

ARTÍCULOS TÉCNICOS

SUSTANCIAS INDICADORAS DE LAS DEFENSAS DE LAS PLANTAS

Análisis HPLC-MS/MS de jasmonatos

Esta nota ha sido desarrollada por Sartorius



Int. A. Ávalos 4251 (B1605ECS)
Munro - Buenos Aires
Tel.: (54-11) 4721-0505
Fax: (54-11) 4762-2333
sartorius.arg@sartorius.com
www.sartorius.com/es

INTRODUCCIÓN

Las plantas han de poder reaccionar a las variaciones climáticas, al ritmo diario, a la oferta de agua y nutrientes y a los ataques de insectos. Para ello requieren una red de sustancias reguladoras, las fitohormonas. Gracias a estas sustancias, las plantas pueden responder al estrés biótico y abiótico mediante acciones coordinadas entre sí, así como iniciar procesos específicos de desarrollo. En este artículo, se presenta un método de análisis altamente sensible para la determinación cuantitativa de las fitohormonas. Ejemplos fundamentales de las hormonas vegetales son el ácido jasmónico (JA), la citocina, la auxina, el ácido abscísico, el ácido salicílico, la giberelina y la estrigolactona. Ver Figura 1.

La fitohormona JA tiene, entre otros, un papel esencial como indicadora de heridas en la defensa contra los insectos herbívoros. Los insectos masticadores o chupadores (Fig. 1) inducen en la hoja la activación de la biosíntesis de JA y, con ella, la acumulación de JA. Todos los derivados de JA que se producen fruto de la metilación, glicosilación, hidroxilación o esterificación con aminoácidos se agrupan bajo el término *jasmonatos*. Entre ellos, tiene un papel aún más importante el derivado esterificado con el aminoácido isoleucina, la jasmonil-isoleucina (JA-Ile). La JA-Ile representa la forma biológica activa de la fitohormona (1).

Desencadena numerosas respuestas defensivas, como la producción de sustancias locales tóxicas o inhibidoras de la digestión. De este modo, tras ser mordidas por un insecto, las plantas pueden sintetizar inhibidores de la proteínasa que, posteriormente, en el intestino de los insectos impedirán la digestión de los materiales de las plantas ingeridos (1). También se liberan sustancias volátiles como, por ejemplo, el jasmonato metílico, que atraen a los depredadores (insectos repelentes y depredadores) de las plagas de las plantas (2). Por otro lado, las partes no infectadas de una planta afecta-

da, gracias a la señal móvil del jasmonato, activan las alarmas y están más preparadas para defenderse contra el ataque (3).

Desde el punto de vista de las plantas, es importante limitar al máximo posible el estado de defensa, ya que este proceso requiere mucha energía y, por lo tanto, reduce el crecimiento y la capacidad de adaptación de la planta a otras condiciones de estrés. La regulación de la concentración de JA y de la molécula indicadora JA-Ile biológicamente activa requiere un control estricto de la nueva

síntesis, del transporte y de la degradación de estas sustancias. La caracterización de los sustratos y productos de degradación del metabolismo de JA y su cuantificación en tejidos vegetales heridos, estresados o atacados son, por lo tanto, el principal objetivo de la presente investigación.

ANÁLISIS HPLC-MS/MS

Para el estudio de la respuesta ante lesiones se necesita una analítica especialmente sensible, ya que las fitohormonas en los tejidos vegetales están presentes en concentraciones muy bajas (< 10 nmol/g

