

Estudio analítico del efecto del estrés abiótico en plantas en la síntesis de metabolitos secundarios.

Autores:

Bueno-Lopez, Ana Daniela; Chávez-Ascencio, Mauricio; Guerrero-Jaramillo, Israel; Guido-Mendoza, Angelica Elizabeth; Longoria-Vázquez, Eduardo Fabian; Pedroza-Vázquez, Magali Giselle; Uribe-Rojas, Valeria Nicole, Wrobel Kazimierz, Yáñez-Barrientos Eunice.

En este proyecto de verano se llevó a cabo la evaluación del efecto del estrés salino suave en tres plantas Trigo, Fenogreco y Rábano sobre componentes del sistema antioxidante. Para lo cual se determinó la capacidad antioxidante (AOx) y el contenido de fenoles y flavonoides libres en extractos metanólicos de la biomasa obtenida de cada planta expuesta a las diferentes concentraciones de NaCl.

Metodología experimental

- **Preparación de medio de crecimiento.**

La germinación, crecimiento y exposición de las plántulas se llevaron a cabo en sistemas hidropónicos (Figura 1), utilizando como medio de cultivo solución Hoagland modificada a pH 5.8 (en la Tabla 1 se muestran los componentes y sus respectivas concentraciones).

Tabla 1. Composición de medio de crecimiento utilizado

Reactivo	Concentración en Medio
<i>Ca(NO₃)₂</i>	0.35 μM
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	2.1 μM
<i>MgCl₂</i>	0.91 μM
<i>KH₂PO₄</i>	0.97 μM
<i>KNO₃</i>	0.255 μM
<i>H₃BO₃</i>	23.13 μM
<i>MnCl₂·H₂O</i>	3.9 μM
<i>(NH₄)₆Mo₇O₂₄</i>	23.13 μM
<i>FeCl₃</i>	10 μM
<i>Zn(NO₃)₂·6H₂O</i>	0.37 μM
<i>CuSO₄·5H₂O</i>	0.44 μM

Como se mencionó en la introducción en este trabajo se evaluó el efecto de la salinidad en condiciones suaves, para lo cual se seleccionaron para las tres plantas diferentes concentraciones de NaCl en medio (0, 0.5, 5.0, 10, 30, 50 y 10 mg NaCl L⁻¹). Cada condición de estrés incluyendo el control se sembró por duplicado.

- **Siembra:**

Las semillas de las tres especies de plantas fueron adquiridas en mercados especializados, para eliminar las posibles fuentes de contaminación, previo a la siembra las semillas fueron lavadas con

70% de etanol, durante 5 min, después con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 min, por último, se enjuagaron con agua desionizada.

La germinación se llevó a cabo utilizando 50 mL de medio de cada condición de estrés, se utilizaron 60 semillas de trigo y 90 para rábano y fenogreco, previamente lavadas. La primera etapa de crecimiento comenzó con 48 horas de oscuridad (periodo en el cual comienzan a brotar las radículas), posteriormente las condiciones fueron fotoperiodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad, humedad relativa de 60% y temperatura de 25 °C, esto durante un periodo de 15 días.

En la Figura (1) se presentan los sistemas hidropónicos utilizados en este estudio para la germinación y crecimiento de las tres plantas seleccionadas.



Figura 1. Sistema de crecimiento utilizados para la germinación, crecimiento y exposición a NaCl

- **Obtención de biomasa y preservación de muestras:**

Al término de los 15 días de crecimiento/exposición, las plántulas obtenidas fueron lavadas con CaCl_2 0.05M y agua desionizada. La biomasa fue congelada, liofilizada y homogenizada para su preservación y posterior análisis.

Una vez obtenida la biomasa, se propuso un esquema general de tratamiento de muestra, el cual se muestra en la Figura 2; las actividades propuestas para evaluar el efecto del estrés salino sobre algunos componentes del metabolismo antioxidante de las plantas seleccionadas en este proyecto fueron: I) La determinación de la capacidad/actividad antioxidante, II) Determinación del contenido de fenoles libres y III) Determinación de flavonoides libres. Los tres factores determinados se realizaron a partir de extractos metanólicos de la biomasa liofilizada.

