



METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN COLECTAS DE *Persea americana* Mill var. *drymifolia* DEL ESTADO DE MICHOACÁN

Ana Karen Escalera-Ordaz^a, Ma. Blanca Nieves Lara-Chavez^a, Guadalupe Torres-Gurrola^b, Yolanda Magdalena García-Rodríguez^b, Eulalio Venegas-González^a y Héctor Guillén-Andrade^a.

^aUniversidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología. Uruapan, Mich., México. ana.karen.escalera.ordaz@gmail.com

^bUniversidad Nacional Autónoma de México, Centro de Investigaciones en Ecosistemas. Morelia, Mich. pitagt@hotmail.com

RESUMEN

México se ubica como el principal productor de aguacate a nivel mundial; lugar que obtiene por las 168,114 ha plantadas y una producción total de 1, 467,837 t, el estado de Michoacán se coloca como el principal productor de este frutal con una participación del 81.32 % de la producción nacional y una derrama económica de alrededor de 15.509 millardos. En Michoacán existe una amplia diversidad genética de *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* que destaca por su importancia, al ser utilizada como pie de injerto del cultivar "Hass" por ser fuente de genes de resistencia a factores físicos, plagas y patógenos; Sin embargo, esta diversidad genética se ha ido perdiendo principalmente por manipulación del hombre, implicando, el establecimiento de bancos de germoplasma como una manera de rescatar estos recursos fitogenéticos. Uno de los bancos con mejor representación de *P. americana* Mill. var. *drymifolia* de la franja aguacatera del estado de Michoacán se tiene en la Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología de la Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", donde se trabaja en la conservación y caracterización del germoplasma. En la presente investigación, se planteó la caracterización química de los genotipos conservados como parte integral de la estrategia para evaluar su potencial como portainjertos con atributos de resistencia a plagas y enfermedades ya que se conoce de compuestos químicos que actúan como defensas de las plantas. Los resultados obtenidos se relacionan con el perfil químico de 216 individuos, identificándose 47 metabolitos secundarios; seis de ellos, fueron detectados en 54 colectas: el b-pineno, cariofileno, estragol, ácido hexadecanoico, heptacosano y a-tocoferol, el metabolito secundario predominante con una concentración de 26.53 % respecto al total de los metabolitos secundarios identificados fue el estragol, que se ha reportado con actividad biológica antifúngica, larvicida, insecticida y genotóxica. En conclusión existe variabilidad de metabolitos secundarios en los genotipos evaluados.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han sumado esfuerzos para la conservación y caracterización de recursos genéticos del aguacatero; en algunas regiones de México se han hecho trabajos para conocer la variabilidad fenotípica del germoplasma de aguacate criollo (Gutiérrez-Diez *et al.*, 2009; López-Guzmán *et al.*, 2012). En el estado de Michoacán se ha trabajado en la caracterización genotípica (Cuiris-Pérez *et al.*, 2009; Gutiérrez-Diez *et al.*, 2009) y fenotípica (López-Guzmán *et al.*, 2012; Guillén-Andrade *et al.*, 2013). Sin embargo, es importante estudiar la química de las plantas, ya que éstas han desarrollado diversas estrategias de defensa a condiciones de estrés biótico y abiótico; por ejemplo, la planta sintetiza metabolitos secundarios (MS) que provocan que las plantas sean desagradables o tóxicas para algunos herbívoros (Anaya-Lang y Espinosa-García,



