

Determinación de la presencia de compuestos naturales con actividad antiviral en extractos de plantas silvestres mexicanas.

30

Biól. José de Jesús Lozano Loera, M.C. Eugenio Pérez Molphe Balch, M.C. Rafael Gutiérrez Campos
 / Depto. de Investigaciones Biológicas

INTRODUCCION

Actualmente los virus fitopatógenos ocupan un lugar preponderante dentro de las causas de pérdidas en la producción agrícola, afectando de manera severa todo tipo de cultivo e incluso haciendo incosteable la explotación de ciertas especies en zonas infestadas. Las causas de este gran efecto de los virus sobre la agricultura son principalmente su amplia distribución, la severidad de los daños que causan a la planta y a la carencia hasta el momento de métodos eficientes para su control. De hecho, todos los métodos utilizados para el control de las enfermedades virales en plantas son de tipo preventivo y no hay forma de salvar un cultivo una vez que ha sido infectado, incluso éste debe ser destruido para impedir una mayor propagación del agente infeccioso. Por fortuna, el avance que han tenido las ciencias biológicas en los últimos años ha abierto varias posibilidades nuevas para el control de las enfermedades causadas por virus en plantas. Entre estas nuevas técnicas de control destaca por los resultados obtenidos hasta hoy la generación de plantas resistentes a virus mediante la llamada "Protección Cruzada por Ingeniería Genética" (Investigación y Ciencia, 7:40-43), la cual consiste básicamente en introducir al genoma de la planta el gen que codifica para la proteína de la cápside del virus contra el cual se desea proteger. Dentro de estas nuevas posibilidades para el control de los virus fitopatógenos se encuentra también la utilización de compuestos naturales con actividad antiviral. Estos son productos químicos que se encuentran en algunas plantas y hongos y que tienen la propiedad de inhibir o retardar el proceso de infección viral, por lo que sus perspectivas de utilización práctica en el control de enfermedades causadas por virus son muy prometedoras. De hecho, se ha comparado a estos compuestos antivirales de origen vegetal con lo que es el interferón en sistemas animales, encontrándose una gran similitud en algunos casos. Por desgracia son pocos los estudios que se han hecho a nivel

mundial sobre estos productos naturales, pero aun así se tienen ya varios de ellos aislados y se está estudiando con profundidad sus mecanismos de acción. Destaca en este aspecto la llamada PAP, que es una proteína con actividad antiviral producida por *Phytolacca americana*, de la cual ya se ha aislado el gen responsable de su síntesis y se ha logrado expresar en sistemas bacterianos conservando las propiedades antivirales del producto. Se postula además que el mecanismo de acción de esta proteína es mediante la inactivación de los ribosomas utilizados por el virus para la síntesis de la replicasa. Existen dos grupos diferentes de productos antivirales, los primeros son aquellos que se producen en algunas plantas como respuesta a la infección viral y que limitan la extensión de la misma. Estos compuestos son el producto de los genes de resistencia de la planta y se han caracterizado en varias especies (por ejemplo los factores AVF de tabaco). El segundo grupo, lo forman aquellos compuestos que están presentes durante toda la vida en ciertas plantas y que tienen la propiedad de inhibir la infección viral cuando se aplican a una planta diferente, es decir que estos productos pueden ser aislados de una especie y utilizados para brindar protección contra las enfermedades virales a otra especie diferente, lo que le da un gran interés a su estudio debido a las posibilidades de aplicación práctica (a este grupo pertenecen las mencionadas proteínas PAP). Incluso algunos de los compuestos antivirales pertenecientes a este segundo grupo han mostrado ser activos contra virus que atacan animales, por lo que también tienen una aplicación potencial enorme en el campo de la medicina. La acción de estos compuestos antivirales puede darse de manera general a tres niveles diferentes; A) aglutinando las partículas virales, impidiendo así la infección, B) inhibiendo algún proceso bioquímico indispensable para que prospere la infección viral, por ejemplo la síntesis de proteínas, y C) estimulando la producción de otros compuestos de defensa en la planta infectada. En cuanto a la naturaleza química de estos compuestos, en la mayoría de los casos estudiados

se trata de proteínas o glicoproteínas, lo que le da aun mayor interés a su estudio ya que esto posibilita su manipulación genética. En la tabla I se da un resumen de los compuestos antivirales caracterizados hasta la fecha.

Debido a la importancia del tema por lo descrito anteriormente y a la carencia de estudios de este tipo en nuestro país, se planteó la investigación aquí descrita, cuya finalidad fue determinar la presencia de compuestos naturales con actividad antiviral en extractos de algunas plantas silvestres de la región, la mayoría de ellas pertenecientes a la familia de las Cactáceas. Es de interés subrayar la importancia de este tipo de estudios, ya que muchas de las especies de nuestra flora están amenazadas o al borde de la extinción y aun se desconocen sus propiedades y posibles usos en varios campos.

METODOLOGIA

La presente investigación se realizó probando el efecto de extractos acuosos de tejidos de las plantas silvestres estudiadas en el proceso de infección viral en un sistema modelo. El modelo empleado en el estudio fue la infección de la planta indicadora *Nicotiana glutinosa* con el virus del Mosaico del Tabaco (VMT), el cual produce lesiones locales fáciles de cuantificar y medir. Las plantas que se estudiaron para determinar la posible presencia de compuestos antivirales en las mismas fueron: *Astrophyton myriostigma*, *Coryphantha duranguensis*, *C. octacantha*, *C. radians*, *Ferocactus hamatacanthus*, *F. lastispinus*, *Mammillaria uncinata*, *Stenocactus coptogamus*, *Psidium guajava* y *Dianthus caryophyllus*. La última especie se utilizó como control debido a que ya se sabe que produce compuestos antivirales. A continuación se presenta un resumen de las diferentes etapas que se llevaron a cabo para la culminación del proyecto.

1. Aislamiento y propagación del virus para los bioensayos. Se utilizó el VMT variante U1. Este se propagó en *Nicotiana tabacum* cv. Santhi y se aisló mediante un proceso complicado que implica ultracentrifugación y precipitación diferencial. Antes de proceder a los bioensayos, el virus purificado se analizó por varios métodos para demostrar su pureza e integridad. Para este fin se utilizó el análisis electroforético y las pruebas inmunológicas conocidas como "dot blot" y "Western blot", así como pruebas de infectividad en *N. tabacum* cv. Xanthi.

2. Selección de la especie indicadora para los bioensayos. Se probaron 4 especies que producen síntomas locales cuando son infectadas con el VMT (*Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Chenopodium*

amaranticolor y *Nicotiana glutinosa*) para elegir aquella que respondiera a la infección de una forma más rápida y reproducible. Analizando el tiempo de aparición y la intensidad de los síntomas se eligió la especie *N. glutinosa* para los bioensayos. En esta etapa se determinó también la dilución más apropiada del virus, que resultó ser la de 1:50 a partir del aislado.

3. Preparación de los extractos vegetales. Se partió de tejidos cultivados "in vitro" de las especies antes mencionadas. El extracto se hizo macerando el tejido en una solución amortiguadora acuosa y centrifugando luego a 15 000 RPM por 15 min., luego de los cuales se recuperó el sobrenadante y se utilizó como extracto para los bioensayos. La elección de un extracto acuoso se fundamentó en el hecho de que la mayoría de los productos antivirales reportados son proteínas, que pueden desnaturalizarse y por lo tanto perder su actividad biológica con extracciones más drásticas.

4. Bioensayos. Estos se llevaron a cabo de dos maneras diferentes, primeramente se incubó "in vitro" el virus con el extracto durante 1 hora y luego se procedió a inocular la mezcla en la planta indicadora (tratamiento A). Esta prueba se realizó para determinar si el extracto tenía algún efecto sobre el virus en sí, como por ejemplo, un efecto aglutinante que impidiera la infección. El segundo grupo de experimentos se realizó impregnando las hojas de la planta indicadora con el extracto vegetal y posteriormente inoculando con el virus (tratamiento B). Esto para determinar si el extracto presente en la hoja impide de alguna forma el proceso de infección viral. En ambos casos se utilizaron como controles plantas inoculadas con el virus solo y con el extracto solo. Las variables que se analizaron fueron tiempo de aparición de los síntomas, número de lesiones locales por cm cuadrado de hoja y tamaño promedio de las lesiones locales producidas. La inoculación del virus se hizo de manera mecánica y la incubación de las plantas se realizó a 28 grados centígrados.

RESULTADOS:

En todos los casos, la aparición de las lesiones locales en las plantas indicadoras se observó a los 3 días de la inoculación, por lo que no hubo un efecto de los extractos en el tiempo de aparición de los síntomas. Por el contrario, varios de los extractos mostraron efectos muy notables en la reducción del número de lesiones locales producidas así como en el tamaño de las mismas. En cuanto a la disminución en el número de las lesiones locales, sobresalen los extractos de *Ferocactus hamatacanthus*, *F. lastispinus* y *Dianthus caryophyllus*, mientras que los extractos de *Astrophyton myriostigma*, *Coryphantha*

duranguensis, *Ferocactus hamatacanthus*, *F. latispinus* y *Dianthus caryophyllus* reducen el tamaño promedio de las lesiones producidas por el VMT. Es importante mencionar el hecho de que algunos extractos por sí mismos causan daños severos a las hojas tratadas por los mismos, por lo que su posible efecto antiviral queda enmascarado, en esta situación están los extractos de *Astrophyton myriostigma*, *Coryphantha radians*, *Mammillaria uncinata* y *Stenocactus coptogamus*, en estos casos los resultados obtenidos deben tomarse con reserva debido a lo indicado. En las figuras 1-4 se muestran los resultados de manera gráfica, nótese que en algunos casos la severidad de la infección al aplicar el extracto se reduce en más de un 70% comparándola con el control sin extracto.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:

Con el presente estudio se demostró la presencia de compuestos naturales con actividad antiviral en algunas especies de plantas silvestres mexicanas,

destacando en este sentido las cactáceas *Ferocactus hamatacanthus* y *F. latispinus*. Estos compuestos antivirales fueron capaces de reducir el número y/o tamaño de las lesiones locales producidas por la inoculación del VMT. Estos resultados abren perspectivas muy interesantes para el estudio y posterior aplicación de estos compuestos. El primer paso a seguir deberá ser la caracterización de los principios activos que le confieren las propiedades antivirales a las plantas estudiadas, para luego tratar de dilucidar su mecanismo de acción. Una vez conocidos estos aspectos, podrá evaluarse la posibilidad de dar un uso práctico a estos productos. En el caso de tratarse de compuestos de naturaleza proteínica otra posibilidad es el aislamiento de los genes responsables de su síntesis con el fin de transferirlos a sistemas bacterianos para la sobreproducción del compuesto, o bien a plantas para observar la respuesta de éstas ante las infecciones virales.

NOMBRE	ESPECIE	NATURALEZA QUIMICA
FBP	<i>Lentinus edodes</i>	PROTEINA
LENTEMINA	<i>L. edodes</i>	PEPTIDOGLUCANO
—	<i>Flammulina velutipes</i>	GLICOPROTEINA
KR-070	<i>Aspergillus oryzae</i>	GLICOPROTEINA
DIANTINA 30	<i>Dianthus caryophyllus</i>	GLICOPROTEINA
DIANTINA 32	<i>D. caryophyllus</i>	GLICOPROTEINA
PAP	<i>Phytolacca americana</i>	PROTEINA
PAP-II	<i>P. americana</i>	PROTEINA
PAP-S	<i>P. americana</i>	PROTEINA
—	<i>Chenopodium sp.</i>	PROTEINA
YLP	<i>Yucca recurvifolia</i>	PROTEINA
—	<i>Mirabilis jalapa</i>	PROTEINA

Tomada de Kobayashi y Col. 1987.

TABLA I. PRODUCTOS NATURALES AISLADOS DE HONGOS Y PLANTAS QUE HAN MOSTRADO PROPIEDADES ANTIVIRALES

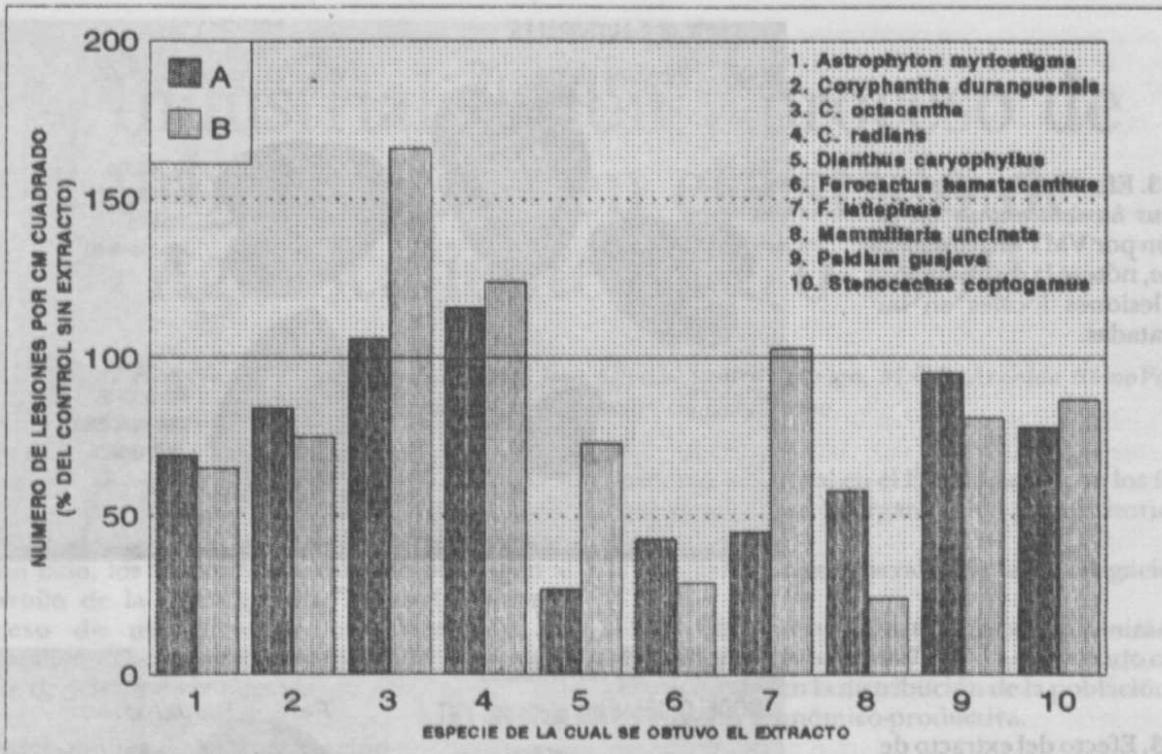


FIG. 1. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE 10 ESPECIES VEGETALES EN EL NUMERO DE LESIONES POR CM CUADRADO DE HOJA PRODUCIDAS POR EL VMT EN UNA PLANTA INDICADORA. A. TRATAMIENTO A, B. TRATAMIENTO B.