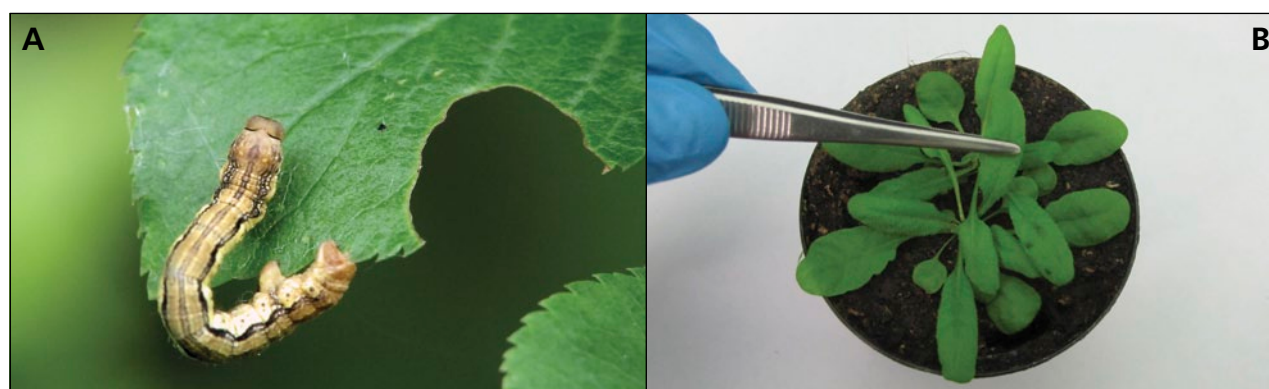


Figura 1: Los daños en las hojas causados por insectos masticadores o chupadores (A) inducen la síntesis del ácido jasmónico, indicador de heridas. Mediante lesiones mecánicas en las hojas (B) se pueden simular los daños causados por los insectos. Este estímulo produce también el incremento de la concentración de ácido jasmónico en las hojas. (Foto A: © Michael Martini-Fotolia.com. Foto B: Departamento de Bioquímica de las Plantas, Albrecht-von-Haller-Institut, Universidad Georg-August, Gotinga, Alemania).



Figura 2: Sistema HPLC/nanoESI-MS/MS para el análisis de jasmonatos. Como espectrómetro de masas, se utiliza el equipo de trampa iónica de triple cuadrupolar/lineal híbrido 3200 de la marca Applied Biosystems. La ionización por *nanoelectrospray* (nanoESI) se asegura con la fuente de iones basada en chip TriVersa NanoMate (Advion BioSciences). El sistema HPLC de Agilent no se muestra. (Foto: Departamento de Bioquímica de las Plantas, Albrecht-von-Haller-Institut, Universidad Georg-August, Gotinga, Alemania).

de peso en fresco). Asimismo, la matriz vegetal constituye una mezcla de gran complejidad, lo que dificulta la detección y la cuantificación de los analitos menos abundantes. Para estas exigentes tareas de análisis es adecuada la cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Con la cromatografía se separan temporalmente los compuestos químicos del extracto de la hoja según su estructura química con una columna cromatográfica. En la cromatografía en fase reversa empleada en el presente trabajo, las sustancias se combinan por efectos de interacción hidrófoba en la fase estacionaria y se eluyen de la columna con la ayuda de un disolvente orgánico de gradiente creciente. A continuación, se realiza la detección de los compuestos eluidos mediante espectrometría de masas. Para la identificación de un compuesto químico se utiliza, por un lado, un tiempo de retención específico en el que se eluye una sustancia de la columna cromatográfica y, por el otro, su masa/relación de carga por peso total, registrada por el espectrómetro de masas (valor m/z). En el espectrómetro de masas en tándem, ajustado en modo Multiple Reaction Monitoring (MRM), se utiliza el valor m/z de la molécula deproto-

nada intacta ($[M-H]$) en combinación con el valor m/z de un fragmento específico de este ion para la identificación unívoca del compuesto químico. En las aplicaciones HPLC-MS, es esencial utilizar un eluyente de alta pureza (grado LC-MS) o agua ultrapura, ya que la sensibilidad y la fiabilidad del método dependen en gran medida de la pureza del eluyente.

Cuantificación de jasmonatos y precursores

El material de muestra congelado por choque térmico se extrae con un sistema de extracción bifásico a partir de una mezcla de terc-butil metil éter, metanol y agua (4). Para la cuantificación se añaden patrones de fitohormonas adecuadamente deuterizados en las cantidades definidas. La fase orgánica se utiliza para el análisis después de la extracción. El análisis se realiza en un sistema HPLC/nanoESI-MS/MS, compuesto por un sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica de triple cuadrupolar/lineal híbrido Applied Biosystems 3200 (MDS Sciex, Ontario, Canadá) (5). La ionización por *nanoelectrospray* (nanoESI) se asegura con una fuente de iones basada en chip



Figura 3: Sistema de agua ultrapura de Sartorius arium pro VF TOC (Foto: Sartorius).