- **Extracción de metabolitos**

La extracción se realizó utilizando 50 mg de biomasa liofilizada de cada planta de todas las condiciones de crecimiento; se adicionó 1 ml de metanol al 80%, la extracción se realizó durante 16 horas a 4°C, al término de este periodo la muestra fue puesta en baño de ultrasonido por 40 min.

Posteriormente la muestra fue centrifugada a 10000 g por 15 min, se recuperó el sobrenadante para los posteriores análisis, los procedimientos de cada determinación se presentan en el esquema experimental de la Figura 2

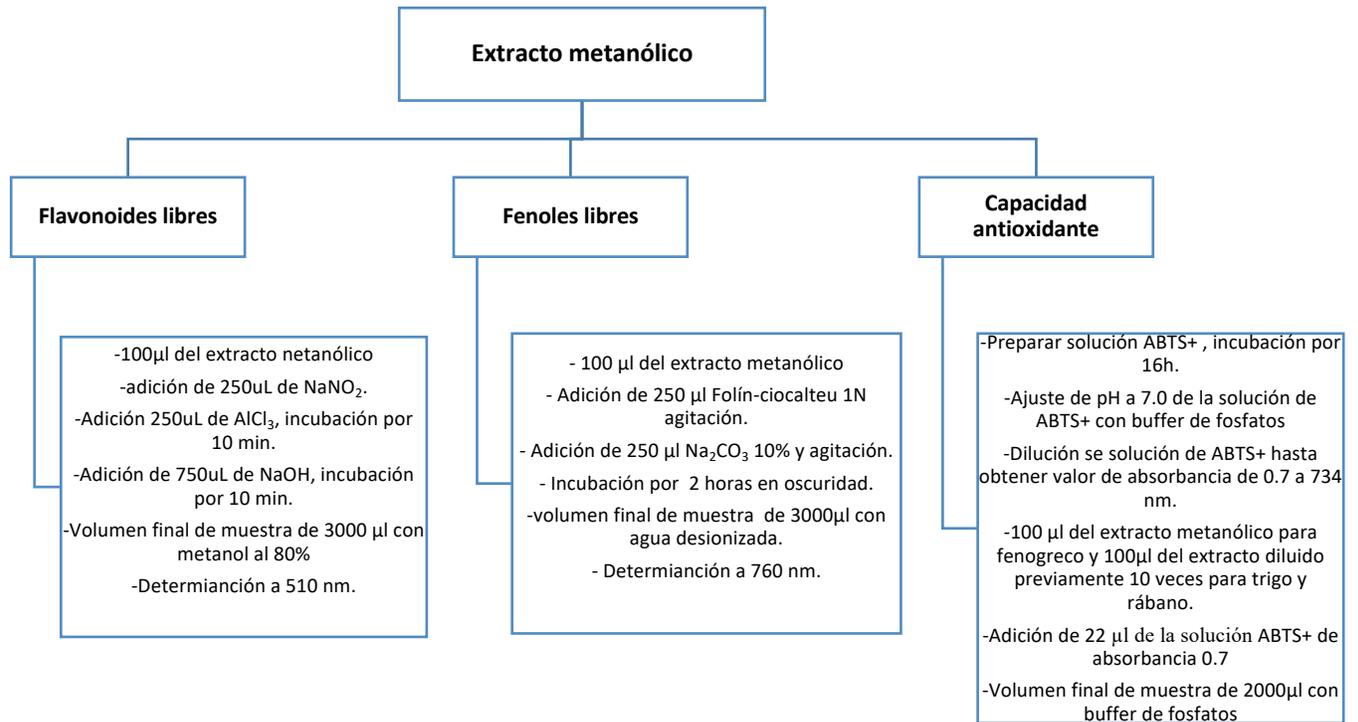


Figura 2. Esquema y procedimiento experimental realizado para la evaluación del estrés salino suave sobre el metabolismo antioxidante. *Cada determinación se realizó por duplicado, considerando también que para cada condición

- **Calibración externa**

Las determinaciones de los tres factores del metabolismo antioxidante se llevaron a cabo mediante calibración externa. Los estándares de calibración utilizados fueron rutina para determinar el contenido de flavonoides libres y ácido gálico para capacidad antioxidante y contenido de fenoles libres. En la Tabla 2, se presentan los parámetros analíticos obtenidos del proceso de calibración.

