

ESTUDIO POR HPLC DE LA ACCIÓN DE DOS ELICITORES BIÓTICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CÉLULAS DE CLAVEL (*Dianthus caryophyllus* L.)

Blanca Ligia Higuera M^{*}.

En homenaje a Virginia Montes de Gómez

Recibido: Diciembre 3/99 – Aprobado: Diciembre 10/99

Keywords: carnation, elicitors, secondary metabolites, culture plant cells, *Dianthus caryophyllus* L., *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

RESUMEN

Como parte de la investigación que busca contribuir al estudio de los mecanismos de defensa que operan en la interacción clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) - *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, se evaluó la producción *in vitro* de metabolitos secundarios asociados con resistencia del clavel. Para ello se usaron cultivos de células en suspensión de variedades de clavel resistente (var. Candy) y susceptible (var. Rosana), elicitadas durante 3 y 15 días con dos elicitores bióticos, ácido fusárico y filtrado de medio de cultivo del hongo.

El control de los metabolitos producidos en estas condiciones se efectuó por RP-HPLC, estableciéndose que los extractos acetónicos obtenidos a partir de las células cultivadas *in vitro* contienen una cantidad mínima de metabolitos (máximo 5 picos en HPLC) si se comparan con los obtenidos a partir de raíces de plantas de clavel cultivadas en condicio-

nes naturales, en los que se detectaron como mínimo 30 componentes. Tampoco el extracto obtenido del medio extracelular mostró un perfil cromatográfico similar al de las raíces, aunque se encontró que éste contiene mayor número de componentes que las células. No se observó acción notable de los elicitores en el sentido de la producción de fitoalexinas o del aumento de los metabolitos preformados.

Los resultados indican que en las condiciones de cultivo y elicitación *in vitro* ensayadas no es posible obtener de forma masiva los metabolitos asociados con la resistencia del clavel al patógeno causante del marchitamiento vascular.

ABSTRACT

The *in vitro* production of secondary metabolites, probably related to carnation resistance mechanisms, was investigated using culture cells suspension of two carnation cultivars, resistant (Candy) and susceptible (Rosana) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, respectively. The cell cultures were elicited during three and fifteen days with two biotic elicitors, fusaric acid and *Fusarium* culture filtrate. The metabo-

* Departamento de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. A.A. 14490. E-mail: bhigue@ciencias.ciencias.unal.edu.co

lites were monitored by RP-HPLC and the results revealed that the acetonic extracts obtained from *in vitro* cells have a minimum amount of compounds (no more than five peaks in HPLC), in contrast with the natural root's acetonic extracts which showed at least thirty peaks.

Although in the extracellular liquid medium was detected a greater number of metabolites, neither this HPLC profile was similar to the observed for natural roots' extracts. The assayed elicitors didn't produce phytoalexins accumulation or significative increase of preformed metabolites. So, the results indicate that, with the experimental conditions reported here, is not possible to obtain the related with resistance compounds for this plant-pathogen model.

INTRODUCCIÓN

El uso de cultivos celulares provenientes de tejidos vegetales para la investigación de elementos de resistencia al ataque por patógenos, ha sido un instrumento importante ampliamente utilizado en diversos sentidos (1, 2, 3). Uno de ellos lo constituye el estudio de la producción de metabolitos secundarios asociados con la tolerancia a agentes fúngicos o al patógeno mismo. El estudio de la producción y/o de los cambios en dichos compuestos requiere metodologías de alta resolución que permitan su análisis a partir de extractos generalmente de gran complejidad.

A través de estudios *in vivo* usando segmentos de tallo se ha podido determinar que una parte de la resistencia del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) al hongo

Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi* se debe a la producción *de novo* de compuestos del tipo diantalexina y diantramidas, los cuales han mostrado tener propiedades fungitóxicas para este patógeno (4, 5, 6). En la raíz, primer punto de contacto de la planta con el hongo, se produce aumento en ciertos metabolitos preformados (7), que corresponden sin embargo a los minoritarios extraídos; por consiguiente, se presenta mucha dificultad y se requiere gran volumen de material vegetal para obtener cantidades adecuadas de éstos para el estudio de su estructura química.

