

Norharmane, un alcaloide con potencial bioherbicida

LÓPEZ-GONZÁLEZ D, LEDO D, COSTAS-GIL A, GRAÑA E, REIGOSA MJ,
SÁNCHEZ-MOREIRAS AM

Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Campus Lagoas-Marcosende s/n, E-36310, Vigo, España.
davidlopez@uvigo.es

Resumen: El Norharmane (NOR) es un indol alcaloide que se puede encontrar en plantas superiores y cianobacterias como *Nostoc insulare*. El NOR posee actividad alguicida, antibacteriana y farmacológica. Se ha observado en estudios previos que plántulas de *Arabidopsis thaliana* mostraban efectos inhibitorios en el crecimiento radicular, fenómenos de torsión, así como formación de raíces laterales y adventicias. En este trabajo, plantas de *Arabidopsis* de 15 días fueron trasplantadas a perlita y pulverizadas o regadas con diferentes concentraciones de NOR (0-612 μ M) cada 2 días durante 21 días y se determinaron diferentes parámetros asociados a la medida de fluorescencia de la clorofila *a*. Posteriormente, fueron cosechadas y se determinaron los potenciales hídrico y osmótico, el contenido en antocianinas y proteínas, la relación peso seco/peso fresco, el análisis colorimétrico de las hojas y la superficie foliar.

Palabras clave: compuesto natural, fluorescencia, malas hierbas

1. Introducción

En la agricultura actual, el manejo de las malas hierbas es una prioridad para obtener la mayor eficiencia a la hora de producir especies cultivables. La forma más rápida y sencilla de contener el problema es la utilización de herbicidas sintéticos, lo que puede provocar serias alteraciones en el medioambiente, y a menudo las malas hierbas son capaces de generar resistencias frente a los mismos. Por ello, buscar alternativas a estos herbicidas es cada vez más necesario. La búsqueda de compuestos naturales puede ser una de ellas, ya que presentan numerosas ventajas (Dayan y Duke, 2006): (1) son fácilmente modificables para que sean más selectivos en su modo de acción, (2) son *a priori* biodegradables, por lo que son más respetuosos con el medio ambiente y (3) presentan más dianas moleculares y, con ello, más modos de acción.

El norharmane (NOR) es un metabolito secundario de origen vegetal perteneciente al grupo de los alcaloides, que son un conjunto de metabolitos secundarios que comparten tres características comunes: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. Aparece con frecuencia en plantas de las familias Gramineae, Sapotaceae y Zygophyllaceae, y en organismos marinos como *Noctiluca miliaris* o cianobacterias como *Nodularia*

harveyana (Volk, 2006). Este compuesto posee actividad algicida, antibacteriana y anticianobacteriana (Sharma et al., 2010). También se pueden encontrar usos farmacológicos del NOR, como la inhibición de diversas enzimas (Robinson et al., 2003). Con todo, poco se sabe de sus efectos sobre el metabolismo de plantas superiores, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del norharmane sobre el crecimiento de plantas de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, con el fin de profundizar en su modo de acción.

2. Material y Métodos

2.1 Crecimiento y tratamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Semillas de *A. thaliana*, previamente esterilizadas en EtOH 50% durante 3 min y NaOCl al 0,5% con tritón al 0,01% durante otros 3 min, fueron lavadas 3 veces en agua destilada autoclavada. Las semillas se conservaron en agar al 0,1% a 4 °C durante 48 h para permitir su vernalización y sincronización del proceso germinativo. Posteriormente se sembraron en placas Petri con agar al 0,8% suplementado con una mezcla de nutrientes (Murashige-Skoog, Sigma-Aldrich) suplementado con sacarosa al 1%, y se dejaron crecer a 22 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 8 h luz ($120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 16 h oscuridad a una humedad relativa del 55%. Transcurridos 15 d, se trasplantaron un total de 48 plantas en 8 maceteros de plástico (20x12x5 cm), con 6 macetas por macetero y 1 planta por maceta, haciendo un total de 6 réplicas por tratamiento. Se usó perlita como sustrato. Los maceteros fueron regados cada 2 d, durante 15 d, con solución de Hoagland al 50%. Pasado este tiempo se inició el tratamiento con 153, 306 y 612 μM de NOR (Sigma-Aldrich). Se emplearon como controles plantas sin tratar con NOR. Cuatro de los maceteros se usaron para el tratamiento de riego con NOR (3 maceteros/concentración NOR, 1 para el control), y los otros cuatro se emplearon para el tratamiento de pulverización con NOR (3 maceteros/concentración NOR, 1 para el control). Estos tratamientos duraron 21 d durante los cuales, las plantas tratadas mediante riego, eran regadas cada 2 d con la solución nutritiva y con el NOR a las concentraciones ensayadas, mientras que las tratadas mediante pulverización, eran pulverizadas con las diferentes soluciones de NOR todos los días y eran regadas con solución nutritiva cada 2 d.

2.2 Medida de fluorescencia de la clorofila *a*

La medida de fluorescencia de la clorofila *a* se monitorizó cada 2 d durante 21 d mediante el uso del fluorímetro Maxi-Imaging PAM Fluorescence System (Walz, Alemania), con el que se puede conocer el estado a nivel fotosintético de las plantas a través de la medición de los parámetros Y(II) (eficiencia del PSII: cantidad de luz que la planta transforma en energía química mediante la fotosíntesis); Y(NPQ) (*quenching* no fotoquímico: pérdida regulada de energía en forma de calor); Y(NO) (pérdida no regulada de energía en forma de fluorescencia); F_v/F_m (eficiencia máxima del PSII) y ETR (medición de la tasa de flujo electrónico). Previo a las mediciones, las plantas se dejaron en oscuridad durante 20 min para abrir todos los centros de reacción de los fotosistemas. Estos parámetros se monitorizaron durante 5 min y la exposición a pulsos de luz saturantes se realizó cada 20 s a una intensidad de $2700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3 Medidas poscosecha

Tras 21 días de tratamiento, las plantas se cosecharon para realizar las siguientes medidas:

- a) Potencial hídrico (Ψ_h) y osmótico (Ψ_s): en 3 plantas por tratamiento. El Ψ_h mediante la cámara de Scholander y el Ψ_s mediante el osmómetro Löser Type 6.
- b) Contenido en antocianinas: según el método de Close et al. (2000).
- c) Relación peso seco/peso fresco (PS/PF): se pesaron 3 plantas frescas por tratamiento (peso fresco) y se secaron 72 h en estufa a 70 °C y se volvieron a pesar (peso seco).
- d) Análisis colorimétrico y superficie foliar: se tomaron imágenes de 3 plantas completas por tratamiento y se analizaron con el software Image ProPlus (Media Cybernetics Inc., USA) para calcular el área foliar total, así como distinguir las distintas coloraciones observadas (áreas verdes, amarillentas o violáceas).

2.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS v15.0. Primero se realizó un análisis exploratorio de los datos mediante un diagrama de cajas para detectar *outliers*. A continuación, para comprobar la normalidad de los datos, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smimov seguida de un Test de Levene para comprobar la homocedasticidad de los mismos. Si los datos eran homocedásticos se procedió a realizar un ANOVA con DMS (diferencias mínimas significativas), y si no lo eran se analizaron mediante la T2 de Tamhane. Los datos no normales fueron analizados mediante Kruskal-Wallis. En el análisis de datos se establecieron tres grados de significación representados por asteriscos. Un asterisco indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$), dos diferencias muy significativas ($p \leq 0,01$) y tres diferencias altamente significativas respecto al control ($p \leq 0,001$).

3. Resultados y Discusión

Se presentan los resultados obtenidos en los tratamientos donde el NOR fue regado, ya que en los tratamientos de pulverización no hubo diferencias significativas. Tras 21 d de tratamiento, las plantas regadas con NOR (Figura 1) presentaron un menor tamaño que las plantas control y mostraron en las hojas zonas pigmentadas de color violeta, que sugieren el acúmulo de antocianinas. Estos pigmentos suelen ser indicativos de estrés hídrico en plantas (Chalker-Scott, 1999). Estos efectos se acentuaron a medida que aumentaba la concentración. En altas concentraciones aparecieron síntomas de clorosis representados por zonas amarillentas en las hojas. La aparición conjunta de antocianinas y zonas cloróticas puede ser indicativa de carencias de nitrógeno (Taiz y Zeiger, 2006).

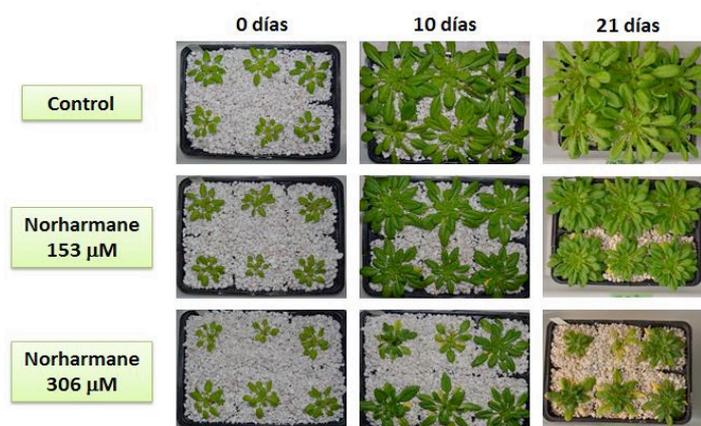


Figura 1: Plantas de *Arabidopsis thaliana* regadas durante 21 días con 0, 153 y 306 μM de norharmane.

Con respecto a la fluorescencia de la clorofila *a* (Figura 2), Y(II) presentó una bajada significativa a partir del día 15 de tratamiento a las concentraciones más altas ensayadas, lo que implica una bajada en la capacidad fotosintética global. En el caso de Y(NPQ) no hubo diferencias respecto al control a lo largo del ensayo, pero sí en el caso de Y(NO), que tuvo un aumento significativo ya a partir del día 5 de tratamiento, sobre todo a las concentraciones más altas. Este aumento es indicativo de que los mecanismos de disipación de energía de la planta son ineficientes, por lo que la planta está dañada o a punto de estarlo (Graña, 2013). En cuanto a ETR, el parámetro fue menor respecto al control en todas las concentraciones a lo largo de los 21 d de ensayo, por lo que la tasa de flujo electrónico es ineficiente, ya sea por una ralentización de la fase fotoquímica o por inhibición de la fase bioquímica (Graña, 2013).

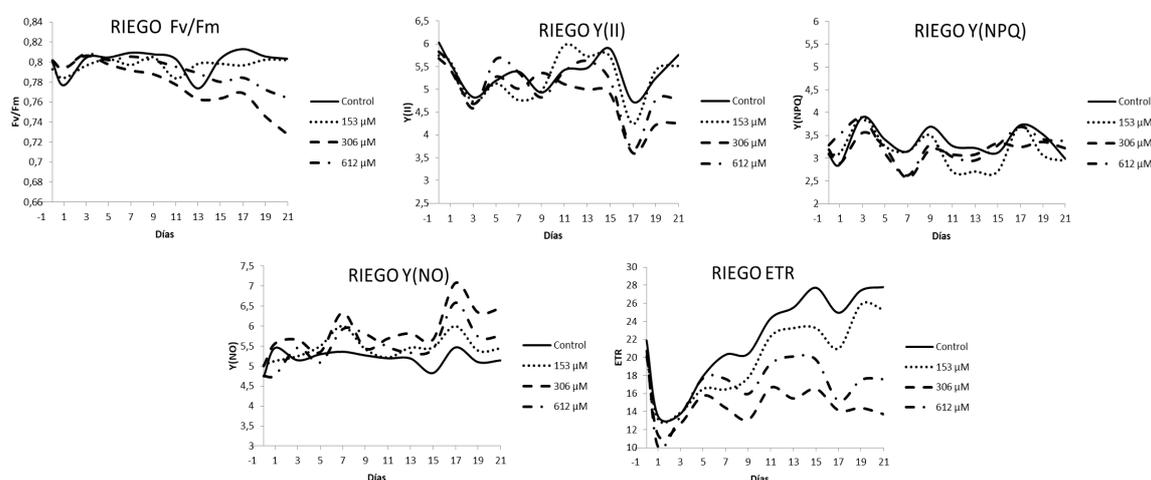


Figura 2: Parámetros Y(II), Y(NPQ), Y(NO), Fv/Fm y ETR durante 21 días de plantas de *Arabidopsis* regadas con NCP