2006), además de su importancia ecológica al participar en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003); asimismo, hay MS que tienen actividad biológica bactericida y fungicida (Hanamanthagouda *et al.*, 2010), otros se han reportado con más de dos funciones: por ejemplo, el estragol, que se ha documentado con actividad biológica antifúngica (Fontenelle *et al.*, 2008), larvicida (Senthilkumar *et al.*, 2008), insecticida (López *et al.*, 2008) y genotóxica (Zani *et al.*, 1991); este MS se ha identificado como principal componente en tejido foliar de especies de *Persea* (Torres-Gurrola *et al.*, 2009; Torres-Gurrola *et al.*, 2011; Rincón-Hernández *et al.*, 2011). La variación química del aguacatero, ha sido poco estudiada en especies de *Persea* (Quing-Yi *et al.*, 2009; Torres-Gurrola *et al.*, 2009; Torres-Gurrola *et al.*, 2011; Rincón-Hernández *et al.*, 2011), dada la importancia de la caracterización de los recursos genéticos del aguacate, en el presente trabajo se planteó el objetivo de conocer los MS presentes en los genotipos establecidos en el Banco de Germoplasma de *Persea americana* Mill var., *drymifolia* de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, como parte integral de la estrategia para evaluar su potencial como portainjertos.

2. MATERIALES Y METODOS

El germoplasma de aguacate incluido en el presente trabajo de investigación consiste de 216 plantas de aguacate criollo de 54 colectas procedentes de siete municipios de la franja aguacatera del estado de Michoacán (**Figura 1**). La extracción, identificación y cuantificación de volátiles foliares se hizo de acuerdo al procedimiento descrito por Torres (2009), utilizando un cromatografo de gases Agilent® HP6890 y la biblioteca de espectro de masas NIST 05. Se calcularon los índices kovats de los metabolitos secundarios identificados, la información de la concentración de cada metabolito secundario determinada en los 216 individuos se sometió al análisis de varianza en una vía, este análisis se llevó a cabo con un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones, se consideró a cada accesión como un tratamiento, con base en el análisis de varianza, se seleccionaron aquellos MS para los cuales hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), sobre el listado de esos compuestos seleccionados, se realizó un análisis discriminante de stepwise (Romano y Wolf, 2005). Adicionalmente, se practicó un análisis de correlación de Pearson y Filon (1898), posteriormente, se obtuvo una matriz de promedios para llevar a cabo un análisis de Componentes Principales (ACP), se utilizó la matriz de correlaciones; se calculó la matriz de distancias euclidianas (DE) entre accesiones y con ella se hizo el Análisis de Conglomerados (AC). Finalmente, se construyó el dendrograma correspondiente con el método de agrupamiento de Ward. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SAS® versión 9.4 (SAS Institute Inc., 2012). Las coordenadas geográficas del sitio donde se colectó el material original se convirtieron a decimales para construir una matriz de distancias geográficas la cual se comparó con una matriz de distancias euclidianas, mediante la prueba de Mantel para determinar la correlación entre ambas matrices. La prueba de Mantel fue ejecutada mediante el paquete estadístico GenAlex (Peakall y Smouse, 2006).

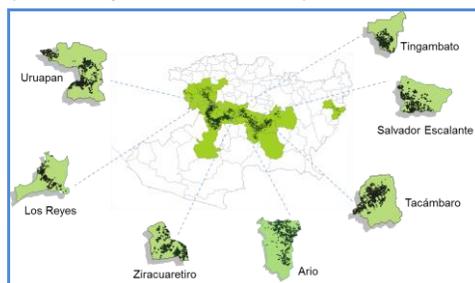


Figura 1. Localización de los 7 municipios donde se colectó *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* en la franja aguacatera de Michoacán, México.



3. RESULTADOS

Se logró determinar el perfil químico foliar de cada individuo perteneciente al banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología por cromatografía de gases, con este método se detectaron 47 metabolitos secundarios en 216 individuos correspondientes a 54 colectas de aguacate criollo var., *drymifolia*. De los 47 MS identificados se calcularon los índices Kovats, el porcentaje que representa cada MS en cuanto a la concentración total y la frecuencia a la que se identificaron en las 54 colectas. Se observó una gran variabilidad en la concentración de MS; el 70.21% de los 47 MS identificados presentaron concentraciones que oscilaron entre cero y 2.5 mg g⁻¹ de hoja seca. El fenil etil alcohol se detectó en menor contenido (0.0164 mg g⁻¹). Es de resaltar el estragol, ya que presentó la mayor concentración (26.53 mg g⁻¹) (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Tiempo de retención, índice Kovats, concentración (%) total y frecuencia de los metabolitos secundarios identificados en las colectas de *P. americana* Mill var., *drymifolia* procedentes del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología.