Tabla 2. Parámetros analíticos obtenidos de los respectivos procesos de calibración

Factor	Rango de calibración mg L⁻¹	Función de calibración	R²	LD mg L⁻¹	LC mg L⁻¹
Flavonoides	1.0-90.0	Abs= 0.0121 c- 0.018	0.999	0.15	0.49
Fenoles	0.5-16.0	Abs= 0.1084 c + 0.0127	0.999	0.02	0.07
AOx	0.2-2.0	Abs= 0.6805 c- 0.0171	0.999	0.05	0.17

- **Análisis estadístico.**

A partir de los resultados obtenidos de la determinación del contenido de flavonoides libres, fenoles libres y capacidad antioxidante y para observar mejor la estructura de los datos, se llevó a cabo el análisis multivariante para cada factor determinado. Se seleccionó el método de análisis de componentes principales (PCA – principal component análisis, por sus siglas en ingles) y se utilizó el paquete de software The Unscrambler 7.0 (CAMO).

Resultados y discusión

- **Evaluación del crecimiento**

Respecto al estrés salino al cual fueron sometidas todas las plantas seleccionadas, se considera suave debido que las concentraciones de NaCl son muy bajas, ya que de acuerdo con la bibliografía un medio de crecimiento para plantas se considera salino a partir de 2.3 g de NaCl por L⁻¹ ¹⁰. En este sentido la selección del rango de exposición de NaCl (0.5 a 100 mg L⁻¹) fue para: 1) evitar la afectación de funciones fisiológicas esenciales de las plantas, 2) inhibición de germinación y crecimiento significativo y 3) clorosis. Cabe mencionar que, para ninguna de las plantas y en ninguna condición

de exposición se presentaron efectos fitotóxicos visibles como clorosis, sin embargo, únicamente para fenogreco se registró una disminución en la producción de biomasa a la concentración de 100 mg L⁻¹, mientras que para rábano y trigo la cantidad de biomasa generada fue similar en todos los tratamientos comparado con los controles.

- **Evaluación del efecto de NaCl en algunos factores del metabolismo antioxidante.**

Los resultados obtenidos de la determinación de la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles y flavonoides libres en el extracto metanólico se presentan en la Tabla 3 y Figura 3. Los datos mostrados por planta son los promedios de las réplicas biológicas y técnicas analizadas con los respectivos valores desviación estándar.

Tabla 3. Resultados obtenidos de la determinación de la capacidad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides.

NaCl (mg L⁻¹)	Flavonoides (mg g⁻¹)	Capacidad antioxidante (eq. Ácido gálico g⁻¹)	Fenoles (eq. Ácido gálico g⁻¹)
Rábano			
0	5.51 ± 0.33	3.21 ± 0.08	6.29 ± 0.19
0.5	6.54 ± 0.29	3.15 ± 0.03	6.17 ± 0.33
1	6.65 ± 0.21	3.40 ± 0.09	6.63 ± 0.39
5	6.73 ± 0.24	3.64 ± 0.09	7.77 ± 0.29
10	6.13 ± 0.22	3.91 ± 0.15	6.75 ± 0.78
30	6.05 ± 0.19	3.44 ± 0.11	7.29 ± 0.26
50	5.85 ± 0.12	3.23 ± 0.19	7.01 ± 0.52
100	5.72 ± 0.23	3.19 ± 0.01	7.11 ± 0.50
Trigo			
0	6.95 ± 0.37	2.50 ± 0.10	4.29 ± 0.26
0.5	6.24 ± 0.02	2.51 ± 0.08	4.15 ± 0.40
1	5.80 ± 0.26	2.43 ± 0.07	3.91 ± 0.27
5	6.27 ± 0.19	2.81 ± 0.12	4.21 ± 0.15
10	6.00 ± 0.27	2.79 ± 0.17	4.33 ± 0.30
30	6.55 ± 0.41	2.89 ± 0.22	4.92 ± 0.13
50	6.07 ± 0.52	2.96 ± 0.06	4.55 ± 0.07
100	6.15 ± 0.03	3.10 ± 0.12	4.52 ± 0.03
Fenogreco			
0	3.42 ± 0.13	0.94 ± 0.11	4.05 ± 0.06
0.5	3.80 ± 0.12	0.91 ± 0.06	3.77 ± 0.22
1	3.27 ± 0.16	0.81 ± 0.17	2.95 ± 0.50
5	3.19 ± 0.04	0.95 ± 0.06	3.79 ± 0.12
10	3.09 ± 0.23	1.02 ± 0.09	3.92 ± 0.02
30	3.14 ± 0.15	0.95 ± 0.15	3.96 ± 0.08