En cuanto a las medidas poscosecha, se encontró un aumento de zonas cloróticas y violáceas (Figura 3A). La clorosis (zonas amarillas) está asociada con déficit hídrico y de macronutrientes (Martínez et al., 2009). En el caso de las violáceas, asociadas a la aparición de antocianinas, están relacionadas con la neutralización de radicales libres y a la disipación de energía, cuando los mecanismos normales son alterados (del Valle et al., 2005). El área foliar se vio disminuida en todos los tratamientos (Figura 3B), apoyando la teoría de que las plantas están sometidas a déficit hídrico y tratan de minimizar la

superficie de pérdida de agua (Valladares et al., 2004). El aumento del ratio peso seco/peso fresco (Figura 3C) en todas las concentraciones ensayadas, también apoya la presencia de estrés hídrico en las plantas. Dicho estrés se confirmó con la medida del potencial hídrico (Figura 3D), donde se vio reducido en las tres concentraciones ensayadas. Este déficit hídrico puede inhibir la tasa fotosintética y el crecimiento de las plantas. En cuanto al potencial osmótico (Figura 3E), se vio reducido en las concentraciones más altas ensayadas. Este valor es indicativo de la acumulación de solutos en el interior celular, muchas veces relacionado con alteraciones en el potencial hídrico (Taiz y Zeiger, 2006). En cuanto al contenido de antocianinas (Figura 3F), como ya se explicó, su aumento está relacionado con la neutralización de radicales libres y la disipación de energía cuando los sistemas habituales no están en funcionamiento debido a una situación de estrés (del Valle et al., 2005).

