

LA METABOLÓMICA COMO HERRAMIENTA PARA LA EVALUACIÓN FISIOLÓGICA Y NUTRICIONAL EN CITRICULTURA

Ecofisiología i Biotecnologia.
Departament de Ciències Agràries i
del Medi Natural, Universitat Jaume I.
Campus Riu Sec.
12071 Castelló de la Plana. España

*e-mail: aurelio.gomez@camn.uji.es

INTRODUCCIÓN

La metabolómica es una disciplina de reciente desarrollo en la que se persigue abordar el estudio no sesgado de todos los metabolitos presentes en un tejido, órgano u organismo particular en un momento del desarrollo concreto o bajo unas condiciones ambientales particulares, permitiendo de esta forma evaluar la contribución de los factores genéticos y/o ambientales a la modificación del metabolismo (Fiehn, 2001). En este sentido, la composición metabólica de una planta entera o de un tejido concreto está directamente vinculada a cambios en la expresión génica (cambios en la composición de mRNA) y la síntesis de proteínas. Por tanto, queda claro que los metabolitos son en muchos casos el producto final de la expresión génica y constituyen el verdadero fenotipo de un individuo (Arbona y cols., 2013).

El metabolismo vegetal se puede dividir en metabolismo primario, que incluye moléculas esenciales tales como azúcares, aminoácidos o lípidos comunes en todas las plantas; y metabolismo secundario, que comprende moléculas minoritarias pero con una gran importancia en aspectos de defensa y adaptación a cam-

Resumen

La metabolómica tiene como objetivo el análisis de todos los metabolitos de bajo peso molecular presentes en un organismo, tejido o tipo celular concreto en un estadio de desarrollo dado y bajo unas condiciones ambientales particulares, proporcionando así una descripción detallada del fenotipo bioquímico. En este trabajo se analizaron, mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplada a espectrometría de masas (RPLC/ESI-QTOF-MS) los perfiles de metabolitos secundarios de tres patrones de cítricos: citrange Carrizo, citrumelo CPB4475 y mandarina Cleopatra cultivados en condiciones óptimas en tres localizaciones distintas. Los metabolitos se emplearon como marcadores para clasificar las muestras atendiendo al genotipo y a la localización mediante análisis clúster jerárquico (HCA) seguido de análisis discriminante basado en mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), que permite la identificación de las variables importantes en dicha clasificación. Este análisis reveló una influencia importante del genotipo incluso por encima del ambiente, aunque éste también influyó en la composición metabólica de forma significativa. En conclusión, esta tecnología puede ser empleada para investigar variaciones sutiles en el metabolismo debidas a alteraciones genéticas o cambios en el ambiente, a modo de técnica de evaluación fisiológica.

bios ambientales; en este grupo se incluyen polifenoles, algunos terpenoides, alcaloides, etc., algunos con funciones como atrayentes de polinizadores o repelentes de plagas, antioxidantes, pesticidas naturales o incluso moléculas señalizadoras (Edreva y cols., 2008). En este segundo grupo se incluirían los principios activos de algunos medicamentos como por ejemplo el taxol, el ácido salicílico (componente de la aspirina en su forma acetilada), el resveratrol y otros muchos, que son específicos de algunas especies vegetales y, por tanto, podrían ser empleados como marcadores de carácter taxonómico (Merchant y cols., 2006).

La mayoría de los metabolitos secundarios poseen estructuras químicas que les otorgan un carácter semipolar ligeramente hidrofóbico;

por ello, para abordar su análisis la técnica preferida es la cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) mucho menos laboriosa desde el punto de vista técnico que la cromatografía de gases (GC). Para llevar a cabo este análisis de forma no dirigida y no sesgada se hace necesario el acople instrumental de RPLC con espectrometría de masas de tiempo de vuelo (QTOF-MS), ya que proporciona información molecular útil en la elucidación de estructuras e identificación de compuestos (Arbona, y cols., 2009). Además, con el objetivo de automatizar este proceso, el análisis instrumental se acopla a un procesado bioinformático de los cromatogramas. El objetivo final es poder analizar el mayor número de muestras posible, sin sesgo alguno y obteniendo la mayor cantidad de información posible (Arbona y cols., 2013). A partir de estos mismos resultados, se

puede abordar una clasificación de los individuos incluidos en el estudio (huella metabolómica), se puede analizar la composición metabólica particular de un genotipo (perfilado de metabolitos) o se puede analizar diferencias (metabonomía) en respuesta a un tratamiento o condición particulares (Dixon y cols., 2006). Cada tipo de estudio emplea unas herramientas estadísticas particulares, dependiendo del objetivo que se persigue.

