

INDUCCION DE LA PRODUCCION DE FITOALEXINAS CON AMINOGLICOSIDOS EN HOJAS DE BANANO (*MUSA PARADISIACA*)

Luis Fernando Echeverri L. (1)

Jorge A. Lanau Q. (2)

Carlos A. Peláez J. (2)

RESUMEN

La aplicación de varios aminoglicósidos en hojas de banano (*Musa paradisiaca*) induce la producción de varias fitoalexinas. Se discute así mismo, a la luz de los resultados obtenidos, el papel de tales sustancias en la planta y los fenómenos de susceptibilidad y resistencia a nivel molecular, postulándose estructuralmente un posible inductor general de fitoalexinas.

INTRODUCCION

Las fitoalexinas son un grupo de sustancias antibióticas producidas por las plantas como respuesta a la invasión por microorganismos (Paxton, 1981). Esta definición se fundamenta más en un hecho fisiológico que en una circunstancia estructural, pues las fitoalexinas conocidas hasta el momento incluyen diversos núcleos de productos naturales.

Algunos carbohidratos de microorganismos y de las propias plantas también inducen la producción de fitoalexinas y se conocen con el nombre de "Elicitors" (Albersheim y Valent, 1978; Keen, 1975).

Diferentes autores han inducido la producción de fitoalexinas con varias sustancias; así, algunas poliaminas y polipéptidos han demostrado este efecto en *Pisum sativum* (Hadwiger y col., 1974) y algunos carbohidratos de la pared de *Phytophthora megasperma* lo hacen en soya (Albersheim y col., 1981). Partiendo de esto, hemos examinado algunas moléculas que tienen ambos grupos estructurales, esto es, poseen un residuo de carbohidrato y, unido a él, uno o varios grupos amino, como posibles agentes inductores de fitoalexinas en hojas de banano, planta ésta que actualmente es afectada por el hongo patógeno *Mycosphaerella fidjensis* o Sigatoka Negra, que disminuye notablemente su productividad, sin que hasta el momento se tenga un agente eficaz para erradicarlo.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten mostrar otros aspectos de la función de fitoalexinas en plantas y, además, fundamentar hipótesis a nivel molecular acerca de los fenómenos de resistencia y susceptibilidad de las plantas a los microorganismos, partiendo de la teoría de la existencia de un receptor en la pared celular vegetal, que es capaz de interactuar con los elicitores.

Se plantea también la posibilidad de inducir fitoalexinas en plantas importantes, mediante el diseño de un inductor ideal, con la finalidad de proteger cultivos alimenticios, industriales y medicinales.

MATERIALES Y METODOS

Se prepararon soluciones de los aminoglicósidos kanamicina y amikacina (grupo kanamicinas), sisomicina, gentamicina y netilmicina (grupo gentamicinas), lincomicina y clindamicina (grupo lincomicinas) y dibekacina, a una concentración de 10 mg/ml, en agua/Tween 80 al 0.050/o, adicionando esta última sustancia con el fin de solubilizar en el agua las fitoalexinas producidas por las plantas. Estas soluciones se aplicaron en la superficie de las hojas de banano, previamente desengrasadas con un algodón impregnado de éter de petróleo. Transcurridas 72 horas, se recolectaron las gotas de los inductores y se extrajeron con diclorometano, el cual, al evaporarlo al vacío, produce un sólido resinoso de intenso color amarillo, sobre el cual se realizó la prueba de Shinoda. Esta mezcla bruta se separó en varios componentes cuando se le realizó cromatografía en capa fina sobre sílica gel, 025 mm de espesor, en el sistema CHCl_3 - EtOAc (28:8, v/v), visualizándose los compuestos separados con FeCl_3 al 50/o.

Para medir la potencia relativa de cada agente inductor, se colectaron alícuotas de cada uno de ellos a las 72 horas, se extrajeron con diclorometano, se evaporó éste y se redisolvió el residuo en un volumen igual de etanol; luego se midió la absorbancia a 263 nm, realizando tres experimentos para cada aminoglicósido.

La cinética de la producción de las fitoalexinas se realizó tomando alícuotas del inducido con kanamicina a las 12, 24,

(1) Profesor, Depto. de Química, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Estudiantes de Química y Biología, Univ. de Antioquia, Medellín, Colombia.

36, 48 y 72 horas después de la inducción; para su cuantificación se procedió de manera similar a la anterior.