50	3.35 ± 0.07	1.01 ± 0.09	3.81 ± 0.23
100	3.41 ± 0.18	1.02 ± 0.03	3.83 ± 0.04

De acuerdo con los resultados, para el contenido de flavonoides libres el mayor contenido se registró para trigo (5.80 – 6.95 mg g⁻¹), seguido de rábano (5.51 – 6.73 mg g⁻¹), siendo fenogreco la planta en la que se determinó el menor contenido (3.09 – 3.80 mg g⁻¹). Para el caso de la capacidad antioxidante, el comportamiento encontrado fue rábano (3.15 - 3.91 mg Eq Ac. Gal g⁻¹) >trigo (2.43 - 3.10 mg Eq Ac. Gal g⁻¹) >fenogreco (2.95 - 4.05 mg Eq Ac. Gal g⁻¹). Un comportamiento similar se observó para el contenido de fenoles libres donde el mayor contenido se registró para rábano (6.17 - 7.77 mg eq Ac. Gal g⁻¹), seguido de trigo (3.91- 4.92 mg eq Ac. Gal g⁻¹), siendo el extracto de menor contenido de fenoles libre el correspondiente a fenogreco (2.95 – 4.05 mg eq Ac. Gal g⁻¹).

Con el fin de observar el comportamiento de las plantas en las diferentes condiciones de exposición, se graficaron los resultados obtenidos (Tabla 2) por factor determinado (fenoles, flavonoides y AOx), los cuales se presentan en la Figura 3.