Posteriormente, para la identificación de metabolitos se hace necesario un estudio en detalle de los espectros de masas generados para cada compuesto, seguido de la anotación de los distintos iones y la propuesta de identidades (ver diagrama de flujo del procedimiento en la Figura 1).

En el presente estudio, se emplearon plántulas de tres patrones: citrange Carrizo, citrumelo CPB4475 y mandarina Cleopatra, cultivadas en condiciones óptimas en distintas localizaciones. Con el objetivo de estudiar si existían diferencias en la composición de metabolitos entre estos tres genotipos y el efecto de la localización geográfica, se analizaron los perfiles metabolómicos del tejido foliar empleando RPLC/ESI-QTOF-MS y con los resultados se abordó una clasificación de tipo clúster jerárquico (HCA) sin atender a la composición específica de metabolitos, seguida de un análisis de tipo PLS-DA. A continuación, se identificaron algunos de los metabolitos responsables de estas diferencias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Plántulas de un año de edad de los genotipos citrange Carrizo, citrumelo CPB4475 y mandarina Cleopatra procedentes de un vivero autorizado (Beniplant S.L.) se trasplantaron a macetas de plástico (2,5 L) un mes antes del comienzo de los expe-

rimentos utilizando una mezcla de perlita, vermiculita y turba en proporción 10:10:80. Las plantas se cultivaron en invernadero en condiciones de $25 \pm 3,0$ °C temperatura diurna; $18 \pm 2,0$ °C temperatura nocturna y se regaron tres veces por semana con 0,5 L de una solución de Hoagland modificada para cítricos. En diferentes fechas, se recolectaron hojas en posición intermedia de los tres genotipos, se limpiaron superficialmente con agua desionizada y jabón y tras enjuagarlas y eliminar los restos de agua, se congelaron en nitrógeno líquido. El material vegetal congelado se pulverizó hasta conseguir un polvo homogéneo que se almacenó a -80 °C hasta su extracción y análisis.

Extracción y análisis instrumental

El tejido pulverizado (0,5 g) se extrajo en 5 mL de una mezcla de metanol y agua en proporción 80:20 empleando un dispersador (Ultra-Turrax, IKA-Werke, Staufen, Alemania). Tras una centrifugación para eliminar los residuos de tejido, el sobrenadante se evaporó en vacío y se reconstituyó en metanol al 40%. Esta solución se pasó a través de un cartucho de C18 y se recogió el eluato (fase polar) y la fase retenida se eluyó posteriormente con 2 mL de metanol (fase apolar). Las dos fases se evaporaron hasta sequedad en el speed-vac y, de forma previa al análisis, se reconstituyeron en metanol 10% o 50%, respectivamente.

El análisis instrumental se llevó a cabo mediante RPLC empleando un cromatógrafo Waters Alliance 2690 (Waters Corp., Milford, MA, EEUU) acoplado en línea con un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF I, Micromass Ltd., Manchester, Reino Unido). Para la separación cromatográfica, se empleó un gradiente de metanol y agua suplementada con ácido acético al 0,01%. La separación se llevó a cabo mediante una columna de C18.

Procesado y análisis bioinformático

Los archivos procedentes del espectrómetro de masas se convierten a modo centroide para facilitar su procesado bioinformático, para ello se emplea como referencia un compuesto que es infundido continuamente en el equipo durante los análisis. Los archivos convertidos se procesan con el software XCMS que permite la captura automatizada de picos cromatográficos (Smith y cols. 2006). Los resultados obtenidos se emplearon para abordar una clasificación por HCA y posteriormente un análisis de diferencias mediante PLS-DA. La identificación de compuestos se llevó a cabo mediante análisis de los espectros de masas para cada compuesto y comparación con la bibliografía disponible.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis instrumental, los cromatogramas se procesaron con el software XCMS para extraer los picos cromatográficos. Este proceso, genera una lista de picos con su correspondiente relación masa/carga (m/z), tiempo de retención y área. Posteriormente, estos datos se pueden emplear como variables para abordar otros tipos de análisis. En este estudio, se optó por aplicar un análisis de tipo PLS-DA que, partiendo de una clasificación previa, ejecuta un análisis de correlación que permite descubrir qué variables son importantes en la determinación de dicha clasificación. Para ello, los individuos (distintas réplicas de muestras extraídas de material foliar de Carrizo, citrumelo y Cleopatra) se agruparon atendiendo en un primer lugar al genotipo de origen y posteriormente al sitio de cultivo (Figura 2). En ambos casos los perfiles metabolómicos permitieron la discriminación de los distintos grupos indicando que, si bien hay diferencias entre distintos genotipos de cítricos, también el ambiente influye en el metabolismo. En la clasificación por

genotipos, Carrizo y Cleopatra se resolvieron bien a lo largo del eje de abscisas con un porcentaje de variabilidad explicada del 11,9% (bajo, aunque aceptable considerando que son genotipos que están muy emparentados). A lo largo del eje de ordenadas (19,7% de variabilidad explicada) se resolvió citrumelo, éste muy próximo a Carrizo probablemente por el hecho de que son híbridos que comparten uno de los parentales. Posteriormente, y empleando como elemento de clasificación el lugar de cultivo se proporcionó al algoritmo del PLS-DA las tres localizaciones de procedencia del material (Figura 2). De nuevo, los perfilados permitieron distinguir la procedencia del material vegetal aún sin especificar el genotipo. La clasificación realizada empleando los mismos datos sugiere que, aunque el ambiente tiene una influencia importante sobre la composición del metabolismo secundario, sigue habiendo una fuerte componente genética que la determina (Figura 3). Por el contrario, en estudios anteriores, la composición del metabolismo primario no resultó ser tan determinante y no permitió una clasificación tan precisa de los genotipos (Arbona y cols., 2009). Estos resultados son coherentes con el hecho de que el metabolismo secundario es característico de familias, especies e incluso géneros (Merchant y cols., 2006).

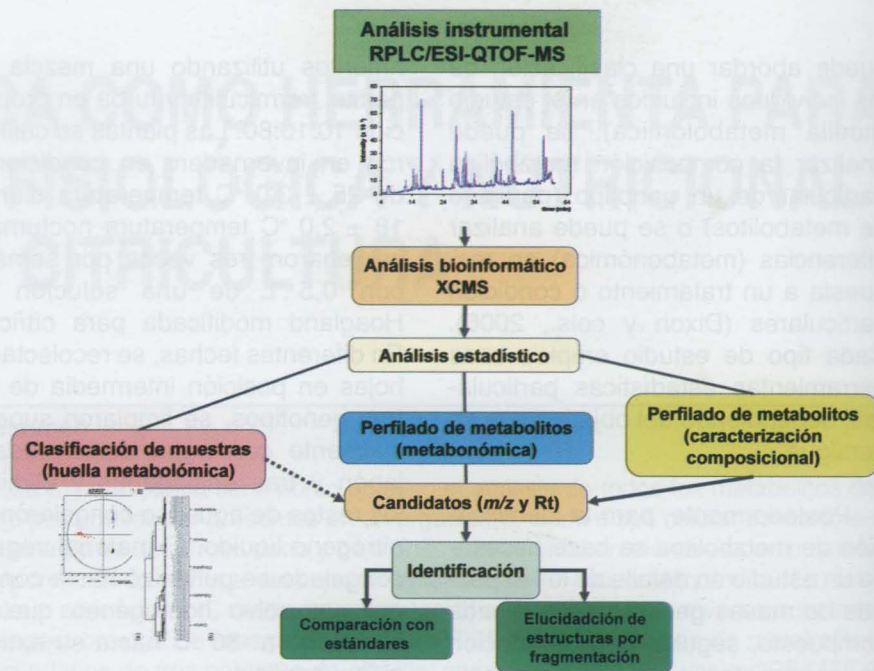


Figura 1. Esquema del desarrollo de un protocolo de análisis metabolómico incluyendo las distintas vías que se pueden seguir para abordar el análisis de los resultados.