Dado que la definición estricta de fitoalexina requiere su producción inducida por microorganismos, se inocularon gotas que contenían aproximadamente 10^5 esporas de *Aspergillus sp.* por ml de solución, se recolectaron las gotas a las 72 horas y se le realizó cromatografía a esta mezcla en el sistema descrito anteriormente, para comparar los resultados con los obtenidos en la cromatografía realizada al extracto originado en la aplicación de los aminoglicósidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

La cromatografía en capa fina de la mezcla de sustancias obtenidas con la aplicación de los aminoglicósidos, muestra la presencia de al menos cinco sustancias de $R_f = 0.20, 0.35, 0.50, 0.55$ y 0.80 , siendo la más abundante la tercera de ellas. Esta se purificó por cromatografía en columna sobre sílica gel, usando como eluente la misma mezcla usada en capa fina; la prueba de Shinoda para esta sustancia y para la mezcla es positiva, lo cual indica un núcleo de flavonoide, que por las evidencias de ultravioleta, resonancia magnética nuclear de protones y espectrometría de masas, parece ser un isoflavonoide disustituido en el anillo B, con una fuerte absorbancia a 263 nm . La elucidación estructural completa será objeto de futura publicación (tabla 1).

La absorbancia de la alícuota de cada agente inductor (tabla 2), hace posible clasificarlos en tres grupos, de acuerdo a la cantidad de compuesto de $R_f = 0.50$ producido:

- Inductores potentes: kanamicina, sisomicina y gentamicina,
- Inductores de actividad media: netilmicina y dibekacina,
- Inductores carentes de actividad: amikacina, clindamicina y lincomicina.

Tabla 1. Espectro de masas de la sustancia de $R_f = 0.50$, inducida con aminoglicósidos en hojas de banano (Finnigan 4000, 70 eV).

m/e	Intensidad (o/o)
302	10
287	100
259	12
202	40
189	20
165	10
152	12
151	12
150	10
137	20
135	30
121	35
107	45

Tabla 2. Absorbancia de alícuotas de varios inductores de fitoalexinas en hojas de banano. * = No detectable

Inductor	Absorbancia a 263 nm
Kanamicina	1.00
Sisomicina	0.85
Gentamicina	0.80
Netilmicina	0.25
Dibekacina	0.25
Amikacina	*
Lincomicina	*
Clindamicina	*

Con estos resultados se pueden establecer relaciones entre la estructura del inductor y la respuesta de la planta. Así, la kanamicina es el inductor más potente; sin embargo, la adición de una cadena lateral hidrofílica (amikacina), la inactiva completamente, por lo cual se puede pensar que tal cadena copa los sitios claves del receptor celular, impidiendo la formación de enlaces efectivos con el inductor. La sisomicina es una gentamicina con un doble enlace en C_3-C_4 , que facilita la formación de un dipolo entre el receptor y el inductor, estableciéndose una unión más íntima y por ende una mayor respuesta, pero la adición de un grupo $-CH_2CH_3$ a nivel del nitrógeno de C_1 (netilmicina), rebaja notablemente la actividad inductora, demostrando que este sitio es clave para una correcta interacción inductor-superficie celular.

La lincomicina y la clindamicina son prácticamente inactivas como agentes inductores, demostrándose así que se requiere la presencia de grupos amino en un núcleo de carbohidrato, ya que estas últimas dos sustancias tienen un núcleo de ácido higrico con un átomo de azufre.

En la zona de aplicación de la gota que contiene los aminoglicósidos activos se aprecia, al cabo de las 36 horas, una necrosis, que se incrementa con el tiempo.

Se confirma por tanto nuestra hipótesis, consistente en que un carbohidrato aminado induce la producción de fitoalexinas.

Los análisis de la cinética de producción muestran un resultado sorprendente, puesto que después de las 48 horas, la sustancia mayoritaria comienza a desaparecer paulatinamente (fig. 1). En vista de que no hay otro agente biótico diferente a la planta al cual pueda atribuirse esta desaparición, se puede pensar que la planta podría usar el compuesto para varios fines, a saber: restablecer su bioquímica normal; asimilarla en forma parcialmente inactiva, ya que puede ser fitotóxica; estabilizar su membrana y los procesos de intercambio; o activar otros mecanismos de defensa. La segunda alternativa se ha comprobado al menos en un caso (Ishiguri y col., 1978), pero cualquiera de ellas pone en duda el papel