En este trabajo se evaluó la posibilidad de obtener *in vitro* algunos de los metabolitos asociados con la resistencia del clavel, usando para ello cultivos celulares de clavel tratados con dos elicitors bióticos fungales, ácido fusárico y filtrado de medio de cultivo del hongo, y comparando por HPLC los metabolitos obtenidos por esta vía con los correspondientes a los producidos en las raíces de la planta, cultivada de manera natural.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Para la obtención de los cultivos celulares de clavel (células en suspensión) se utilizaron callos friables de las variedades comerciales Candy y Rosana, resistente y susceptible a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, respectivamente, suministrados por la empresa MG Consultores. Para la obtención *in vitro* de dichos callos se utilizaron como iniciadores explantes de hoja de clavel tomados del cuarto posterior de hojas jóvenes. El cultivo se llevó a cabo

usando el medio de Murashige y Skoog (MS), suplementado con hormonas: 2,4-D (1 ppm/litro) y BAP (0,1 ppm/litro) (8, 9), el cual fue renovado mensualmente. Los cultivos de células en suspensión fueron obtenidos tomando porciones de los callos friables así obtenidos (proporción aproximada 1 g callo/100 mL suspensión) las cuales fueron suspendidas en medio líquido preparado así: MS (4,4 g/L), sacarosa (30 g/L), 2,4-D (1 ppm/L) y ácido indolacético (0,1 ppm/L). La temperatura del cultivo se mantuvo en 26°C con agitación continua a 120 rpm. El medio de cultivo fue renovado por lo menos cada cuatro semanas y, finalmente, una semana antes de adicionar los elicitores. Las hormonas y el medio utilizado fueron marca Sigma.

Elicitación con elicitores bióticos

Para establecer la cantidad más apropiada de los elicitores que se iban a usar en el ensayo de inducción de metabolitos, se tomaron cultivos celulares de la variedad Candy en un punto óptimo de crecimiento (conteo aproximado 10^5 células/mL) y se repartieron en frascos esterilizados, de forma que en cada uno se tuvieron aproximadamente 10 mL de suspensión celular. A ocho frascos se adicionó el elicitor ácido fusárico 10 mM (ácido 5-butilpicolinico de *Gibberella fujikuroi*, Sigma) previamente microfiltrado a través de membrana con tamaño de poro de 0,22 μ . Se usaron las siguientes cantidades: 1, 10, 100 y 1.000 μ L, con sus correspondientes duplicados. A otros ocho se agregó el elicitor consistente en filtrado de medio de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* (microfiltrado a través de membrana de 0.22 μ) en las cantidades: 10, 100, 500 y 1.000 μ L, y

sus duplicados. Los frascos fueron de nuevo incubados a 26°C y 120 rpm. A los tres y a los seis días se realizó a cada uno de los frascos control de viabilidad de células y de aumento de su cantidad (medida como altura en el frasco, así como por su peso seco). La viabilidad se estimó a través del conteo del número de células viables observadas en una alícuota de cerca de 100 μ L de la suspensión celular, efectuando tinción con azul de trypano al 0,1% en NaCl 0,9%.

Para el ensayo de elicitación a mayor escala se usaron volúmenes de células en suspensión de ambas variedades de aproximadamente 200 mL a los que se adicionaron 2 mL de extracto del hongo y 0,2 mL de ácido fusárico 10mM, respectivamente, realizando duplicados de cada ensayo y manteniendo los cultivos según se indicó anteriormente.

Obtención de extractos para análisis por HPLC

A los 3 y 15 días después de la adición de los elicitores a los cultivos celulares que iban a ser usados para evaluación de metabolitos, éstos fueron retirados de incubación y centrifugados a 18.000 rpm (4°C) con el fin de separar las células del medio extracelular. Las primeras fueron liofilizadas, pesadas y sometidas a extracción con acetona, según protocolo establecido para obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces de clavel (7). Los medios extracelulares fueron sometidos a extracción líquido/líquido usando acetato de etilo en proporción 2:1. Después de tres extracciones sucesivas, los extractos fueron reunidos, secados con sulfato de sodio anhidro, evaporados a

baja temperatura ($< 30^{\circ}\text{C}$) y redisueltos en metanol para su análisis por HPLC.

Análisis de los extractos por HPLC

El análisis de los extractos obtenidos a partir de células y de medio extracelular fue realizado por HPLC usando un equipo Perkin Elmer serie 400, provisto de un sistema cuaternario de dosificación de solventes, un sistema de detección UV LC-95 ajustado a 275 nm y una estación de procesamiento de datos Perkin Elmer 3600. Se utilizó una columna Lichrospher RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany) de 250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$ y el sistema de elución compuesto por H_3PO_4 0,05% y metanol, aplicando gradiente de concentración creciente en metanol, según se describe en (7). Los solventes usados fueron grado HPLC (Merck).