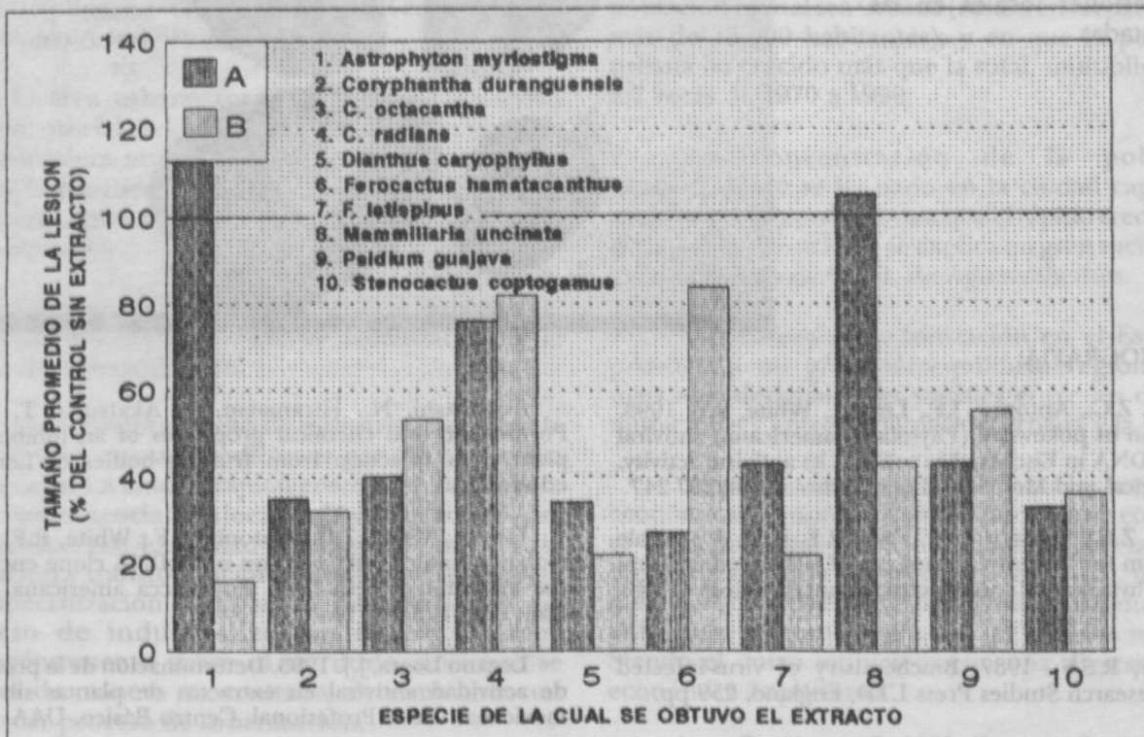


FIG. 2. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE 10 ESPECIES VEGETALES EN EL TAMAÑO PROMEDIO DE LAS LESIONES CAUSADAS POR EL VMT EN HOJAS DE PLANTAS INDICADORAS. A. TRATAMIENTO A, B. TRATAMIENTO B.

Fig. 3. Efecto del extracto de *Ferocactus hamatacanthus* en la infección por VMT en *Nicotiana glutinosa*, nótese la disminución de las lesiones locales en las hojas tratadas.