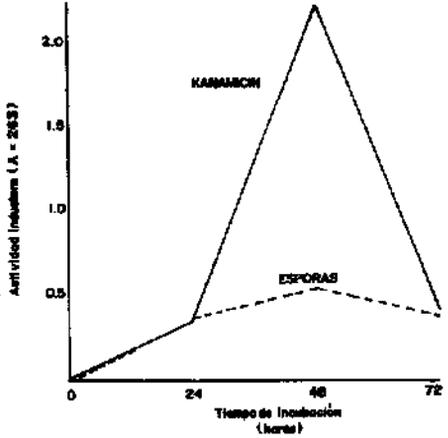


Fig. 1 Cinética de la producción de fitoalexinas en banano.

directo que se atribuye a las fitoalexinas sobre microorganismos, ya que su postulada actividad antibiótica bien puede ser un fenómeno adicional al de su verdadero papel en la célula vegetal. Una hipótesis reciente sugiere que los elicitors estimulan la acumulación de fitoalexinas al liberar un elicitor endógeno de la pared celular de planta (Darvill y Albersheim, 1984). Lo anterior implica entonces que se debe abrir otro enfoque a la experimentación de fitoalexinas como agentes protectores de plantas *in vivo*, puesto que la mayoría de los experimentos se han realizado *in vitro* (Rhatmell, 1982; Van Etten, 1976).

La cromatografía en capa fina de los extractos de fitoalexinos obtenidas con aminoglicósidos y con esporas de *Aspergillus sp.*, muestra que se producen las mismas sustancias, lo cual deja a un lado la posibilidad de que sean productos de descomposición o metabolismo de los aminoglicósidos inductores y se refuerza además el hecho de que estamos ante verdaderas fitoalexinas. Al respecto, las condiciones ambientales tienen una influencia grande sobre la cantidad de fitoalexina producida, pues a una temperatura de 18°C hay poca germinación de esporas, paso éste que es definitivo para una buena producción de fitoalexinas.

Con estos resultados podemos postular varias hipótesis acerca de la susceptibilidad y resistencia de las plantas a los microorganismos a nivel molecular y ateniéndonos siempre a la presencia de un receptor celular. La susceptibilidad a un patógeno ocurriría cuando:

- a. El microorganismo evolutivamente ha cambiado la composición de su pared y no es reconocido por los carbohidratos de la pared celular vegetal; por tanto, la planta no se defiende efectivamente.
- b. La célula vegetal ha cambiado la composición de su pared y sus carbohidratos no reconocen los carbohidratos del patógeno.

- c. La célula vegetal, a pesar de detectar el patógeno, es incapaz de liberar otros compuestos (elicitors internos), que a su vez activan los mecanismos de defensa.
- d. El microorganismo inactiva las enzimas de las plantas, que son necesarias para la producción y/o liberación de sustancias de defensa.
- e. El microorganismo tiene mecanismos alternos de ataque, generalmente enzimas glucosidasas o peptidasas, con las cuales altera la bioquímica normal de la planta.

Dado que se ha demostrado que las fitoalexinas son mecanismos activos de defensa de las plantas (Bell, 1981; Harborne y col., 1976), actualmente se examina la posibilidad de usarlas como agentes protectores de cultivos, reemplazando de esta manera los fungicidas tradicionalmente empleados (Ward y col., 1974), con dos alternativas: usar las fitoalexinas como tales o aplicar sustancias que induzcan su producción en el momento adecuado. Con los resultados de este trabajo, se podría diseñar un inductor que tenga simultáneamente en su estructura un núcleo de carbohidrato y varios grupos amino, y que se puede producir a partir de una materia prima abundante, barata y con varios grupos susceptibles de ser transformados; excelentes candidatos serían la sacarosa, el almidón y la celulosa, convenientemente funcionalizados por los métodos de la química orgánica; así, los inductores actuarían de manera similar a como lo hacen las vacunas en los seres humanos, esto es, induciendo la producción de anticuerpos antes de que se haga presente el patógeno. En soya, por ejemplo, se ha inducido la producción de fitoalexinas inoculándola con un β -glucano, 6 horas antes de inocularle un patógeno compatible; como resultado, la planta es completamente protegida de los efectos deletéreos del patógeno (Albersheim y Valent, 1978).

Del micelio del hongo *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, que origina la pudrición de la raíz y el tallo de la soya, se ha aislado un glucano hepta- β -glucósido-alditol, que dispara la producción de fitoalexinas a una concentración de 0.6 nanogramos/cotiledón; este compuesto se origina a partir de otro polisacárido, conjuntamente con otros oligosacáridos que son inactivos como inductores de fitoalexinas (Darvill y Albersheim, 1984). Posteriormente el heptasacárido fue sintetizado (Ossowski y col., 1983) y su estructura se muestra en la fig. 2.