MS	TR	IK	%	F	MS	TR	IK	%	F
α-Pineno	2.794	942	0.982	12	Nerolidol (E)	7.2	1577	0.6543	49
Sabineno	3.11	986	0.02	7	Geracreno D-4-ol	7.377	1606	0.0403	17
β-pineno	3.159	993	4.7539	54	Óxido de cariofileno	7.446	1618	0.5922	46
Mirceno	3.208	1000	0.5881	49	Tetradecanal	8.106	1732	1.73	49
Decano	3.262	1007	0.0933	28	Ácido tetradecanoico	8.303	1766	0.0583	26
Limoneno	3.5	1038	0.0213	8	Cis,cis,7,10, hexadecadienal	9.09	1903	0.1906	41
Eucalipto	3.54	1043	0.7361	53	Cis,cis,cis-7,10,13-hexadecatrienal	9.12	1909	4.4192	52
β-cis-Octimeno	3.634	1056	0.3887	39	Hexadecanoato de metilo	9.28	1936	1.7413	40
Undecano	4.0195	1107	0.5654	44	Ácido hexadecanoico	9.4605	1967	4.6696	54
Fenil etil alcohol	4.2195	1134	0.0164	9	Finol	10.372	2125	4.7608	53
Undecano 4-metil	4.751	1206	2.7795	43	Ácido oleico	10.435	2137	3.6279	50
Estragol	4.834	1217	26.5327	54	Ácido linoleico	10.7265	2189	0.8929	23
Chavicol	5.148	1262	0.077	5	Metil araquidonato	11.163	2268	3.3274	48
Tridecano	5.457	1306	0.0938	28	8,11,14-ácido eicosatrienoico, (z,z,z)-	11.8695	2398	0.6953	21
t-elemeno	5.817	1359	0.0783	10	4,8,13-divatrien-1,3-diol	11.9125	2406	1.1932	28
α-cubebeno	5.891	1370	0.0389	15	2H-Pirano, 2-(7-heptadecimiloxi) tetrahidro-	12.495	2519	2.1822	46
Copaeno	6.091	1400	0.398	44	Metilcholestan-3-ol	13.026	2626	1.5813	34
β-cubebeno	6.177	1414	0.251	20	Heptacosano	13.401	2705	3.9402	54
Metileugenol	6.206	1418	3.5294	49	α-gliceril linoleato	13.658	2763	2.9127	45
Cariofileno	6.417	1451	5.852	54	Cicloartrial acetato	13.844	2805	0.8669	30
α-linuleno	6.629	1484	0.6148	49	Escualeno	14.03	2848	3.5109	52
Acetato de eugenol	6.983	1541	0.0518	5	α-tocoferol	15.767	3170	5.6894	54
Cubebol	6.994	1543	0.6123	48	Palmitato	16.728	3301	1.5751	34
Elemicin	7.143	1568	0.0708	17					

MS de Mayor Concentración, MS Más Concentrado, MS menos frecuente, MS Presentes en todas las Colectas

Los resultados obtenidos del análisis de varianza en una vía, practicados para contenido de metabolitos secundarios indicaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) para doce MS (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Estadísticos simples, cuadrados medios del error y probabilidad obtenidos del análisis de varianza practicado para 47 metabolitos secundarios identificados en 216 individuos de 54 colectas de *P. americana* Mill var., *drymifolia* procedentes del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología.

MS	R ²	C.V.	DE	Media	CME	Pr>F
Decano	0.34	196.54	0.01199	0.0061	0.00014	0.0131
Fenil etil alcohol	0.46	473.28	0.00509	0.00108	0.00003	<.0001
Undecano 4-metil	0.41	128.08	0.23263	0.18162	0.05411	0.0002
Tridecano	0.38	198.86	0.0122	0.00613	0.00015	0.0019
b-cubebeno	0.41	341.69	0.05605	0.0164	0.00314	0.0002
Acetato de eugenol	0.4	896.43	0.03039	0.00339	0.00092	0.0004
Óxido de cariofileno	0.33	170.22	0.06588	0.0387	0.00434	0.028
Cis,cis,7,10, hexadecadienal	0.33	271.52	0.03382	0.01246	0.00114	0.0341
Cis,cis,cis 7,10,13, hexadecatrienal	0.34	98.13	0.28338	0.28877	0.0803	0.019
8,11,14, ácido eicosatrienoico (z,z,z)-	0.43	299.19	0.13595	0.04544	0.01848	<.0001
4,8,13-divatriene 1,3-diol	0.34	222.07	0.17315	0.07797	0.02998	0.0184
Metilcholestan-3-ol	0.39	175.88	0.18174	0.10333	0.03303	0.0009

¹Coefficiente de variación, ²Desviación estándar, ³Cuadrado medio del error.

El dendrograma (**Figura 2**) generado del análisis clúster hecho con base en el método de agrupamiento de Ward, indicó que las accesiones no se agrupan de manera lógica en relación a su origen geográfico tomando en cuenta la información de origen de cada colecta; para corroborar esta información se hizo la prueba de Mantel (**Figura 3**) con la cual se concluyó que efectivamente no existe correlación entre la distribución geográfica y la distribución de MS con una significancia de 0.069.

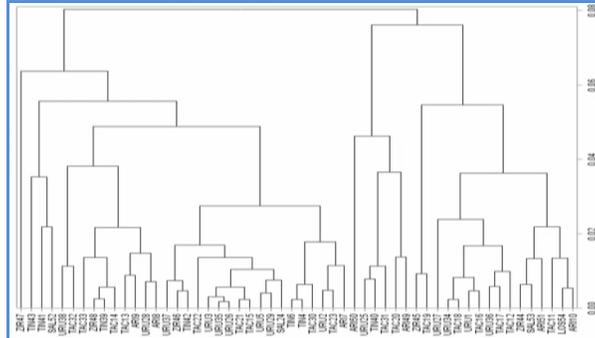


Figura 2. Dendrograma de disimilitud de 54 colectas de *P. americana* Mill var., *drymifolia* procedentes del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología, con base en la presencia y concentración de diez metabolitos secundarios en 216 individuos.

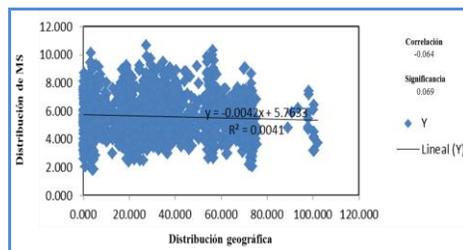


Figura 3. Prueba de Mantel; Correlación lineal entre distribución de metabolitos secundarios y distribución geográfica de 54 colectas de *P. americana* Mill var., *drymifolia* procedentes del banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología.

4. CONCLUSIONES

El germoplasma de *Persea americana* Mill var., *drymifolia* analizado presentó diferencias en el tipo y concentración de metabolitos secundarios presentes en el tejido foliar.

Se identificaron 47 metabolitos secundarios en hojas de individuos de *Persea americana* Mill var., *drymifolia* pertenecientes al banco de germoplasma de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

En todas las colectas analizadas se determinó la presencia de seis metabolitos secundarios: α -Pineno, estragol, cariofileno, ácido hexadecanoico, heptacosano y α -tocoferol.

No se determinó relación alguna entre la presencia y concentración de metabolitos secundarios con el origen geográfico de las colectas analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anaya-Lang A L y Espinosa-García F J. 2006. La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias* 83: 4-13.
2. Cuiris-Pérez H, Guillén-Andrade H, Pedraza-Santos M E, López-Medina J y Vidales-Fernández I. 2009. Genetic variability within mexican race avocado (*Persea americana* Mill) germoplasm collections determined by ISSRs. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15: 169-175.
3. Fontenelle R O S, Orais S M, Rito E H S, Rilhante R S N, Ordeiro R A, Nascimento N R F, Erntopf M R, Idrim J J C y Ocha M F G. 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian *Caatinga* biome. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 1383-1390.



4. Guillén-Andrade H, Lara-Chávez M B N, Torres-Gurrola G, Escalera-Ordaz A K y Tapia-Vargas L M. 2013. Caracterización fenotípica de germoplasma de aguacate (*Persea americana* Mill) criollo de Michoacán. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29, 212.
5. Gutiérrez-Diez A, Martínez-de la Cerda J, García-Zambrano E A, Iracheta-Donjuan L, Ocampo-Morales J D y Cerda-Hurtado I M. 2009. Estudio de la diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 9-18.
6. Hanamanthagouda M S, Kakkamelali S B, Naik P M, Nagella P, Seetharamareddy H R y Murthy H N. 2010. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. *Food Chemistry*. 118: 836-839.
7. López-Guzmán G, Medina T R, Guillén-Andrade H, Ramírez G L, Aguilar C J y Valdivia R M. 2012. Características fenotípicas de hoja y fruto en selecciones de aguacate criollo de clima subtropical en el estado de Nayarit. *Revista Fuente ISSN 4*: 56-62.
8. López M D, Jordan M J y Pascual-Villalobos M J. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *Journal of Stored Products Research*. 44: 273-278.
9. Peakall R y Smouse P E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
10. Pearson K y Filon L N G. 1898. Contributions to the mathematical theory of evolution, IV: on the probable errors of the frequency constants and on the influence of random selection on variation and correlation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, 191: 229-311.
11. Quing-Yi L, Zang Y, Wang Y, Wang D, Ru-Po L, Gao K, Birns R y Heber D. 2009. California Hass Avocado: Profiling of Carotenoids, tocopherol, fatty acid, and fat content during maturation and from different growing areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 10408-10413.
12. Rincón-Hernández C A, Sánchez-Pérez J y Espinosa-García F J. 2011. Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var., *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 395-412.
13. Romano J P y Wolf M. 2005. Stepwise multiple testing as formalized data snooping. *Econometría*, 73(4): 1237-1282.
14. SAS Institute Inc. 2012 Introduction to Bayesian Analysis Procedures. In: SAS/STAT 9.2 User's Guide, Ch. 7. SAS Institute, Inc., Cary, NC. 141-179 pp.
15. Senthilkumar A, Kannathasan K y Venkatesalu K. 2008. Chemical constituents and larvicidal property of the essential oil of *Blumea mollis* (D. Don) Merr. against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology Research*. 103: 959-962.
16. Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoing H y Rocha-Sosa M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 355-363.
17. Torres-Gurrola G, Montes-Hernández S y Espinosa-García F J. 2009. Patrones de variación y distribución geográfica en fenotipos químicos foliares de *Persea americana* var., *drymifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 19-30.
18. Torres-Gurrola G, Delgado-Lamas G y Espinosa-García F J. 2011. The foliar chemical profile of criollo avocado, *Persea americana* var., *drymifolia* (Lauraceae), and its relationship with the incidence of a gall-forming insect, *Trioza anceps* (Trioziidae). *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 102-111.
19. Zani F, Massimo G, Benvenuti S, Bianchi A, Albacini A, Melegari M, Vampa G, Bellotti A y Mazza P. 1991. Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Planta Medica*. 54: 237-241.