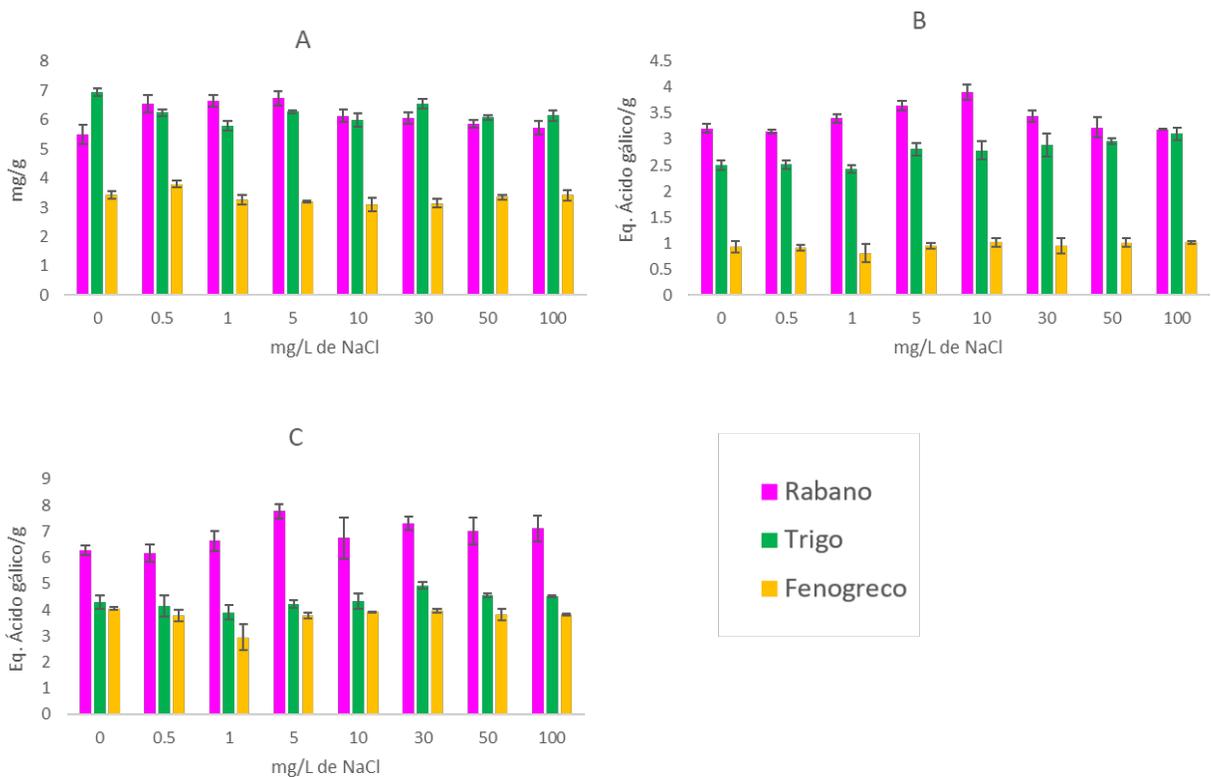


Figura 3. Distribución de los resultados obtenidos de la determinación de: A) Flavonoides libres, B) Capacidad antioxidante y C) Fenoles libres.

En la gráfica correspondiente al contenido de flavonoides libres (Figura 3A), se observa para el caso de rábano un aumento en el contenido en todas las concentraciones del estresante respecto al tratamiento control, siendo las condiciones de 0.5 a 5.0 mg NaCl L⁻¹, en las que mayor cantidad de flavonoides libres se determinó. Para el caso del trigo, los valores encontrados de flavonoides libres en todas las condiciones de exposición son menores que la determinada en el tratamiento control. Para fenogreco los valores encontrados en las diferentes condiciones de estrés son similares a las del control, sin embargo, la condición de 0.5 mg NaCl L⁻¹ fue en la que se registró la mayor cantidad de flavonoides. Por otro lado, para el caso de la capacidad antioxidante (Figura 3B), se observa que para rábano este factor aumenta paulatinamente conforme lo hace la concentración de NaCl en el medio en el rango de 0.5 a 10 mg NaCl L⁻¹, respecto al control; a concentraciones mayores de 10 mg NaCl L⁻¹ comienza a disminuir este factor. Para el caso del trigo, en las concentraciones superiores a 5.0 mg NaCl L⁻¹ se registra un aumento de la capacidad antioxidante respecto al tratamiento control. Para el caso de fenogreco no se observa a simple vista cambios en la capacidad antioxidante en ninguno de los tratamientos con NaCl respecto al control, lo que podría indicar que el NaCl no afecta la actividad antioxidante de esta planta hasta en el rango de concentración estudiado (0.5 – 100 mg NaCl L⁻¹). Por último, en la Figura 3C se presentan los resultados obtenidos de la determinación del contenido de fenoles libres. Para el caso del rábano se observa un aumento en el contenido de fenoles en las concentraciones superiores a 1.0 mg NaCl L⁻¹ respecto al control, siendo la condición de 5.0 mg NaCl L⁻¹ en la que mayor contenido se determinó. Para el caso de trigo las condiciones de 30 – 100 mg NaCl L⁻¹ fueron en las que se determinó el mayor contenido de fenoles se determinó. Por último, al igual que en la capacidad antioxidante no se observó a simple vista un efecto en el contenido de fenoles libre para el fenogreco.

Para disminuir la dimensionalidad y observar mejor la estructura de los datos, se llevó a cabo el análisis multivariante de los resultados obtenidos de los tres factores determinados, flavonoides libres, capacidad antioxidante y fenoles libres; para lo cual se realizó el método de análisis de componentes principales (PCA) para cada uno. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 4, 5 y 6, respectivamente.

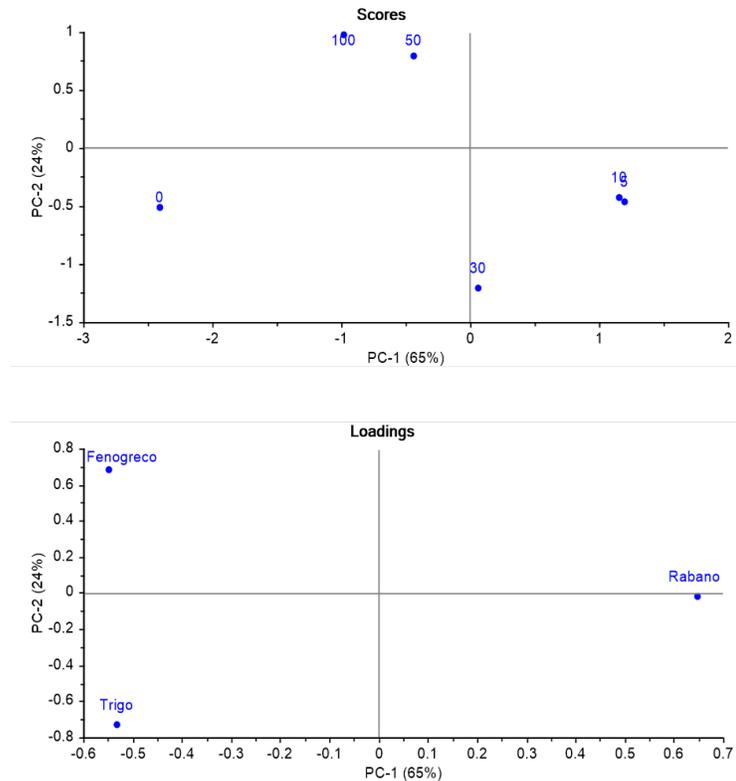


Figura 4. Modelo PCA obtenido de los resultados obtenidos de la determinación del contenido de flavonoides libres

El modelo PCA obtenido para el contenido de flavonoides libres de todas las plantas se presenta en la Figura 4. Como se puede observar, los dos primeros componentes principales describen 89% de la variabilidad total de los datos, lo que confirma la significancia estadística del modelo. En el gráfico de "scores", el modelo ordena las muestras de acuerdo con la concentración de NaCl en el medio. En el gráfico de "loadings", en las mismas coordenadas de los dos primeros componentes principales, se obtiene la distribución de variables descriptivas, las cuales corresponden a las plantas. De acuerdo a esta gráfica se pueden observar 3 asociaciones: 1) entre el fenogreco y las condiciones de 50 y 100 mg NaCl L⁻¹, 2) entre rábano con las condiciones de 5.0 y 10 mg NaCl L⁻¹ y 3) entre el trigo y el tratamiento control. Dichas asociaciones sugieren que en las concentraciones señaladas el contenido de flavonoides libres se ve favorecido.

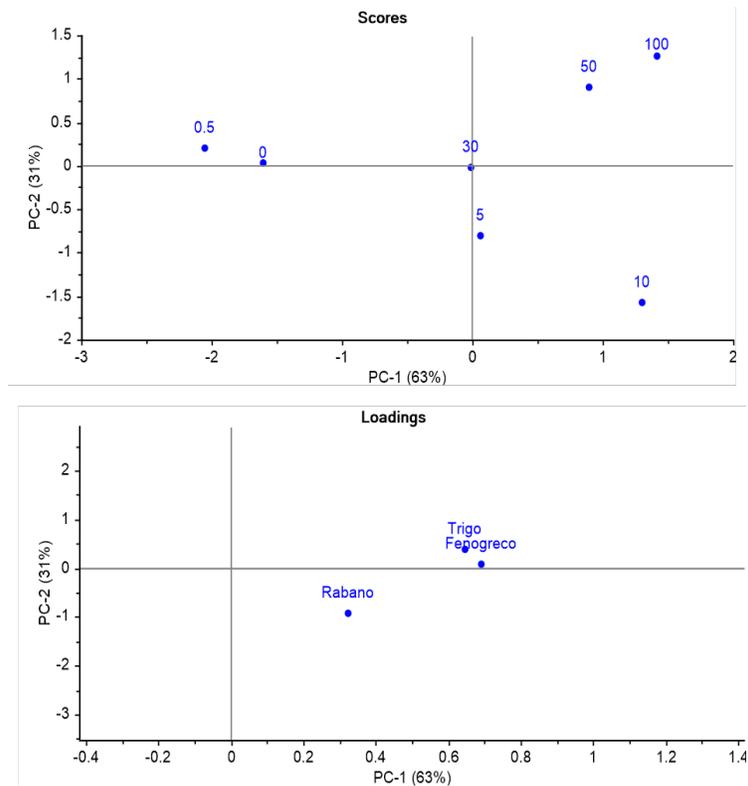


Figura 5. Modelo PCA obtenido de los resultados obtenidos de la determinación de la capacidad antioxidante.

El modelo PCA obtenido de la determinación de la capacidad antioxidante de todas las plantas se presenta en la Figura 5. Como se puede observar, los dos primeros componentes principales describen 94% de la variabilidad total de los datos, lo que confirma la significancia estadística del modelo. En el gráfico de "scores", el modelo ordena las muestras de acuerdo con la concentración de NaCl en el medio. En el gráfico de "loadings", en las mismas coordenadas de los dos primeros componentes principales, se obtiene la distribución de variables descriptivas, las cuales corresponden a las plantas. De acuerdo a esta gráfica se pueden observar 2 asociaciones: 1) la correspondiente a trigo-fenogreco con las condiciones de 50 y 100 mg NaCl L⁻¹ y 2) la de rábano con las condiciones de 5 y 10 mg NaCl L⁻¹. La primera asociación sugiere que el trigo y el fenogreco pudieran tener un comportamiento similar en la capacidad antioxidante obtenida a las mayores actividades en las condiciones de 50 y 100 mg NaCl L⁻¹; mientras que para la segunda asociación sugiere que el rábano a concentraciones 10 veces menores (5 y 10 mg NaCl L⁻¹) se registra la máxima actividad de antioxidante.

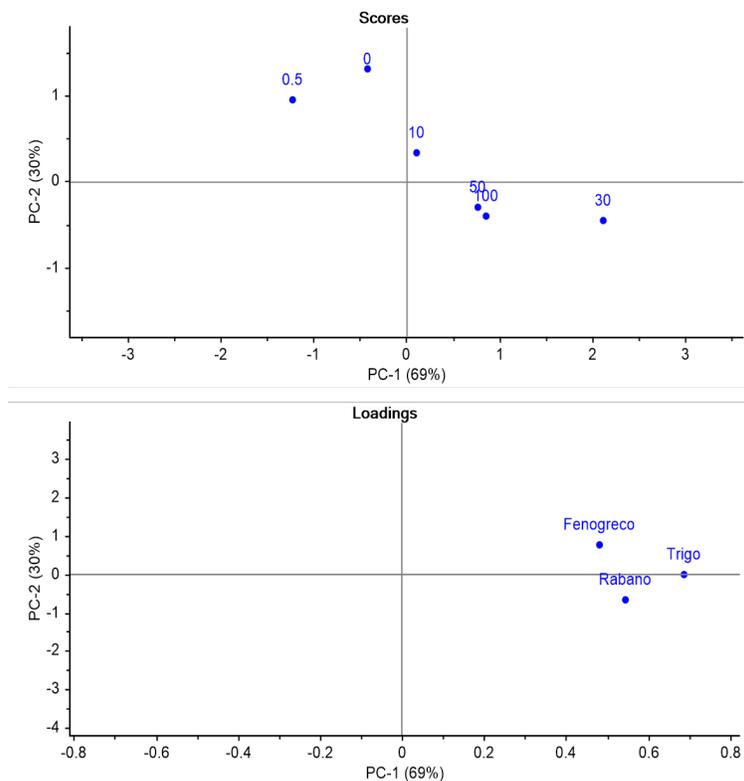


Figura 6. Modelo PCA obtenido de los resultados obtenidos de la determinación del contenido de fenoles libres.