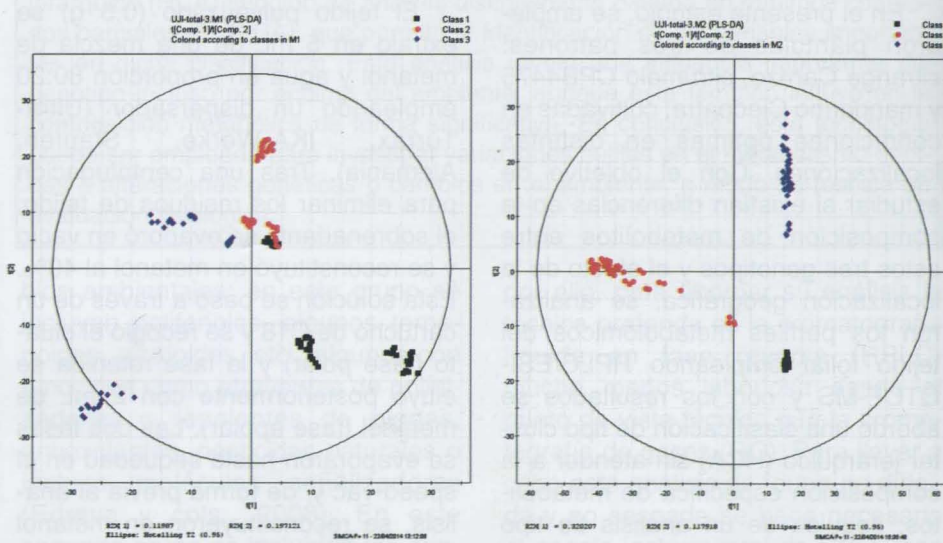


Figura 2. Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) generado a partir de los perfilados metabolómicos de los tres genotipos estudiados Carrizo (■), Cleopatra (◆) y citrumelo (●), sin diferenciar ubicaciones geográficas (izquierda) y diferenciando las distintas localizaciones: localización 1 (■), localización 2 (●) y localización 3 (◆), sin considerar genotipos (derecha).

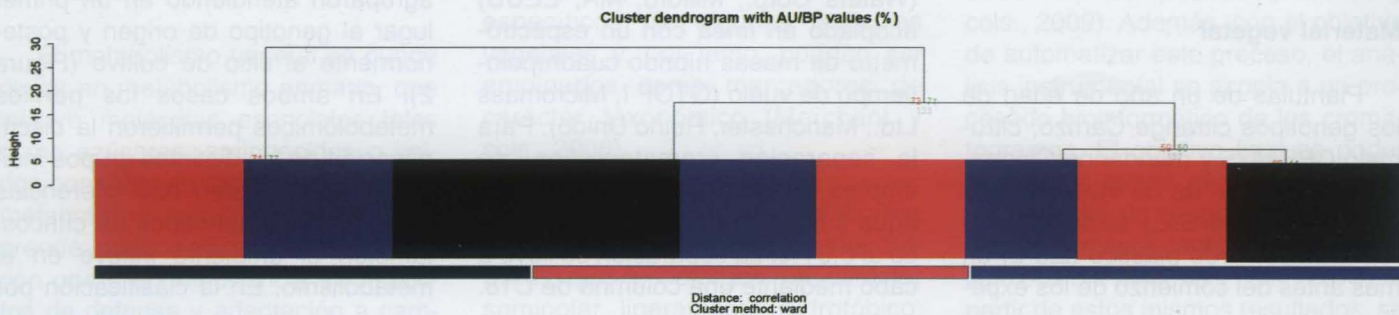


Figura 3. Análisis cluster jerárquico (HCA) de los genotipos de cítricos en las distintas localizaciones, las barras coloreadas indican: localización 1 (■), localización 2 (●) y localización 3 (◆) y los globos Carrizo (■), Cleopatra (◆) y citrumelo (●).

A partir de los análisis PLS-DA se estableció un ranking de importancia de las variables (picos cromatográficos) en su contribución a la clasificación estipulada. Empleando el genotipo como parámetro de clasificación, el análisis rindió un total de 716 variables contribuyendo de forma significativa. Cada una de estas variables constituye una variante de un metabolito (un fragmento, un aducto, etc..) y convenientemente agrupadas pueden ofrecer información útil en la identificación de dicho metabolito (Tabla 1). Por otro lado, se realizó el mismo análisis en los PLS-DA obtenidos tras clasificar los individuos según su lugar de cultivo (Figura 2) obteniéndose tan solo 159 variables, todas ellas incluidas en el anterior análisis. Estos resultados podrían indicar que, aunque la presencia y concentración de los metabolitos identificados tienen carácter taxonómico y están asociados al genotipo, también estarían sujetos a cierto control ambiental.