Los extractos obtenidos a partir de raíces de plantas de clavel var. Candy, cultivadas de manera natural, fueron analizados empleando las mismas condiciones descritas anteriormente.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Determinación de la cantidad de los elicitores

Con base en los resultados mostrados en la tabla 1, se escogieron para los ensayos de elicitación de las células en los que se iba a determinar la inducción de metabolitos secundarios, las cantidades de $10 \mu\text{L}$ de ácido fusárico 10 mM y de $100 \mu\text{L}$ de filtrado de medio de cultivo del hongo, por cada 10 mL de suspensión celular. Con estas cantidades de elicitores se obtuvieron valores para los parámetros de control evaluados que en

promedio indican que las células no sufren mayor impacto en su viabilidad y en su multiplicación, con relación a cantidades mayores. Se buscó, además, que fuera una cantidad suficiente para tratar de garantizar la elicitación de las respuestas de defensa, por lo que tampoco fueron escogidas las mínimas ensayadas, a pesar de que para estos resultados no se encontró diferencia significativa.

Dada la dificultad que se presenta para reproducir condiciones idénticas en cada frasco de cultivo, estos parámetros fueron usados como indicadores para comparación, más que para caracterización. De éstos, el peso de las células fue tomado como especialmente representativo, por ser el que menos incertidumbre conlleva en su determinación. Este parámetro disminuyó significativamente ($p = 0,05$) cuando se usaron volúmenes de $1.000 \mu\text{L}$ de los elicitores evaluados, por lo que se presume un efecto nocivo para las células a estos niveles de elicitación. Este efecto también se manifiesta en la medida de la altura de las células que mostró valores considerablemente menores cuando se usaron estas cantidades de elicitores.

Se obtuvieron además variaciones similares en los valores de los parámetros de control a los seis días a partir de la adición de los elicitores (tabla 1). Adicionalmente, no hubo diferencia significativa entre los valores al comparar los dos tiempos, aunque a los seis días se detectó una notable disminución del peso de las células cuando se usó filtrado de medio de cultivo del hongo, en las cantidades de 500 y $1.000 \mu\text{L}$.

Tabla 1. Comparación del efecto de la adición de diferentes cantidades de los elicitores bióticos ácido fusárico y filtrado de medio de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, a una suspensión de células de clavel.

Parámetro de control del crecimiento celular	Cantidad de ácido fusárico 10 mM (μL)				Cantidad de filtrado del hongo (μL)			
	1	10	100	1000	10	100	500	1000
Cél.via* 3 dde	295	267	138	144	302	273	201	201
Peso cél [†] 3dde	112.2 a	95.9 a	96.3 a	76.6 b	134 a	134.7 a	122.8 b	92.5 b
Alt. cél [‡] 3 dde	1.9 a	1.9 a	1.6 a	1.4 b	2.9 a	2.3 a	2.2 a	2.0 b
Peso cel. 6 dde	121 a	111 a	93 a	87 b	113 a	127 a	81 b	73 b
Alt. cél. 6 dde	2.8 a	2.5 a	1.7 a	1.6 b	n.d.	2.6 a	2.2 b	2.2 b

* cél.via: Número de células viables determinadas por coloración con azul de trypano en una alícuota de 100 μL de la suspensión.

[†] peso en mg de células liofilizadas presentes en aproximadamente 10 mL de suspensión celular

[‡] altura en cm de las células contenidas en aproximadamente 10 mL de suspensión (frasco de 1,5 cm de diámetro)

dde: días después de la adición del elicitador.

Valores seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes entre líneas ($p = 0,05$).

Análisis de los extractos por HPLC

Los resultados de analizar por RP-HPLC los extractos de células de clavel y de medio extracelular, tratados con ácido fusárico y con filtrado de medio de cultivo del hongo, se resumen en la figura 1, en la que se expresan como número de picos obtenidos. Como puede verse, el número de metabolitos secundarios detectados en células de clavel obtenidas por cultivo *in vitro* (máximo 5 picos en el cromatograma) y en los correspondientes medios extracelulares, es muy inferior al que se encuentra en las raíces de plantas de clavel cultivadas en condiciones naturales (cerca de 30 componentes separados, figuras 1 y 2), tanto en la variedad resistente como en la susceptible. En general, los perfiles cromatográficos obtenidos para los extractos de material *in vi-*

tro fueron muy diferentes de los correspondientes al material *in vivo* (figura 2), a pesar de que se usaron idénticas condiciones de extracción y análisis. Esta notable diferencia indica que con las condiciones de cultivo *in vitro* usadas no es posible reproducir de manera satisfactoria la actividad metabólica que se presenta en las raíces de plantas de clavel, no siendo entonces esta metodología una fuente potencial para la obtención de cantidades masivas de los metabolitos asociados con resistencia. Aunque son numerosos los estudios que se han conducido con éxito usando cultivos de células en suspensión de plantas (10,11) es un hecho también conocido que la producción de los compuestos deseados es usualmente muy compleja, y que para cada modelo de interacción existen condiciones específicas que deben ser cuidado-

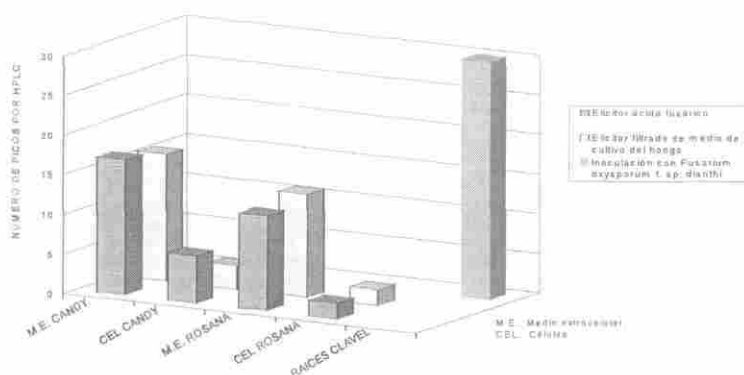


Figura 1. Metabolitos secundarios producidos por cultivo *in vitro* de células de clavel de variedades resistente (Candy) y susceptible (Rosana), tratadas por tres días con dos elicitores bióticos, determinados por RP-HPLC tanto en las células como en el medio extracelular.

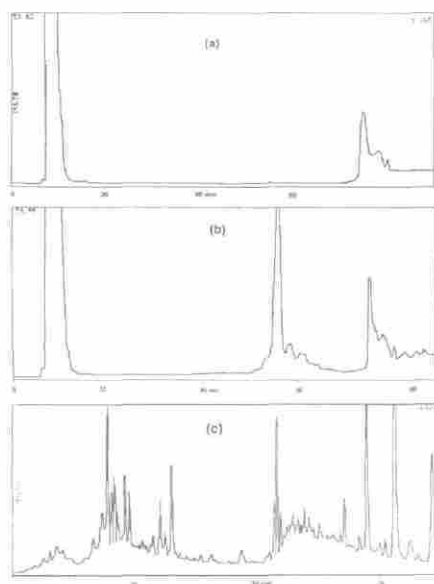


Figura 2. Comparación de los perfiles cromatográficos (HPLC) de extractos de: (a) células; (b) medio extracelular, provenientes de cultivo *in vitro* de clavel var. Candy (resistente) elicitado con filtrado de medio de cultivo del hongo; (c) raíces de clavel de plantas cultivadas de manera natural, inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi, raza 2.

samente investigadas y seleccionadas (12). Es el caso, por ejemplo, de la inducción de fitoalexinas que fue lograda al usar líneas celulares obtenidas a partir de flores de clavel, en contraste con lo obtenido a partir de líneas celulares de nodos de clavel, para las que no se produjo ninguna inducción, aunque se usaron idénticas condiciones de cultivo (13).

Se determinó además que la cantidad de metabolitos secundarios producidos *in vitro* es notablemente mayor en el medio extracelular con relación a los producidos en las células para el caso de las dos variedades (figuras 1 y 2). Esto concuerda con lo obtenido en investigaciones similares (13), en las que se reporta la inducción de la acumulación de fitoalexinas del tipo diantramidas únicamente en el medio extracelular y no en las células, al usar cultivos celulares obtenidos a partir de flores y elicitados con extractos de paredes celulares de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. Como puede verse en la figura 1, los resulta-

mayor efecto el ácido fusárico. Sin embargo, cabe reiterar que en las células fue muy bajo el número de metabolitos detectados. Además, con ninguno de los dos elicitores usados se observó acumulación *de novo* de compuestos con absorción al UV; es decir, no se indujo la acumulación de fitoalexinas del tipo de las que han sido reportadas para este modelo (4-6).

Dada la escasa producción de metabolitos secundarios encontrada a los tres días de elicitación, se analizaron también muestras de cultivos celulares de var. Rosana que permanecieron durante 15 días bajo la acción de los elicitores. En vista de que no se encontró diferencia apreciable entre los resultados obtenidos por HPLC, y que, al contrario de lo esperado, se observó una disminución notable del peso de extracto (tabla 2), lo que podría indicar una disminución en la actividad metabólica por posible toxicidad en las células, éstos no se presentan aquí.

Tabla 2. Comparación de los pesos de extractos obtenidos por extracción de células de clavel var. Rosana (susceptible) cultivadas *in vitro* y del medio extracelular, después de la adición de dos elicitores bióticos

Peso* de extracto obtenido (mg/g células o mL medio extracelular)	Elicitación con ácido fusárico		Elicitación con filtrado de medio de cultivo del hongo		Blanco
	3 dde	15 dde	3dde	15 dde	15 dde
Medio extracelular	0,30	0,26	0,31	0,12	0,19
Células	21,60	12,40	21,90	15,60	31,20

dde = días después de la adición de los elicitores

*: resultados promedio de dos determinaciones

dos obtenidos con los dos elicitores evaluados son muy similares, observándose sólo alguna diferencia notable para el caso de las células de Candy, variedad en la que parece tener

Los resultados de la presente investigación indican que es necesario profundizar en la búsqueda de condiciones de cultivo *in vitro*, así como de los elicitores

adecuados para este modelo planta-patógeno, que permitan la obtención de cantidades adecuadas de los compuestos presentes en las raíces y que, según los estudios realizados *in vivo* (7), mostraron relación con la respuesta de resistencia del clavel al patógeno causante del marchitamiento vascular.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación contó con el apoyo de Colciencias, de la empresa M.G. Consultores que colaboró con el suministro de parte del material vegetal, y del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ingran, D., Mac Donald, M. V. (1986). *In vitro* selection of mutants. In: Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement. *Proc. Int. Symp. IAEA*. Viena, 1985, pp. 241-258.
2. Buiatti, M., Scala, A. (1984). *In vitro* analysis of plant-pathogen interaction and selection procedures. *Proc. Int. Symp. Plant Tissue and Cell Cult. Application to Crop. Improvement*. Olomouc (Czechoslovakia), pp. 331-340.
3. Scala, A., Bettini, P., Buiatti, M., Pellegrini, G., Tagnoni, F. (1985). Tomato-*Fusarium oxysporum* interaction: *in vitro* analysis of several possible pathogenic factors. *Phytopath. Z.* 113, 90-94.
4. Baayen, R. P., Niemann, G. J. (1989). Correlations between accumulation of dianthramides, dianthalexin and unknown compounds, and partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in eleven carnation cultivars. *J. of Phytopath.* 126, 281-292.
5. Niemann, G. J., Van der Bij, A., Brandt-de Boer, B., Boon, J. J., Baayen, R. P. (1991). Differential response of four carnation cultivars to races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and to *Phialophora cinerescens*. *Physiol. and Mol. Pl. Path.* 38, 117-136.
6. Niemann, G. J., Liem, J., Van der Kerk, A., Niessen, W. M. A. (1992). Phytoalexins, benzoxazinones, N-aroylanthranilates and N-aroylanilines, from *Fusarium*-infected carnation stems. *Phytochemistry*. 31 (11) 3761-3767.
7. Higuera, B. L., Montes de G., V. (1996). Contribution of HPLC to the study of the defense mechanisms acting in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) roots on infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *J. of High Resolution Chromatography*. 19, 706-708.
8. Filgueira, J. J. (1995). El xiloglucano y sus oligosacáridos como parámetros de resistencia en la interacción huésped-parásito. Tesis de grado Magister Scientiae, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia: Santafé de Bogotá.
9. Filgueira, J. J., Guardiola, M., Montes de G., V. (1999). The xyloglucan and their oligosaccharides on the interaction carnation-*Fusarium*. *Acta Horticulturae*. 482, 175-177.

10. Buiatti, M., Scala, A., Bettini, P., Nascari, G., Morpurgo, R., Bogani, P., Pellegrini, G., Gimelli, F., Venturo, R. (1985). Correlations between *in vivo* resistance to *Fusarium* and *in vitro* response to fungal elicitors and toxic substances in carnation. *Theor. Appl. Genetics*. 70, 42-47.
11. Daub, M. E. (1986). Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 159-186.
12. Schripsema, J., Verpoorte, R. (1995). Novel techniques for growth characterization and phytochemical analysis of plant cell suspension cultures. *J. of Nat. Prod.* 58 (9) 1305-1314.
13. Reinhard, K., Matern, U. (1989). The biosynthesis of phytoalexins in *Dianthus caryophyllus* L. cell cultures: induction of benzoyl-CoA: anthranilate N-Benzoyl transferase activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 275 (1) 295-301.