

**E**n 1941 los investigadores alemanes Muller y Borger determinaron que la exposición de rodajas de papa a una raza incompatible del hongo *Phytophora infestans* originaba posteriormente en los sitios de aplicación la inhibición del crecimiento de una raza compatible del mismo hongo, debido, según ellos, a la producción de nuevos compuestos llamados fitoalexinas. Actualmente se definen estas sustancias como antibióticos de bajo peso molecular que se producen en las plantas debido al ataque de microorganismos; sin embargo, ésta definición tiene sus inconvenientes ya que no todas las fitoalexinas poseen actividad antibiótica y no son los microorganismos los únicos agentes que inducen su producción.

#### AGENTES INDUCTORES DE FITOALEXINAS

Los inductores de la producción de fitoalexinas pueden ser bióticos y abióticos.

*Inductores bióticos:* Incluyen hongos, bacterias, virus, insectos y nemátodos y su patogenicidad no es un requisito indispensable para ejercer una actividad inductora. Al menos en el caso de los hongos parece que no es necesaria la presencia del microorganismo intacto para que se desencadene la producción de fitoalexinas, pues resultados similares se han obtenido cuando se inocula en cotiledones de soya extractos del hongo *Phytophora megasperma* f. sp. *glycinea*. La sustan-

tiene sus analogías, por ejemplo, los carbohidratos tiene sus analogías, por ejemplo, los carbohidratos determinantes de los grupos sanguíneos, las lectinas, que selectivamente enlazan proteínas o carbohidratos o los factores de adherencia de microorganismos a la pared celular animal. Por ello es muy factible que la producción de fitoalexinas sea un fenómeno derivado de la interacción entre los carbohidratos del microorganismo y los de la planta.

*Inductores Abióticos* Son de dos tipos: físicos y químicos. Los primeros incluyen a la luz ultravioleta, golpes, cortes, congelamiento e inclusive deficientes condiciones de almacenamiento. Sales de metales pesados (mercurio, cadmio, cobre),

## Qué son las Fitoalexinas?

Luis Fernando Echeverri\*

#### TIPOS DE FITOALEXINAS

Estructuralmente las fitoalexinas corresponden a núcleos ya conocidos en productos naturales (Cuadro 1). El tipo de estructura producida depende de la familia o género al cual pertenezca la planta que se estudia y es independiente de la clase de inductor, pero la cantidad total producida sí depende del tipo de inductor, de su concentración y del tiempo de exposición.

Esta distribución tan específica de las fitoalexinas ha sido usada para estudios quimiotaxonómicos en la familia Leguminosae, la cual presenta a los géneros *Vicia* y *Lens* como "anómalos", ya que producen tanto flavonoides (comunes en la familia), como furanoacetilenos (más típicos de la familia Compositae).

La mayoría de las investigaciones en fitoalexinas se han realizado en especies de las familias Leguminosae y Solanaceae, a causa de su importancia económica y nutricional.

cia responsable de tal actividad inductora, una vez aislada y sintetizada, correspondió a un glucano heptasacárido, que se produce por hidrólisis enzimática de un polisacárido mucho mayor, el cual hace parte del micelio del hongo.

Los carbohidratos de origen biológico que tienen la capacidad de inducir la producción de fitoalexinas se conocen con el nombre de "Elicitors" y pueden ser del tipo exógeno (de origen microbiano) o bien endógeno (de origen vegetal). Los elicitors endógenos revalúan el papel que se ha atribuido a los carbohidratos en las plantas, pues siempre se han considerado como elementos pasivos de sostén o reserva energética. Como elementos pasivos de sostén se puede plantear si energéticamente es favorable para la planta la construcción de grandes moléculas de polisacáridos en un proceso donde intervienen cientos de enzimas, gran cantidad de sustratos y mucha energía. Además, este nuevo papel de los carbohidratos como mediadores de eventos biológicos

etileno, cicloheximida, actinominina D, vapores de cloroformo y algunos aminoglicósidos hacen parte, entre otros, de los inductores químicos.

#### MÉTODOS DE INDUCCIÓN DE FITOALEXINAS

Hojas, semillas, cotiledones e hipocótilos son los órganos donde principalmente se han inducido fitoalexinas. Se usan diversos métodos:

*Método de difusión de gota:* Sobre el material vegetal se colocan soluciones acuosas que contienen el agente inductor y se adiciona una sustancia que solubilice las fitoalexinas que se difunden desde la célula vegetal hacia la gota. En el caso de los hongos las soluciones contienen aproximadamente  $10^5$  esporas/ml. En vainas y algunos frutos se prefiere inocular directamente las soluciones del inductor en sus cavidades; en todos los casos es

\* Químico Farmacéutico, Master en Química Orgánica. Profesor e investigador, Universidad de Antioquia. A. A. 1226 Medellín.

conveniente mantener el material en un medio con alto grado de humedad, bien sea flotando sobre un lecho de agua o envolviéndolo en papel de aluminio con lo cual se disminuye la deshidratación.

Transcurrido un tiempo adecuado (1-3 días) se extraen las gotas con diferentes solventes y se purifican por cromatografía. Este método tiene la ventaja de producir fitoalexinas casi completamente exentas de pigmentos vegetales que dificultan los procesos de purificación.

El material vegetal también se puede colocar flotando directamente sobre una solución que contenga el inductor; posteriormente se lava, macera y extrae con solventes.

En inductores volátiles como el cloroformo, se expone el órgano a sus vapores durante algunos minutos y se procede de manera similar a la anteriormente descrita.

Siempre se debe trabajar simultáneamente con un blanco, en el cual se induce únicamente con el solvente (generalmente agua), para tener la certeza de que el inductor potencial es el único responsable de la aparición de nuevos compuestos en el macerado o en la gota. Cuando el proceso se hace con inductores bióticos es aconsejable trabajar también con un inductor abiótico, pues así se descarta que las nuevas sustancias sean un metabolito microbiano o un producto metabólico de las mismas fitoalexinas.

#### METODO DE DETECCION DE FITOALEXINAS

El método de difusión de gota es especialmente valioso para detectar fitoalexinas coloreadas, como en el caso de flavonoides y derivados; además, en el sitio de aplicación del agente inductor hay un ostensible deterioro.

La mejor técnica para detectar fitoalexinas es la cromatografía de capa fina, gases y recientemente de alta eficiencia, esta técnica compara la composición del extracto del ma-



Tomate de árbol afectado por un hongo patógeno (*Collectotrichum* sp.). En estos frutos afectados se buscan fitoalexinas.

terial tratado con el inductor con la composición del extracto del blanco, apreciándose sustancias presentes exclusivamente en el primero de ellos.

Un complemento a la cromatografía en capa fina es el bioensayo, en el cual se desarrolla el cromatograma y luego se rocía con una solución de esporas disueltas en agar. El cromatograma se incuba y en las zonas donde no hay desarrollo microbiano se asume que hay fitoalexinas.

Igualmente se puede proceder para ensayos de inhibición sobre cajas de petri con extractos brutos del inducido; claro está que los resultados dependen de la actividad antibiótica de las fitoalexinas producidas.

Actualmente se desarrolla la técnica del radioinmunoensayo para la

fitoalexina gliceollin I, con la cual se pueden detectar niveles del orden de picogramos.

#### ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FITOALEXINAS

La determinación de la actividad biológica de las fitoalexinas se realiza sobre la germinación de esporas, crecimiento del tubo germinal, crecimiento radial o acumulación del micelio en medio líquido, pero ninguna de estas técnicas se ha estandarizado, por lo cual se reportan resultados muy divergentes. La actividad antibiótica de las fitoalexinas se sitúa en el rango  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M y abarca una amplia gama de microorganismos patógenos y no patógenos.

Para el caso de fitoalexinas flavonoides y derivados se ha observado que algunos microorganismos son

CUADRO 1. DISTRIBUCION DE FITOALEXINAS

Familia	Estructura	Familia	Estructura
Quenopodiaceae	Isoflavonas	Solanaceae	Sequitripenos Alc. esteroidales
Compositae	Poliacetilenos	Umbelliferae	Cromonas Isocoumarinas Furanocoumarinas
Convolvulaceae	Furanoterpenos	Vitaceae	Estilbenos condensados
Euforbiaceae	Diterpenos	Pinaceae	Estilbenos Lignanos
Leguminosae	Isoflavonoides Pterocarpanos Estilbenos Bensofuranos Furanoacetilenos	Graminae	Diterpenos
Linaceae	Lignanos	Oerhidaceae	Fenantrenos
Malvaceae	Naftaldehidos Naftofuranos	Musaceae	Flavonoides*
Rosaceae	Fenoles		

\*Estructura en vías de determinación

capaces de metabolizarlas a compuestos con una actividad antibiótica menor para el metabolizante, aunque dentro de los mismos patógenos se dan diferencias en cuanto a su capacidad transformadora. Esta aparente desventaja de las fitoalexinas tiene su importancia ya que se hace posible el diseño de análogos sintéticos con modificaciones en los sitios de ataque microbiano, aunque también sería posible emplear los productos metabólicos de un microorganismo sobre otro de diferente género o familia.

La carencia de actividad de algunas fitoalexinas tiene varias aproximaciones. En papa se ha encontrado que existe un constante reciclaje interno de ellas, bien sea por su fitotoxicidad o porque de esta manera se pueden mantener niveles constantes de sustancias antibióticas; así mismo, el autor y un grupo de investigación han determinado la cinética de la producción de una fitoalexina flavonoide inducida en hojas de banano con aminoglicósidos. Transcurridas 72 horas decae notablemente la concentración de la fitoalexina, fenómeno para el que se tienen varias hipótesis, pues la sustancia se puede estar descomponiendo espontáneamente o bien la célula vegetal la está empleando para restablecer las funciones bioquímicas perturbadas por el agente inductor, tanto a nivel de membrana como activando en el material nuclear otros mecanismos de defensa. Por ello es posible que la postulada actividad antibiótica de las fitoale-

xinas sea un hecho complementario a su principal función, cual es la de actuar a nivel de la célula vegetal y por ello su actividad debe determinarse directamente en el sistema planta-patógeno más que en ensayos *in vitro*. Estudios *in vivo* con la fitoalexina capsidol muestran que a una concentración de  $5 \times 10^{-4}$  M protege completamente plantas de tomate contra el hongo *P. infestans* y la aplicación de un elicitor a hipocótilos de soja 6 horas antes inocular una variedad compatible del mismo hongo exhibe resultados similares.

Este último tipo de estudios desgraciadamente no se han vuelto a reportar, aunque son fundamentales en la eventualidad de usar las fitoalexinas como fungicidas. Considérese únicamente la posibilidad que la mezcla de fitoalexinas producidas tenga una actividad antibiótica mayor que cada una de ellas sola, lo cual es difícil de determinar en pruebas *in vitro*.

En el cuadro 2 se presentan las propiedades toxicológicas de algunas fitoalexinas, la mayoría de las cuales provienen de experimentos *in vitro*, pero a estos resultados se puede contraponer el argumento de la imposibilidad de ingerir siempre alimentos totalmente libres de fitoalexinas, más aún en poblaciones que no tienen acceso a alimentos de alta calidad, en cuyo caso sólo se han reportado las derivaciones eminentemente microbiológicas.

#### PERSPECTIVAS DEL USO DE FITOALEXINAS

Como las fitoalexinas son sustancias involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas, varias posibilidades se perfilan para usarlas contra microorganismos patógenos a ellas:

Aplicar directamente las fitoalexinas antes que el microorganismo se presente o desarrolle a su máxima virulencia o emplear elicitors sintéticos, de tal manera que cuando se presente el patógeno la planta ya

tenga altos niveles de fitoalexinas, con lo cual el elicitor se comporta como una especie de vacuna.

Esta última posibilidad es bastante viable, puesto que un elicitor relativamente complejo se ha sintetizado y un carbohidrato tan elemental como la sacarosa induce la producción de fitoalexinas en *Cajanus*. Si se hace una analogía estructural entre los aminoglicósidos activos en banano y carbohidratos abundantes como la celulosa, el almidón o la misma sacarosa, podría llegarse a la obtención de elicitors baratos y activos a bajas concentraciones, con lo cual podrían reemplazarse los fungicidas y bactericidas vegetales que tantos inconvenientes ecológicos y toxicológicos tienen actualmente.

Además se ha reportado inducción de fitoalexinas con algunos fungicidas vegetales por lo cual el efecto sería dual: por un lado hay actividad antibiótica directa y por otro se inducen sustancias posiblemente también antibióticas, racionalizándose un poco el uso de fungicidas sintéticos. En variedades resistentes a patógenos hay una mayor capacidad de síntesis de fitoalexinas o ya poseen sustancias de este tipo que solamente se producen en variedades susceptibles cuando están ante un inductor adecuado. La obtención de nuevas variedades resistentes a patógenos puede acortarse notablemente, pues bastaría una sencilla cromatografía de los padres y algunas generaciones para determinar las diferencias en su composición química; lógicamente ello implicaría que la resistencia o susceptibilidad siempre esté ligada a la composición de las plantas.

De todas maneras el estudio de las fitoalexinas abre nuevas perspectivas a la bioquímica, microbiología, fitopatología, fisiología vegetal y química orgánica y plantea posibles soluciones a problemas de la humanidad tales como el creciente déficit de alimentos y materias primas vegetales, así como el manejo de sustancias potencial o realmente tóxicas para el hombre y su medio ambiente. □

CUADRO 2. EFECTOS ADVERSOS DE ALGUNAS FITOALEXINAS

Fitoalexinas	Efecto Reportado
Pisatin y Medicarpin	Hemolíticos
Pisatin	Desacople de fosforilación mitocondrial
Phaseollin	Tóxico a embriones de pollo
Ipomeamarone	Hepatotóxico
4-hidroxiipomeanol	Edema pulmonar
Xanthotoxin	Fototóxico
Isoflavonoides	Extrogénico
Alcaloides esteroidales	Indicios de teratogenicidad