En conjunto, los resultados indican que la aplicación de esta tecnología podría permitir el estudio de variaciones en la composición metabólica tanto en respuesta a cambios genéticos (genotipo o mutaciones) como en respuesta a cambios ambientales (aclimatación). En este sentido, el metabolismo secundario constituye una diana importante para estudiar las respuestas de aclimatación al ambiente ya que dentro de este grupo se incluyen compuestos tan importantes como las hormonas vegetales. Además, este tipo de tecnología -ómica no requiere práctica-

Tabla 1. Anotación de metabolitos importantes en la diferenciación de genotipos y localizaciones.

Anotación	m/z	Rt [min]	Fragmentos
Rutina ^a	611.1593	8,54	-
Eriodictiol di-C-glucósido	613.1729	9,57	595.1622 [M-H ₂ O] ⁺ 523.1438 [M-C ₃ H ₆ O ₃] ⁺
Hesperidina ^a	611.1584	10,74	-
Quercetin diglucósido	627.1449	12,46	465.1133 [M-Hexosa] ⁺ 303.0485 aglicona
Diosmina ^a	609.1769	13,48	-
Limonina ^a	471.2004	16,74	-

^aanotación realizada por comparación del espectro de masas con el de estándares puros.

mente ningún tipo de puesta a punto especial para cada especie. La única limitación importante es la falta de librerías de compuestos para realizar búsquedas tras el análisis, lo cual facilitaría enormemente la tarea; aunque existen iniciativas como el MassBank (<http://www.massbank.jp/>) o el MetFrag (<http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>) que permiten la identificación de compuestos empleando información procedente de espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear. A pesar de ello, y dada su transversalidad, la técnica puede ser aplicada a distintas especies vegetales o incluso organismos de otros reinos sin necesidad de modificaciones. Además, otras aplicaciones de esta tecnología serían la autenticación de material vegetal, su procedencia, así como a la evaluación de posibles fraudes en zumos procedentes de cítricos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia y la Universitat Jaume I a través de los proyectos AGL2010-22195-C03-01,

P1B2012-06 y P1B2013-23 Los autores agradecen a Beniplant S.L., vivero autorizado de cítricos, la colaboración dispensada en la adquisición y cuidado del material vegetal.

BIBLIOGRAFIA

Arbona, V., Iglesias, D.J., Talón, M., Gómez-Cadenas, A. 2009. Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7338-47.

Arbona, V., Manzi, M., De Ollas, C., Gómez-Cadenas, A. 2013. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 4885-4811.

Dixon, R.A., Gang, D.R., Charlton, A.J., Fiehn, O., Kuiper, H.A., Reynolds, T.L., Seiber, J.N. 2006. Applications of metabolomics in agriculture. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8984-94.

Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gesheva, E. 2008. Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol.*, 34, 67-78.

Fiehn, O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genom.* 2, 155-68.

Merchant, A., Richter, A., Popp, M., Adams, M. 2006. Targeted metabolite profiling provides a functional link among eucalypt taxonomy, physiology and evolution. *Phytochemistry*, 67, 402-8.

Smith, C.A., Want, E.J., O'maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G. 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.*, 78, 779-87.



FRUTICULTURA

Autor: M. Agustí. 2ª Edición. 507 págs. Fotografías y gráficos color (2010)

CONTENIDO: Introducción. La planta. El medio. Fotosíntesis y producción. La nutrición mineral de los frutales. Latencia, brotación y floración. Desarrollo del fruto. Maduración del fruto. Senescencia. Prolongación de la vida del fruto. Técnicas poscosecha. Propagación y mejora del material vegetal. Técnicas de cultivo. **Clasificación agronómica, adaptación ecológica, nutrición y fertilización, plagas y enfermedades, patrones, técnicas de cultivo y estadios fenológicos de:** Frutales de pepita: Peral, Manzano. Frutales de hueso: Albaricoquero. Cerezo.

Ciruelo. Melocotonero. **Cítricos.** El olivo. **Frutos secos:** Almendro. Avellano. Nogal. Castaño. Pistachero. Algarrobo. Macadamia. Nogal Pecán. **Otros frutales de zonas templadas:** Níspero japonés. Caqui. Higuera. Granado. Litchi. Nashi. Palmera datilera. **Frutales tropicales de mayor interés:** Platanera. Aguacate. Mango. Papaya. Chirimoyo. Carambola. Cacao.

P.V.P. 49€- (Envíos contra reembolso. I.V.A. incluido. Gastos de envío aparte). PARA PEDIDOS: EDICIONES L.A.V., S.L. Tel.: 96/ 372 02 61