La complejidad estructural de los elicitors no parece ser un requisito esencial para su actividad, aunque de ello sí parece depender su especificidad. La posibilidad de obtener elicitors sintéticos derivados de carbohidratos y relativamente simples se aumenta aún más desde que se demostró que la sacarosa a concentraciones de 20 a 35 microgramos/ml dispara la producción de fitoalexinas en *Cajanus*

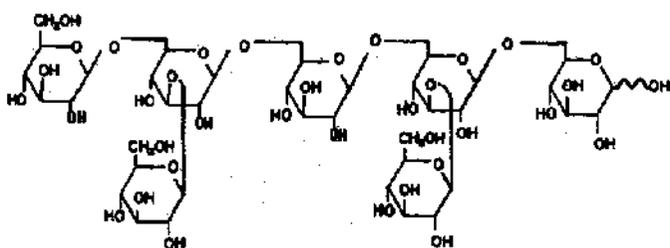


Fig. 2. Estructura del oligosacárido inductor de fitoalexinas en soya.

cajanus (L.) Millsp (Cooksey y col., 1983); con anterioridad se había demostrado que se aumentaba la resistencia a hongos patógenos si se rociaba una solución de sacarosa antes de inocular el patógeno (Rusell, 1967; Cartwright y Rusell, 1980).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Comité Central de Investigaciones de la Universidad de Antioquia la financiación de este trabajo, y al Dr. J. I. Castaño, de la Compañía Colombiana de Tabaco, la toma de los espectros de masas.

"INDUCTION OF PHYTOALEXINS IN BANANA (*MUSA PARADISIACA*) LEAVES WITH AMINOGLYCOSIDES"

ABSTRACT.

The application of several different aminoglycosides induces the production of phytoalexins in leaves of bananas (Musa paradisiaca). This article discusses the data obtained in these experiments as well as the phenomena of susceptibility and resistance at the molecular level in the plants. The structure of a possible inductor of phytoalexins is postulated.

LITERATURA CITADA

- Albersheim, P. y B. Valent. 1978. Host pathogens interactions in plants. *J. Cell. Biol.* 78:627-43.
- Albersheim, P. y col. 1981. Structure and function of complex carbohydrates active in regulating plant-microbe interactions. *Pure and Applied Chem.* 53: 79-88.
- Bell, A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 21-88.
- Cartwright, D. y G. E. Rusell. 1980. European and mediterranean cereal rusts conference, Bary, Italy (Abstracts).
- Cooksey, C. J. y col. 1983. Sucrose: a constitutive elicitor of phytoalexin synthesis. *Science*, 220: 1398-13400.
- Darvill, A. G. y P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infections in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 243-75.
- Hadwiger, L., A. Jafri y S. Broembsen. 1974. Mode of pisatin induction. *Plant Physiol.* 53: 52-60.
- Harborne, J., J. Ingham, L. King y M. Pyne. 1976. The isopentenyl isoflavone luteone as a preinfectious antifungal agent in genus *Lupinus*. *Phytochem.* 15: 1485-87.
- Ishiguri, Y. y col. 1978. Induction of rishitin-metabolizing activity in potato tuber tissue disk by wounding and identification of rishitin metabolites. *Phytopathol.* 68:720-25.
- Keen, N. T. 1975. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? *Science* 10: 74-75.
- Ossowoski, P. y col. 1983. Syntheses of a branched hepta —and an octasaccharide with phytoalexin— elicitor activity. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 22: 793-4.

- Paxton, J. D. 1981. Phytoalexins - a working redefinition. *Phytopathol. Z.* 101: 106-09.
- Rhatsmell, N. 1982. Active defense mechanisms of plants. (Wood, R. ed.) Plenum Press, New York, 39-45.
- Rusell, G. E. 1967. Report of the plant breeding institute, Cambridge, pp. 85-86.
- VanEtten, H. 1976. Antifungal activity of pterocarpan and other selected isoflavonoids. *Phytochem.* 15: 655-59.
- Ward, C. E., C. Unwin y A. Stoessl. 1974. Experimental control of late blight of tomatoes with capsidiol, the phytoalexin from peppers. *Phytopathol.* 65: 168-69.

IV CONGRESO LATINOAMERICANO DE BOTANICA

La Universidad de Antioquia, a través de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y el Departamento de Biología, invita a participar en el IV Congreso Latinoamericano de Botánica, a realizarse en la ciudad de Medellín entre el 29 de junio y 5 de julio del presente año. Se está distribuyendo la tercera circular (última). Quienes estén interesados en recibirla y obtener mayor información, favor dirigirse al profesor Enrique Rentería Arriaga (Secretario Ejecutivo - Comité Organizador), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia.