

## Estudios preliminares sobre compuestos antioxidantes en materiales clonales del Programa de Mejoramiento Genético de Sauce del INTA

PAGANO N.<sup>1</sup>; CERRILLO T.<sup>2</sup>; LEICACH S.<sup>1</sup>; CHLUDIL H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Química de Biomoléculas. Facultad de Agronomía. UBA. Av. San Martín 4453 (DSE1417) CABA. npagano@agro.uba.ar

<sup>2</sup> Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná – INTA

### Resumen

En la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Delta del Paraná se desarrolla un programa de mejoramiento clásico de sauces, en el marco del Proyecto Nacional PNFOR-1104062 y del Programa de Domesticación y Mejoramiento de Especies Forestales Nativas e Introducidas para Usos de Alto Valor (PROMEF). El objetivo es generar materiales clonales con ventajas productivas y de adaptabilidad. En el corriente año, seis nuevos clones mejorados fueron inscriptos en el Registro Nacional de Cultivares del INASE: `Agronales INTA-CIEF`, `Los Arroyos INTA-CIEF`, `Géminis INTA-CIEF`, `Lezama INTA-CIEF`, `Ibicuy INTA-CIEF` y `Yaguareté INTA-CIEF`. Desde hace unos años, docentes investigadores de la Facultad de Agronomía de la UBA colaboran a través de un trabajo interdisciplinario con el Programa, analizando el material clonal a fin de evaluar características químicas que contribuyan a explicar los mecanismos implicados en ciertos comportamientos frente a situaciones de estrés biótico y abiótico, a los cuales naturalmente se ven sometidos. Las investigaciones se realizan en el marco de los proyectos UBACyT (2012-2015) 20020110200266 y UBACyT (2011-2014) 20020100100229. El presente trabajo comprende un análisis preliminar de los compuestos antioxidantes presentes en individuos de *Salix* spp. Los derivados fenólicos son metabolitos secundarios de amplia distribución en las plantas superiores, y particularmente los sauces se caracterizan por la presencia de glicósidos fenólicos y salicilatos los cuales constituyen una verdadera barrera de defensa y resistencia a adversidades. En esta primera etapa exploratoria se trabajó con clones de las especies *Salix nigra*, *S. alba*, *S. humboldtiana*, *S. viminalis* y *S. matsudana*, de los cuales se tomaron tres repeticiones y se analizaron, mediante métodos espectrofotométricos, su capacidad antioxidante (CA) y el contenido de fenoles totales (FT) expresados como  $\mu$ moles equivalentes de ácido ascórbico y  $\mu$ moles equivalentes de ácido clorogénico /g de hojas frescas, respectivamente. Los resultados de este trabajo exploratorio muestran que los clones recientemente registrados poseen diferencias contrastantes en cuanto a contenidos de CA y FT. Los valores de CA, en orden decreciente, corresponden a: Lezama > Yaguareté, Géminis > Ibicuy, Agronales y Los Arroyos. Respecto al contenido de FT, se observa el mismo orden decreciente presentando Lezama un valor de 186  $\mu$ moles eq. ác. clorogénico /g de hojas frescas. Mediante HPLC-C18 se compararon los perfiles cromatográficos entre clones de una misma especie y especies diferentes observándose importantes variaciones entre los materiales. Estas observaciones preliminares aportan conocimientos que podrían ayudar a comprender aspectos de la susceptibilidad de los clones a las adversidades y los mecanismos implicados.

**Palabras clave:** *Salix*, Mejoramiento, compuestos antioxidantes.

### Introducción

La producción forestal constituye a nivel mundial una actividad importante desde el punto de vista social, económico y ambiental. En Argentina existen más de 1 millón de ha plantadas, mayoritariamente con esencias forestales de crecimiento rápido como *Pinus*, *Eucalyptus* y

*Salicaceas*. Estas últimas están particularmente presentes en zonas como el Delta del Paraná, el mayor humedal con que cuenta el país teniendo en cuenta sus 17.500 km<sup>2</sup> de superficie.

El sistema de producción predominante en el Delta es la forestación con *Salicáceas* donde existen aproximadamente unas 80.000 hectáreas plantadas, de las cuales el 80% corresponde a plantaciones de sauce y el resto a plantaciones de álamo. De las mismas, se estima que unas 60.000 hectáreas (75%) se encuentran bajo manejo.

En general, como en otros forestales, las plagas presentes en álamos y sauces tienen un comportamiento errático en el tiempo. Durante algunas temporadas las poblaciones se mantienen por debajo de su umbral de daño económico y bajo determinadas circunstancias sus poblaciones aumentan hasta producir daños que afectan el normal desarrollo de las plantas y la economía regional.

En la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Delta del Paraná del INTA se desarrolla un programa de mejoramiento clásico de sauces, en el marco del Proyecto Nacional PNFOR-1104062 y del Programa de Domesticación y Mejoramiento de Especies Forestales Nativas e Introducidas para Usos de Alto Valor (PROMEF). El objetivo es generar materiales clonales mejorados en los aspectos productivos y de adaptabilidad. Como resultado de ello, en 2013 se seleccionaron seis clones, cuya inscripción fue aprobada en el Registro Nacional de Cultivares del INASE como: `Agronales INTA-CIEF`, `Los Arroyos INTA-CIEF`, `Géminis INTA-CIEF`, `Lezama INTA-CIEF`, `Ibicuy INTA-CIEF` y `Yaguareté INTA-CIEF` (Resol. N° 00080/2013) (Cerrillo et al. 2013).

Desde hace unos años, docentes investigadores de la Facultad de Agronomía de la UBA colaboran a través de un trabajo interdisciplinario con el Programa, analizando el material clonal a fin de evaluar características químicas que contribuyan a explicar los mecanismos implicados en ciertos comportamientos frente a situaciones de estrés biótico y abiótico, a los cuales naturalmente se ven sometidos (Braccini et al. 2013). Las investigaciones se realizan en el marco de los proyectos UBACyT (2012-2015) 20020110200266 y UBACyT (2011-2014) 20020100100229.

Las plantas se caracterizan por la presencia de metabolitos secundarios, sustancias químicas de estructura variada que cumplen diversas funciones en el vegetal, articulando su relación con el entorno.

Los derivados fenólicos son un grupo particular de metabolitos de amplia distribución en las plantas superiores, los cuales incluyen ácidos fenólicos libres, flavonoides, y estructuras poliméricas como los taninos, entre otros. Particularmente los sauces se caracterizan por la presencia de glicósidos fenólicos y salicilatos los cuales constituyen una verdadera barrera de defensa y resistencia a adversidades al actuar como disuasivos de la alimentación o en algunos casos como moléculas de señalización durante procesos de oviposición (Braccini et al. 2013).

Entre los salicilatos más abundantes identificados en sauce se encuentran salicina, fragilina, salicortina y tremuloidina, cuya proporción varía según la especie, híbridos e inclusive clones (Boeckler et al. 2011). Otros glicósidos fenólicos de importancia son los flavonoides. Derivados de quercetina, kaemferol, miricetina y luteolina son los más abundantes, los cuales poseen cadenas oligosacarídicas de una, dos o tres unidades de monosacáridos entre los que predominan glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa y ácido glucurónico (Tegelberg et al. 2003).

El presente trabajo comprende un análisis preliminar de los compuestos antioxidantes presentes en individuos de *Salix* spp. con el objetivo de explorar las posibles variaciones a nivel de especies y clones y contar con nueva información que posibilite mejorar la interpretación de

los mecanismos implicados en el comportamiento de los mismos frente a las adversidades bióticas y abióticas.

## **Metodología**

### Material vegetal estudiado:

En esta primera etapa exploratoria se analizaron entre 2 y 5 clones de las especies *Salix nigra*, *S. alba*, *S. humboldtiana* y *S. viminalis* y *S. matsudana*. Entre estos genotipos, se incluyeron además los nuevos clones mejorados recientemente inscriptos en INASE `Agronales INTA-CIEF`, `Los Arroyos INTA-CIEF`, `Géminis INTA-CIEF`, `Lezama INTA-CIEF`, `Ibicuy INTA-CIEF` y `Yaguareté INTA-CIEF` (Cerrillo et al. 2013).

### Muestreo de hojas del material clonal:

En el mes de febrero de 2013 se tomaron muestras de plantas que integran los estaqueros experimentales de sauce del Programa de Mejoramiento llevado a cabo en la EEA Delta del Paraná del INTA. Se tomaron hojas del tercio superior de ramas de 6 meses de crecimiento, correspondientes a cada uno de los individuos o genotipos estudiados. El muestreo consistió en tomar 20 hojas al azar de un número de plantas de entre 5 y 10 por cada genotipo.

### Acondicionamiento del material

El material vegetal se dispuso en bolsas "Ziploc", se rotuló con las identificaciones de cada individuo o genotipo y se llevó a laboratorio, donde fue conservado freezeado hasta su posterior análisis.

### Preparación del extracto

El material vegetal se repartió en muestras al azar (tres repeticiones) y cada una fue extraída con una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se particionó con cloroformo.

### Métodos de análisis aplicados en laboratorio

De cada muestra se analizaron, mediante métodos espectrofotométricos, la capacidad antioxidante (CA) y el contenido de fenoles totales (FT) expresados como  $\mu$ moles equivalentes/g de hojas frescas de ácido ascórbico y ácido clorogénico, respectivamente.

### Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos fue evaluada mediante el ensayo de captación del radical libre DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl siguiendo la técnica descrita por Brand-Williams et al. (1995) y modificaciones. La disminución de la absorbancia respecto del blanco (Sol. 10<sup>-4</sup> M DPPH) fue leída a  $\lambda$  517 nm luego de 30 minutos de reacción.

### Determinación del contenido de fenoles totales

La concentración de fenoles totales de cada extracto fue analizada mediante el método Folin-Ciocalteu según la técnica descrita por Singleton et al. (1999) y modificaciones. La absorbancia fue leída a  $\lambda$  725 nm y comparada con el tubo blanco luego de 1 hora de reacción.

### Análisis por HPLC

El análisis de los perfiles cromatográficos se realizó por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase reversa utilizando un equipo Agilent 1200 con un detector UV de longitud de onda múltiple. La fase móvil utilizada consistió en un gradiente de Acetonitrilo (ACN), y agua (H<sub>2</sub>O miliQ) acidulada al 1% con ácido acético. Para la identificación de rutina y salicina se utilizaron patrones comerciales.

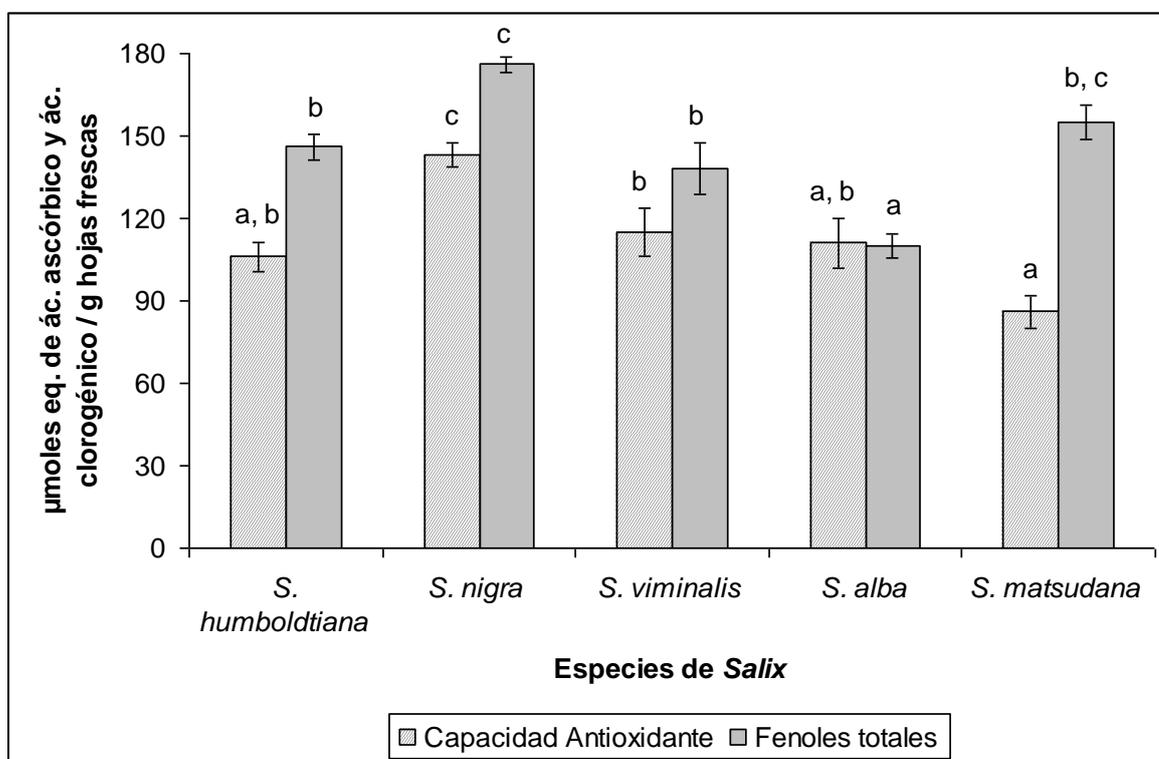
### Análisis estadístico

Los resultados químicos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando Infostat como software estadístico. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante el Test de Tukey con un nivel de significación de 0,05.

### Resultados y Discusión

Los clones de las cinco especies estudiadas presentan valores de fenoles totales con una media entre 110 y 176  $\mu$ moles equivalentes de ácido clorogénico/gramo de hoja fresca, los cuales se corresponden con los informados en la literatura (Julkunen-Tiitto, R. 1986; Julkunen-Tiitto, R. 1989). El mayor contenido se observa en *Salix nigra* y *Salix matsudana* con 176 y 155  $\mu$ moles/g, respectivamente; mientras que *Salix alba* presenta el menor valor (110  $\mu$ moles/g) (figura 1).

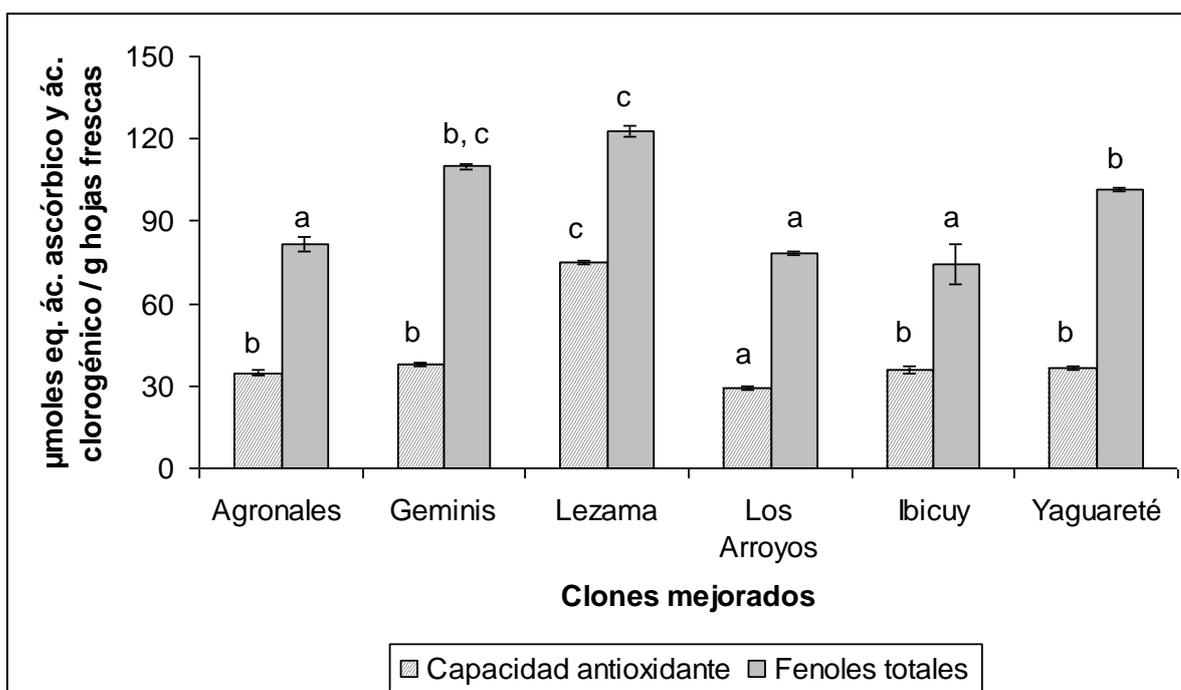
Si analizamos los resultados obtenidos para capacidad antioxidante, *Salix nigra* (143  $\mu$ moles/g) sigue presentando el mayor valor, seguido por *Salix viminalis*, *S. alba*, *S. humboldtiana* y por último *Salix matsudana* (86  $\mu$ moles/g) (figura 1).



**Figura 1.** Capacidad antioxidante y fenoles totales de las distintas especies analizadas expresados como valores medios y sus errores estándar en  $\mu$ moles equivalentes de ácido ascórbico y ácido clorogénico por gramo de hojas frescas, respectivamente. Para cada variable, las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas (Test de Tukey,  $p < 0.05$ ).

Los clones recientemente registrados poseen diferencias contrastantes en cuanto a contenidos de CA y FT.

Los valores de CA, en orden decreciente, corresponden a: Lezama > Yaguareté, Geminis, Ibicuy, Agronales y por último Los Arroyos observándose la misma tendencia para FT (figura 2).



**Figura 2.** Capacidad antioxidante y fenoles totales de los distintos clones mejorados expresados como valores medios y sus errores estándar en  $\mu$ moles equivalentes de ácido ascórbico y ácido clorogénico por gramo de hojas frescas, respectivamente. Para cada variable, las letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas (Test de Tukey,  $p < 0.05$ ).

Mediante HPLC-C18 se compararon los perfiles cromatográficos entre clones de una misma especie y especies diferentes observándose importantes variaciones entre los materiales.

Los cromatogramas de los extractos polares de los clones correspondientes a *S. humboldtiana* y *S. nigra* mostraron perfiles simples con bajo número de componentes. A diferencia de los restantes el clon *S. nigra* 6 presentó mayor proporción de componentes de menor polaridad. *S. viminalis* y *S. alba* presentaron perfiles cromatográficos complejos.

Los clones de *Salix nigra* y *Salix humboldtiana* presentaron una mayor proporción de salicina y rutina respecto de *Salix viminalis* y *Salix alba*. Sin embargo, Lezama y Yaguareté presentaron la mayor proporción de rutina, superior aún a *Salix nigra* y *Salix humboldtiana*.

### Consideraciones finales

Estas observaciones preliminares sobre la presencia de compuestos antioxidantes aportan conocimientos que podrían ayudar a comprender aspectos de la susceptibilidad de los clones a las adversidades y los mecanismos implicados. Relacionar la presencia de metabolitos secundarios con reconocida actividad biológica (glicósidos de flavonoides y salicilatos) y las características de los clones podrían ser de utilidad en el análisis de las interacciones sauce-entorno.

### Bibliografía

Boeckler, G., Gershenzon, J., Unsicker, S., 2011. Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry*. 72, 1497-1509.

Braccini, C., Vega, A., Chludil, H., Leicach, S., Fernandez, P., 2013. Host selection, oviposition behaviour and leaf traits in a specialist willow sawfly on species of *Salix* (Salicaceae). *Ecological Entomology* 38(6), 617-626.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., and Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28, 25–30.

Cerrillo, T., Monteverde, M. S., y Ortiz. S., 2013. Nuevos clones mejorados de sauce (*Salix* spp). IV Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano.- AFoA-INTA-FAO. Iguazú, Argentina, sept 2013.

Julkunen-Tiitto, R., 1986. A chemotaxonomic survey of phenolics in leaves of northern Salicaceae species. *Phytochemistry*. Vol. 25, No. 3, pp. 663-667.

Julkunen-Tiitto, R., 1989. Phenolic constituents of *Salix*: A chemotaxonomic survey of further finnish species. *Phytochemistry*. Vol. 28, No. 8, pp. 2115-2125.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants Pt A*, 299, 152-178.

Tegelberg, R., Veteli, T., Aphalo P., Julkunen-Tiitto, R., 2003. Clonal differences in growth and phenolics of willows exposed to elevated ultraviolet-B radiation. *Basic and Applied Ecology* 4, 219-228.