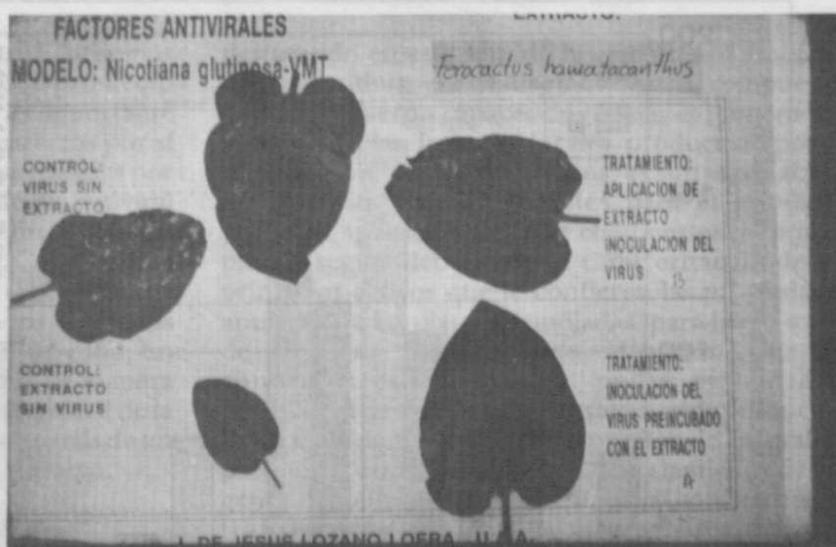
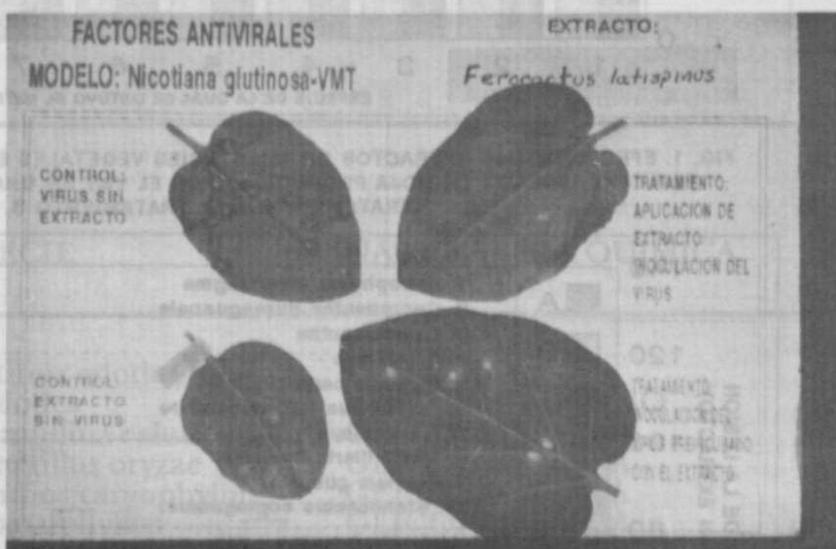


Fig. 3. Efecto del extracto de *Ferocactus latispinus* en la infección por VMT en *Nicotiana glutinosa*, nótese la disminución de las lesiones locales en las hojas tratadas.



BIBLIOGRAFIA:

Chen, Z.C., Antoniow, J.F., Lin, Q., White, R.F. 1993. Expression of pokeweed (*Phytolacca americana*) antiviral protein cDNA in *Eischerichia coli* and its antiviral activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42:237-247.

Chen, Z.C., Antoniow, J.F., White, R.F. 1993. A possible mechanism for the antiviral activity of pokeweed antiviral protein. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42:249-258.

Fraser, R.S.S., 1987. *Biochemistry of virus-infected plants*. Research Studies Press LTD, England, 259 pp.

Gutiérrez Campos, R. 1991. Protección Cruzada por Ingeniería Genética: Una nueva alternativa para el control de virus Fitopatógenos. *Investigación y Ciencia* 7:40-43.

Kobayashi, N., Hiramatsu, A. Akatsuka, T. 1987. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinus edodes*.

Lin, Q., Chen, Z.C., Antoniow, J.F., White, R.F. 1991. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the anti-viral protein from *Phytolacca americana*. *Plant Mol. Biol.* 17:609-614.

Lozano Loera, J.J. 1993. Determinación de la presencia de actividad antiviral en extractos de plantas silvestres mexicanas. Tesis Profesional. Centro Básico. UAA.

Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J., Van Hoof, L. 1986. Plant products as potential antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur* 84:101-147.