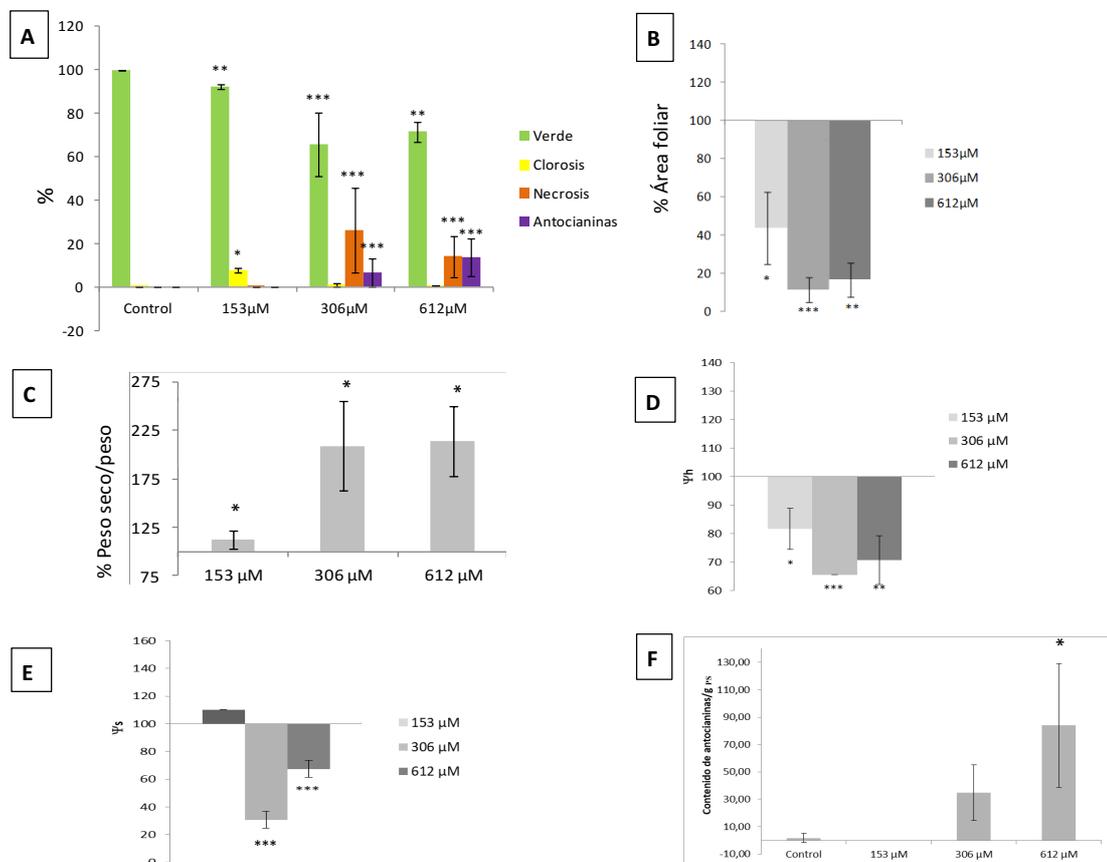


Figura 3: Medidas realizadas en el tratamiento de riego con NOR. A, distintas zonas foliares. B, área foliar total. C, peso seco/peso fresco. D, Potencial hídrico. E, Potencial osmótico. F Contenido en antocianinas. Las gráficas B,C,D y E muestran los datos en % con respecto al control. Donde * indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$), ** muy significativas ($p \leq 0,01$) y *** altamente significativas ($p \leq 0,001$).

Como conclusiones, podemos decir que el NOR es más efectivo cuando es aplicado mediante riego, haciendo que las plantas sufran una alteración de su estado hídrico, inhibiendo su crecimiento y provocando alteraciones en su aparato fotosintético.

Referencias

- CHALKERR-SCOTT L (1999). Environmental Significance of anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology* 70, 1-9.
- CLOSE DC, BEADLE CL, BROWN PH, et al (2000). Cold-induced photoinhibition affects establishment of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. *Trees* 15, 32-41.
- DAYAN FE & DUKE SO (2006). Clues in the search for new herbicides. In *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications* (eds MJ REIGOSA, N PEDROL, L GONZÁLEZ) 63-83. Springer. The Netherlands.
- DEL VALLE G, GONZÁLEZ A, BÁEZ R (2005). Antocianinas en uva (*Vitis vinífera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28, 359-368.
- GRAÑA E, SOTELO T, DÍAZ-TIELAS C et al (2013) The phytotoxic potential of the terpenoid citral on seedlings and adult plants. *Weed Science* 61, 469-481.
- MARTÍNEZ FE, SARMIENTO J, FISCHER G, JIMÉNEZ F (2009). Síntomas de deficiencia de macronutrientes y boro en plantas de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Agronomía Colombiana* 27, 169-178.
- ROBINSON ESJ, ANDERSON NJ, CROSBY J, et al. (2003) Endogenous *b*-carbolines as clonidine-displacing substances. *Annals New York Academy of Sciences* 1009, 157-166.
- SHARMA KN, TIWARI PS, TRIPATHI K et al. (2010) Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. *Journal of Applied Phycology* 23, 1050-1081
- TAIZ L & ZEIGER E (2006). *Fisiología Vegetal Vol. 1* (TAIZ L & ZEIGER E) Publicaciones de la Universitat Jaume I. Castelló de la Plana. España
- VALLADARES F, VILAGROSA A, PEÑUELAS J (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. In *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (ed VALLADARES F). 163-190 Egraf,. Madrid. España.
- VOLK RB (2006). Antialgal activity of several cyanobacterial exometabolites. *Journal of Applied Phycology* 18, 145-151.

Norharman, an alkaloid with bioherbicide potential

Summary: Norharmane (NOR) is an alkaloid indole from plants and cyanobacteria such as *Nostoc insulare*. This compound has algicidal, antibacterial and pharmacological activity. In previous studies, *Arabidopsis* roots showed inhibitory effects on root growth, torsion phenomena, and lateral and adventitious root formation after NOR treatment. In this work, *Arabidopsis* plants of 15 days were transplanted to perlite and sprayed or watered with different concentrations of NOR every two days for 21 days. Then, different parameters were determined related to the fluorescence of chlorophyll *a*. Later, plants were harvested and water and osmotic potentials, the content of anthocyanins and proteins, and dry weight/fresh weight ratio were determined, and colorimetric analysis of the leaves and leaf surface was carried out.

Keywords: natural compound, fluorescence, weeds