El modelo PCA obtenido para el contenido de fenoles libres de todas las plantas se presenta en la Figura 4. Como se puede observar, los dos primeros componentes principales describen 99% de la variabilidad total de los datos, lo que confirma la significancia estadística del modelo. En el gráfico de "scores", el modelo ordena las muestras de acuerdo con la concentración de NaCl en el medio. En el gráfico de "loadings", en las mismas coordenadas de los dos primeros componentes principales, se obtiene la distribución de variables descriptivas, las cuales corresponden a las plantas. De acuerdo a esta gráfica se puede observar, en la región de los valores positivos del primer componente (PC-1) se acomodan las concentraciones más altas de NaCl y se asocian con las 3 plantas, mientras que en la sección de los valores negativos del PC1 se distribuyen el control y la concentración más baja del estresante ($0.5 \text{ mg NaCl L}^{-1}$). Este acomodo sugeriría que el contenido de flavonoides libres se ve favorecido para las tres plantas en el rango de $10 - 100 \text{ mg NaCl L}^{-1}$.

Conclusión

Con el fin de generar conocimiento aplicable en el campo de la nutraceutica, agronomía y química analítica para la producción de alimentos funcionales, en el presente trabajo se llevó a cabo el estudio analítico del efecto del estrés salino suave en la síntesis de metabolitos secundarios (fenoles y flavonoides libres) y la capacidad antioxidante. Para este estudio se seleccionaron 3 plantas comestibles (rábano, trigo y fenogreco) las cuales fueron germinadas a diferentes concentraciones de NaCl (0 – 100mg NaCl L⁻¹). En estas condiciones de salinidad suave para ninguna de las plantas y en ninguna condición de exposición se presentaron efectos fitotóxicos visibles como clorosis, sin embargo, únicamente para fenogreco se registró una disminución en la producción de biomasa a la concentración de 100 mg L⁻¹, mientras que para rábano y trigo la cantidad de biomasa generada fue similar en todos los tratamientos comparado con los controles. La respuesta de cada planta a las mismas condiciones de estrés fue diferente en los tres factores evaluados, siendo la planta de rábano la que presentó los mejores resultados de respuesta al estrés impuesto, ya que se vio favorecido la síntesis de flavonoides y fenoles libres en prácticamente todo el rango de exposición comparado con el control. Es este sentido se propone como perspectiva de trabajo futuro el uso de esta planta en estudios agronómicos para la obtención de alimentos funcionales.

Referencias

1. Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*. 1992;18(1):1-29. doi:10.1080/01635589209514201
2. Botella-Pavia P, Rodriguez-Concepcion M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. *Physiologia Plantarum*. 2006;126(3):369-381. doi:10.1111/j.1399-3054.2006.00632.x
3. Mattoo AK, Shukla V, Fatima T, Handa AK, Yachha SK. Genetic Engineering to Enhance Crop-Based Phytonutrients (Nutraceuticals) to Alleviate Diet-Related Diseases. In: ; 2010:122-143. doi:10.1007/978-1-4419-7347-4_10
4. Akula R, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(11):1720-1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613
5. Maiti R, Satya P. Research advances in major cereal crops for adaptation to abiotic stresses. *GM Crops & Food*. 2014;5(4):259-279. doi:10.4161/21645698.2014.947861
6. Atkinson NJ, Urwin PE. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(10):3523-3543. doi:10.1093/jxb/ers100
7. Takeda S, Matsuoka M. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(6):444-457. doi:10.1038/nrg2342

8. Newton AC, Johnson SN, Gregory PJ. Implications of climate change for diseases, crop yields and food security. *Euphytica*. 2011;179(1):3-18. doi:10.1007/s10681-011-0359-4
9. Akula R, Ravishankar GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*. 2011;6(11):1720-1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613
10. Munns R, Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 2008;59(1):651-681. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911