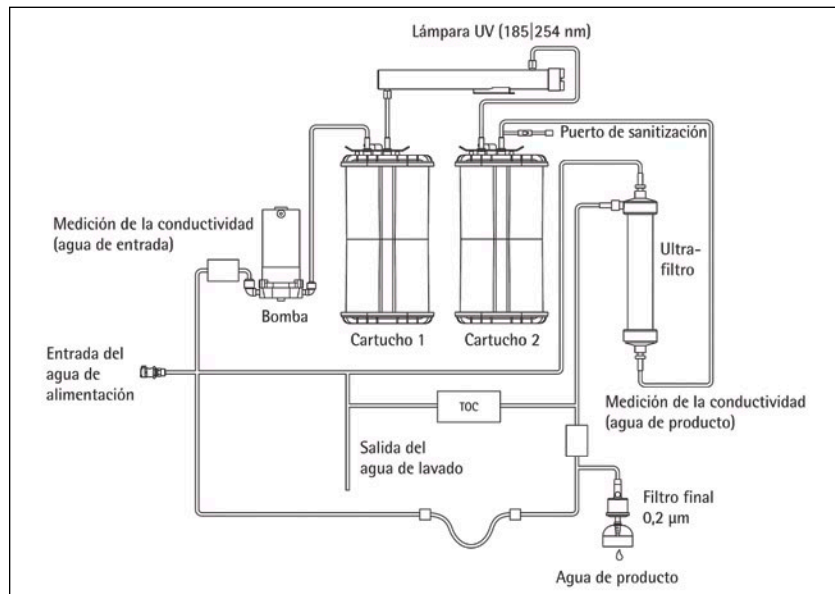


Figura 4: Representación esquemática del diagrama de flujo en el sistema de agua ultrapura arium pro VF TOC. Para ofrecer una visión más clara no se han incluido las válvulas y su control.

(TriVersa NanoMate; Advion BioSciences, Ithaca, NY, EE. UU.) Ver Figura 2.

La separación HPLC se realiza con una columna C18 (EC 50/2 Nucleodure C18 gravity 1,8 µm; 50 x 2,1 mm, tamaño de partícula 1,8 µm; Macherey und Nagel,

Düren, Alemania) y utilizando un gradiente de disolvente binario de acetonitrilo (Fisher Scientific, Leics, Reino Unido) y agua ultrapura del sistema arium pro VF TOC (Sartorius, Gotinga, Alemania), en cada caso, reducido al 0,1% con ácido acético. Las especies de fitohormonas se detec-

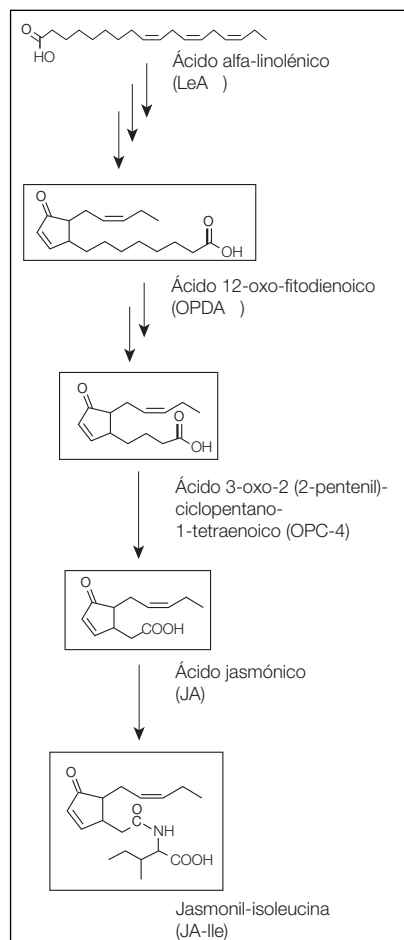


Figura 5: Biosíntesis de la fitohormona ácido jasmónico (JA) y del derivado activo jasmonil-isoleucina (JA-Ile) mediante los precursores ácido alfa-linolénico, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) y ácido 3-oxo-2(2-pentenil)-ciclopentano-1-tetraenoico (OPC-4).

tan en modo negativo de ionización por electrospray mediante Multiple Reaction Monitoring. Para la cuantificación se crean curvas de calibración sobre la base de los niveles de intensidad de los valores m/z de las sustancias no marcadas con relación a las sustancias marcadas con deuterio correspondientes frente a las cantidades molares de las sustancias no marcadas.

PRODUCCIÓN DE AGUA ULTRAPURA

El sistema arium pro VF TOC (Sartorius, Gotinga, Alemania) (Fig. 3) se ha utilizado

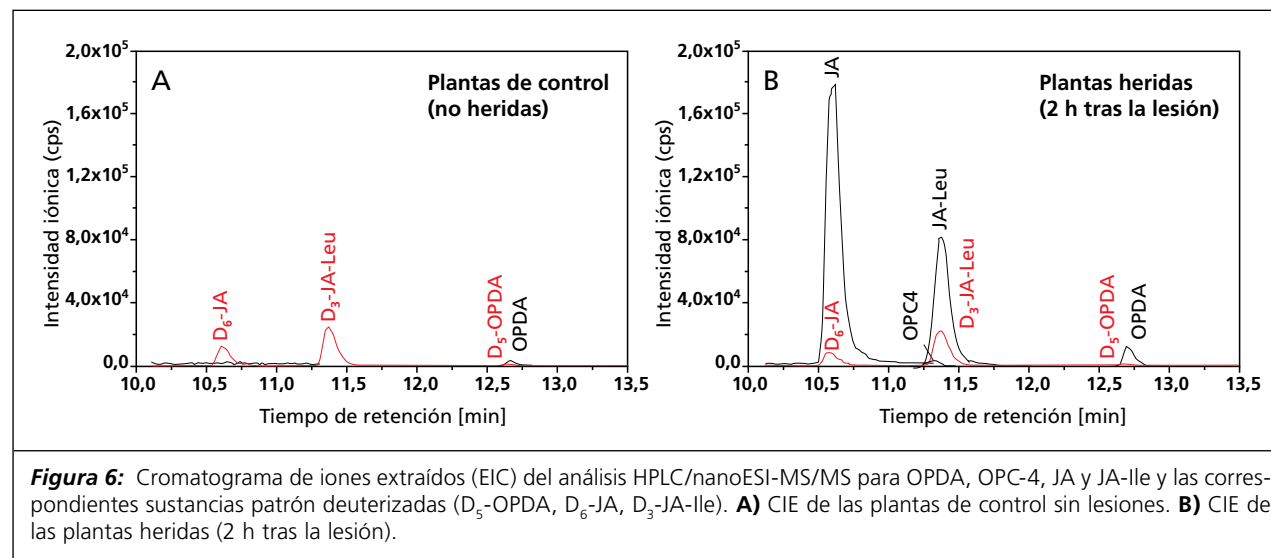


Figura 6: Cromatograma de iones extraídos (EIC) del análisis HPLC/nanoESI-MS/MS para OPDA, OPC-4, JA y JA-Ile y las correspondientes sustancias patrón deuterizadas (D_5 -OPDA, D_6 -JA, D_3 -JA-Ile). **A)** CIE de las plantas de control sin lesiones. **B)** CIE de las plantas heridas (2 h tras la lesión).

para producir agua ultrapura para los análisis de HPLC/nanoESI-MS/MS. Elimina del agua potable pretratada las impurezas aún presentes. La producción de agua ultrapura requiere una recirculación continuada del agua dentro del sistema y un caudal de agua constante, lo que se consigue mediante un sistema de bombeo con regulación de la presión. La conductividad del agua se mide tanto en la entrada del agua de alimentación como en el agua de producto en la salida. El contenido de TOC (del inglés: *total organic carbon*; "carbono orgánico total") se supervisa mediante un monitor especial. El sistema arium pro VF TOC utilizado en las investigaciones aquí descritas funciona con dos cartuchos diferentes. Estos cartuchos están llenos de un absorbente especial de carbón activo y de resinas de intercambio de iones en lecho mixto que pueden suministrar agua ultrapura con un contenido de TOC de hasta < 2 ppb. Asimismo, se ha integrado una lámpara de UV, que, a unas longitudes de onda de 185 nm y 254 nm, actúa como oxidante y elimina los gérmenes. Ver Figura 3.

El sistema arium pro VF TOC incorpora además un módulo de ultrafiltración que se emplea como filtro de flujo tangencial. La membrana de ultrafiltración retiene coloides, microorganismos, endotoxinas, ARN y ADN. En la salida de agua se ha instalado un filtro final de 0,2 μ m que sirve

para la eliminación de partículas y bacterias durante la dosificación del agua ultrapura elaborada. El proceso de purificación de agua específico del aparato está representado en la Figura 4. Ver Figura 4.

Para los análisis de HPLC/nanoESI-MS/MS se ha utilizado agua ultrapura con un contenido de TOC < 5 ppb y una conductividad de 18,2 M Ω x cm (compensada a 25 °C).

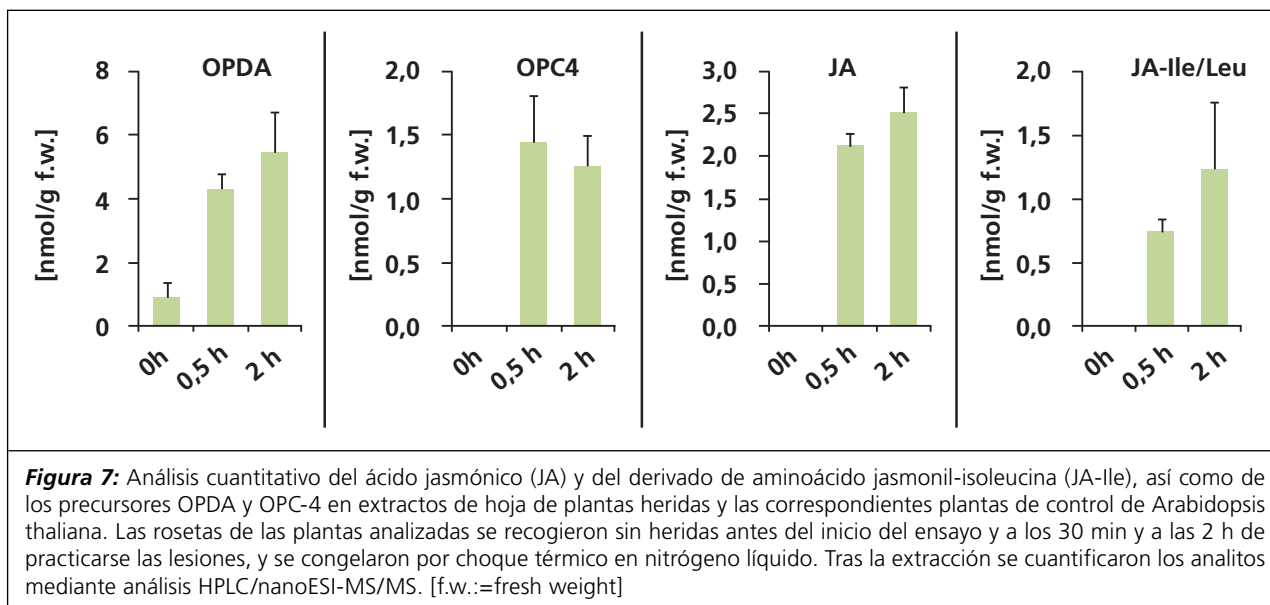
RESULTADOS

La respuesta a las heridas de las plantas se estudia intensivamente en muchas especies vegetales, como por ejemplo, el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el berro del thale (*Arabidopsis thaliana*). Para nuestros análisis utilizamos la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Se practicaron heridas en las rosetas del berro del thale con unas pinzas dentadas sobre la nervadura central de la hoja (Fig. 1B) y se recogieron a los 30 min y 120 min. Como control se utilizaron rosetas de plantas sin lesiones. Se incluyeron en el análisis, además del JA y el derivado biológicamente activo JA-Ile, sus precursores de biosíntesis, ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) y ácido 3-oxo-2(2-pentenil)-ciclopentano-1-tetraenoico (OPC-4) (Fig. 5). Para registrar cuantitativamente las cantidades de estos metabolitos en los tejidos de las plantas por medio de análisis HPLC/nanoESI-MS/MS,

es necesario añadir una cantidad definida de sustancias deuterizadas idénticas o de estructura química muy parecida (D_5 -OPDA, D_6 -JA, D_3 -JA-Ile) para la extracción, y utilizarlas posteriormente como patrones internos. Para ello se añadieron las sustancias patrón antes de la extracción en cantidades de 30 ng (D_5 -OPDA) y 10 ng (D_6 -JA y D_3 -JA-Ile) a 200 mg de material de las plantas. Ver Figura 5.

Las señales detectadas mediante análisis HPLC/nanoESI-MS/MS de los analitos (OPDA, OPC-4, JA, JA-Ile) y de las sustancias patrón deuterizadas correspondientes se muestran en la Figura 6 como cromatograma de iones extraídos (CIE). En las plantas de control sin lesiones, OPC-4, JA y JA-Ile no eran detectables. Solo se pudieron detectar los patrones deuterizados correspondientes y pequeñas cantidades de OPDA (Fig. 6A). En cambio, en las plantas heridas (2 h tras la lesión), se observaron claras señales de los jasmonatos endógenos (JA y JA-Ile), así como señales menos intensas de los precursores OPC-4 y OPDA (Fig. 6B). Ver Figura 6.

El análisis HPLC/nanoESI-MS/MS permite, mediante el uso del patrón deuterizado correspondiente, una cuantificación exacta de los jasmonatos y sus precursores en los extractos de hoja. Debido a la respuesta a la lesión apreciada y continuada en las plantas al cabo de pocos minutos (3), en las



rosetas del berro del thale los precursores de JA (OPDA y OPC-4), JA y JA-Ile están presentes en grandes concentraciones al cabo de solo 30 min de la lesión (Fig. 7).

La concentración de JA en este experimento fue de 2,2 nmol/g de peso en fresco. JA-Ile estuvo presente en concentraciones de 0,8 nmol/g de peso en fresco. La concentración de estos dos jasmonatos aumentó además ligeramente durante los siguientes 90 min, y llegó hasta 2,5 o 1,2 nmol/g de peso en fresco. En este lapso temporal, aumentaron simultáneamente las concentraciones de los precursores OPDA y OPC-4 (Fig. 7). Con el análisis HPLC/nanoESI-MS/MS aquí presentado, y utilizando agua ultrapura del sistema arium pro VF TOC, el límite de detección de los jasmonatos y sus precursores en el tejido de las hojas de *Arabidopsis thaliana* es de 1 pmol/g de peso en fresco en el caso de OPDA y JA-Ile y de 15 pmol/g de peso en fresco para OPC-4 y JA. Ver Figura 7.

DISCUSIÓN

El método aquí descrito de espectrometría de masas en tándem acoplada a HPLC permite el análisis cuantitativo de las hormonas vegetales en la gama de concentraciones picomolares. La alta sensibilidad y la especificidad del método que son necesarias para ello imponen unos

claros requisitos en la calidad del solvente utilizado. Durante la separación cromatográfica, el gradiente utilizado del solvente es responsable de la progresiva elución de los analitos de la columna. En la fuente del espectrómetro de masas, los solventes se evaporan posteriormente con un flujo de gas y se transfieren los analitos como iones libres en la fase gaseosa. Con una ionización positiva, idealmente los analitos serán protonados ($[M+H]^+$), mientras que en la ionización negativa serán deprotonados ($[M-H]^-$). Sin embargo, en la ionización por *electrospray*, al registrar iones extraños (p. ej., Na^+ , NH_4^+ , Cl^- , CH_3COO^-), pueden producirse también iones cuasimoleculares, que se conducirán por medio del campo de tensión al espectrómetro de masas y producirán señales en el detector. En consecuencia, puede ser un problema si el solvente contiene iones en forma de impurezas, ya que ocasionarán numerosos aductos posibles en los analitos. Los cationes de sodio desempeñan un papel especialmente significativo en la formación de aductos. En comparación con $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$, forman, entre otras, aducciones de $[M+Na]^+$ o $[M+Na+ácido\ acético-2H]^-$.

