tres muestras son fitoalexinas, de las cuales el pico 3 corresponde al capsidiol y el 2 a la región verde (posiblemente capsicanol).

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

Se cumplieron los objetivos planeados:

- 1.- La estandarización de una metodología para separar y detectar fitoalexinas de tejido calloso de Chile, basándose en la utilización de cromatografía en capa fina.
- 2.- Se logró identificar la presencia de capsidiol (principal fitoalexina del Chile) en tejido calloso de Chile mediante la revelación de este compuesto con vainillina en cromatografía en capa fina.
- 3.- La adaptación de una técnica para la medición de fitoalexinas del Chile. Esta técnica se basó en la medición por cromatografía de líquidos de alta resolución, ya que ofrece una mayor sensibilidad en el análisis de la mayoría de los compuestos.

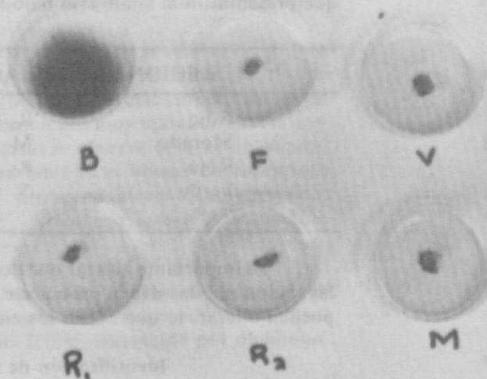


Fig. 1: B: Un extracto crudo obtenido a partir de tejido calloso de Chile no infectado con un hongo, permite el crecimiento del mismo. F y V: Cuando el extracto proviene de células infectadas se inhibe el crecimiento de un hongo patógeno: *Fusarium oxiosporium* y también el desarrollo de uno no patógeno: *Helminthosporium* sp. R₁, R₂ y M: Los compuestos inducidos por las fitoalexinas, una vez separados por cromatografía en capa fina también tiene la propiedad de inhibir el desarrollo fungal.

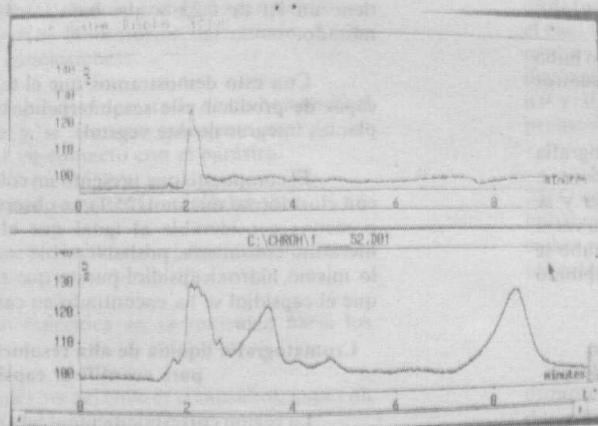


Fig. 2 En la gráfica de la parte superior de la figura se observa el análisis mediante HPLC de un extracto obtenido a partir de tejido calloso no infectado. En la parte inferior se aprecian los resultados que se obtienen cuando la muestra proviene de un callo previamente infectado. Puede observarse claramente la presencia de tres picos que no aparecen en el control y que además tienen la propiedad de inhibir el crecimiento fungal.

En este trabajo la cuantificación no fue 100% satisfactoria, debido a que únicamente se lograron identificar los picos de las fitoalexinas y éstos se compararon cualitativamente para ver cuál de estos compuestos se producía en mayor cantidad. Lo anterior se debe a que no se cuenta con una muestra estandar de fitoalexinas del chile (capsidiol principalmente).

En base a lo anterior, sugerimos que una vez identificado el capsidiol, por cromatografía en capa fina, se purifique este compuesto por algún otro método (cromatografía en columna, etc.) para obtener así una muestra estandar que permita cuantificar al capsidiol con las condiciones estandarizadas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, hemos estandarizado un método sencillo (que hasta donde sabemos no había sido descrito con anterioridad) que abre un camino a futuros estudios sobre las interacciones de células (tejido calloso) con microorganismos patógenos, sin tener que usar plantas enteras y evitando las dificultades experimentales que resultan por la complejidad de este tipo de material.

La justificación de la implantación de un método de cuantificación de capsidiol, radica principalmente en que dada la importancia del chile en el país, se pueda posteriormente obtener una línea celular de chile resistente al ataque de patógenos mediante la utilización de este método.

BIBLIOGRAFIA

Tesis: Estudio de la regulación de la biosíntesis de flavonoides y furanocumarinos en células de perejil (*Petroselinum*

crispum). Elaborada por Lozoya G.E. CINVESTAV unidad Irapuato, Gto., México. (1989). pp. 3-8.

Linskens H.F. and J.F. Jackson. (1987). High Performance Liquid Chromatography in plant Science. Verlag. Berlin Heidelberg. Vol. 5. pp. 121-148.

Bayley, A.J. and W.J. Mansfield. (1982). Phytoalexins. A Halsted Press Book. New York, Toronto. pág. 8-115.

Brooks, Ch. et al. (1985). Elicitation of Capsidiol accumulation in suspended callus cultures of *Capsicum annuum*. Phitochemistry, Vol. 25 No. 5. Gran Bretaña. pág: 1089-1092.

Adikaram, N.K. et al. (1982). Phytoalexin involvement in the latent infection of *Capsicum annuum* L. fruit by *Glomerella cingulata*. Physiological Plant Pathology. No. 21 Irlanda. pág: 161-170.

Watson, D.G. and J.W. Brooks (1984). Formation of capsidiol in *Capsicum annuum* fruits in response to non-specific elicitors. Physiological Plant Pathology. No. 24. Irlanda. pág. 331-337.

García, Calderón R. (1983). Tipos y Variedades de Chile en Aguascalientes. SARH. Centro de Investigación Agrícola del Norte. INIA. Ags. México. págs: 16.

Agenda de Información Estadística. Agropecuaria y Forestal para el año de 1981. (1982). Centro de Investigación Agrícola del Norte. Ags., México. pág. 20.

* Los datos obtenidos en este trabajo permitieron elaborar la tesis profesional para obtener el título de Ingeniero Bioquímico.