Cuando se produce una intensa formación de aductos, la cantidad de iones protonados o deprotonados (que generalmente se utilizan para el análisis) se reduce proporcionalmente. Por lo tanto, la formación de

aductos puede reducir considerablemente la sensibilidad de un método e influir negativamente en los límites de detección de analitos. Durante el almacenamiento prolongado de agua de alta pureza (p. ej., grado LC-MS) en botellas de vidrio pueden lixiviarse cationes de sodio del vidrio, lo que ocasionará una mayor formación de aductos durante el análisis. Este problema se puede evitar utilizando el sistema arium pro VF TOC, ya que permite disponer en todo momento de agua ultrapura recién preparada para los análisis HPLC/nanoESI-MS/MS. En estudios previos, se estableció asimismo que el agua ultrapura de arium, con un promedio de 3,82 ppb de TOC, tiene un contenido claramente inferior de TOC que el agua (grado LC-MS) de botellas recién abiertas de los proveedores habituales del mercado, que tienen un promedio de 45,5 ppb de TOC (medido el 23/4/2013). Esta hipótesis es ratificada por los análisis realizados por Tarun et al. (6), que muestran valores superiores de impurezas orgánicas en el agua embotellada para análisis HPLC disponible en el mercado en comparación con el agua ultrapura recién preparada.

BIBLIOGRAFÍA:

(1) Wasternack, C; Hause, B. Jasmonsäure-ein universelles Pflanzenhormon. Biol. Unserer Zeit, 2014, 3, 44.

(2) Kessler, A.; Baldwin, I. T. Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature. Science. 2001, 291, 2141.

(3) Glauser, G.; Grata, E.; Dubugnon, L.; Rudaz, S.; Farmer, E. E.; Wolfender, J. J. Spatial and Temporal Dynamics of Jasmonate Synthesis and Accumulation in *Arabidopsis* in Response to Wounding. J. Biol. Chem. 2008, 283 (24), 16400-16407.

(4) Matyash, V.; Liebisch, G.; Kurzchalia, T. V.; Shevchenko, A.; Schwudke, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. J. Lipid. Res. 2008, 49, 1137-1146.

(5) Iven, T.; König, S.; Singh, S.; Braus-Stromeyer, S. A.; Bischoff M.; Tietze, L. F.; Braus, G. H.; Lipka, V.; Feussner, I.; Dröge-Laser, W. Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis* roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. Mol. Plant. 2012, 5 (6):1389-1402. Información en los datos complementarios de este artículo.

(6) Tarun, M.; Monferran, C.; Devaux, C.; Mabic S. Vor Gebrauch beachten-Wie wichtig ist Reinstwasser für die HPLC ? LaborPraxis. 2014, 7/8, Agosto.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores desean agradecer especialmente a los Prof. Dr. Ivo Feußner, Sabine Freitag, Pia Meyer y Hanno Resemann (Departamento de Bioquímica de las Plantas, Albrecht-von-Haller-Institut, Universidad Georg-August, Gotinga, Alemania) por el apoyo prestado.

AUTORES:

Dr. Tim Iven, Departamento de Bioquímica de las Plantas, Albrecht-von-Haller-Institut, Universidad Georg-August, Gotinga.

Dr. Kirstin Feußner, Departamento de Bioquímica de las Plantas, Albrecht-von-Haller-Institut, Universidad Georg-August, Gotinga.

Dr. Cornelia Herrfurth, Departamento de Bioquímica de las Plantas, Albrecht-von-Haller-Institut, Universidad Georg-August, Gotinga.

Dr. Elmar Herbig, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Gotinga. ■