

Evaluación metabólica de una selección divergente de berza (*Brassica oleracea* var. *acephala*) para glucosinolatos en diferentes condiciones ambientales

P. Velasco¹, N. Abdilmotalb¹, M. Tortosa¹, C. Mollers², A. Ciruelos³, A. de Haro⁴, T. Johansen⁵, A. McAlvay⁶, C. Pires⁷ y V.M. Rodríguez¹

¹ Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC). Apartado 28, Pontevedra, España.

² Georg-August-Universität Göttingen. Göttingen, Alemania.

³ Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura. Ctra. Villafranco – Balboa. Badajoz, España.

⁴ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC). Alameda del Obispo, s/n. Córdoba, España.

⁵ Norwegian Institute of Bioeconomy Research (NIBIO). Apartado 115, Ås, Noruega.

⁶ University of Wisconsin-Madison. Lincoln Drive, Madison, WI, Estados Unidos.

⁷ University of Missouri. Columbia, MI, Estados Unidos.

Resumen

El género *Brassica* es el género más importante dentro de la familia *Brassicaceae*. Incluye varios cultivos con alta diversidad fenotípica y genotípica y son usados ampliamente como productos hortícolas, condimentos o aceites. *Brassica oleracea* incluye la mayoría de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica. El propósito del presente estudio fue la evaluación metabólica y agronómica de dos selecciones divergentes para el contenido en glucosinolatos en hojas de berza (alto y bajo sinigrina y alto y bajo glucobrasicina), en cinco ambientes diferentes. La selección por contenido en GBS tuvo un efecto considerable sobre el rendimiento de las variedades, siendo HGBS la variedad con pesos seco y fresco más altos, mientras que en la selección por SIN, fue LSIN quien mostró los mayores rendimientos. La relación entre los glucosinolatos y el comportamiento agronómico depende del tipo de glucosinolato analizado. Por otro lado, esta selección afectó al contenido en otros metabolitos. El análisis PLS-DA llevado a cabo para investigar y visualizar el patrón de cambios en los metabolitos exhibió una separación obvia entre las selecciones divergentes para GSL baja y alta tanto en sinigrina como en glucobrasicina. Los diez metabolitos más significativos en cada selección se identificaron tentativamente utilizando bases de datos públicas como Metlin. Entre los diferentes metabolitos identificados se encuentra algún glucosinolato diferente del de la selección (p.ej. neoglucobrasicina y glucoiberina) y algún compuesto fenólico como los derivados del kempferol.

INTRODUCCIÓN

El género *Brassica* es el género más importante dentro de la familia *Brassicaceae*. Incluye varios cultivos con alta diversidad fenotípica y genotípica y son usados ampliamente como productos hortícolas, condimentos o aceites. *Brassica oleracea* incluye la mayoría de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica. Este grupo de cultivos, llamado coles, presenta varios cultivares como repollo (*B. oleracea* subsp. *capitata*), coliflor (*B. oleracea* subsp. *botrytis*), coles de Bruselas (*B. oleracea* subsp. *gemmifera*), brécol (*B. oleracea* subsp. *italica*) o berza (*B. oleracea* subsp. *acephala*).

Los cultivos del género *Brassica* presentan un grupo característico de metabolitos llamados glucosinolatos, compuestos azufrados derivados de aminoácidos. Estos compuestos son reconocidos por sus efectos biológicos, entre los que se encuentran los efectos alelopáticos, resistencia a plagas y enfermedades y efectos anticarcinogénicos (Halkier y Gershenzon, 2006). Con el fin de determinar los efectos biológicos de variaciones en el contenido de dos glucosinolatos mayoritarios, en la Misión Biológica de Galicia se han desarrollado dos selecciones divergentes por alto y bajo contenido en glucosinolatos: Sinigrina (SIN), glucosinolato alifático derivado de la metionina y Glucobrassicina (GBS), glucosinolato indólico derivado del triptófano (Sotelo y col., 2016)

Los objetivos del presente estudio fueron:

- 1- Evaluación agronómica de las dos selecciones divergentes en cinco ambientes diferentes, Pontevedra, Badajoz y Córdoba en España, Gottingen en Alemania y Tromsø en Noruega, para valorar si el cambio en el perfil de glucosinolatos afecta al comportamiento agronómico de las variedades.
- 2- Evaluación metabolómica para identificar otros metabolitos que hayan variado con la selección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Semillas de las cuatro variedades provenientes de las selecciones divergentes: HSIN (alto contenido en sinigrina), LSIN (bajo contenido en sinigrina), HGBS (alto contenido en glucobrassicina), BGBS (bajo contenido en glucobrassicina) fueron sembradas en invernadero. En un estadio de cinco hojas 50 plantas por variedad y repetición se transplantaron al campo en un diseño en bloques al azar con dos repeticiones. Con las plantas plenamente desarrolladas (agosto-septiembre) se tomaron datos agronómicos (altura de planta y peso fresco y seco) y se recogieron hojas para el análisis metabolómico.

Las muestras de hoja fueron liofilizadas en el laboratorio y la extracción de metabolitos se llevó a cabo con una solución 80% metanol. Cinco μ l de cada muestra se inyectaron en un UHPLC (Thermo) – QTOF (Bruker) con ionización por electrospray (ESI). Los datos brutos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el software Profile Analysis de Bruker que permite la detección, alineamiento y corrección de picos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis PLS-DA (Metaboanalyst) para identificar los compuestos que son responsables de la separación de los grupos objeto de estudio. Posteriormente, estos compuestos fueron identificados utilizando diversas bases de datos como Metlin.

RESULTADOS

La selección por contenido en GBS tuvo un efecto considerable sobre el rendimiento de las variedades, siendo HGBS la variedad con pesos seco y fresco más altos, si bien la magnitud varía en los distintos ambientes. En el análisis de varianza se aprecia que hubo diferencias tanto entre localidades para ambos caracteres ($P < 0.001$) como en la selección ($P \leq 0.05$). La interacción L x V fue significativa para peso fresco aunque fue una interacción de orden y no lo fue para peso seco ($P = 0.039$ y $P = 0.138$). En la tabla 1 se muestran las medias por variedad en el conjunto de las localidades y por localidad para ambas variedades. La altura de planta sólo mostró diferencias significativas entre ambientes.

La selección por contenido en SIN mostró diferencias significativas entre ambientes ($P < 0.001$) y variedades ($P < 0.05$), para los caracteres peso fresco y peso seco, mientras que las interacciones no fueron significativas. LSIN tuvo mayor peso fresco y seco (Tabla 2), al igual que la altura donde las plantas de LSIN fueron ligeramente más altas que HSIN. Parece, por tanto, que la relación entre los glucosinolatos y el comportamiento agronómico depende del tipo de glucosinolato analizado.

Por otro lado, la selección por glucosinolatos puede afectar a otros metabolitos secundarios y que fuesen estos los verdaderos responsables de este comportamiento dispar. Por ello, se hizo un análisis metabolómico de ambas selecciones seguido de un análisis PLS-DA para investigar los cambios en el metaboloma entre las variedades altas y bajas de SIN y GBS. El gráfico mostró una separación dentro de cada selección. Los diez metabolitos más significativos en cada selección se identificaron tentativamente utilizando bases de datos públicas como Metlin.

Los dos primeros componentes en este modelo explicaron un 45% de la variabilidad para GBS y un 44% para SIN, lo que implica que más metabolitos, además de los glucosinolatos difieren en las selecciones. En cada selección se han seleccionado los metabolitos en base a su VIP-score –aquellos con un score mayor que 2- que están en proceso de identificación, aunque entre ellos se encuentra algún glucosinolato diferente del de la selección (p.ej. neoglucobrasicina y glucoiberina) y algún compuesto fenólico como los derivados del kempferol.

Referencias

- Halkier, BA, J Gershenzon. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 303-333.
- Sotelo, T, P Velasco, P Soengas, VM Rodríguez y ME Carrea. 2016. Modification of leaf glucosinolate contents in *Brassica oleracea* by divergent selection and effect on expression of genes controlling glucosinolates pathways. *Frontiers in Plant Science* 7: 1012.

Tabla 1. Caracteres agronómicos de la SD de GBS en los 5 ambientes.

Variedad	P Fresco (g)	P Seco (g)	Altura (cm)
HGBS	1562 a	171,9 a	51,59 a
LGBS	1341 b	145,1 b	51,38 a

Tabla 2. Caracteres agronómicos de la SD de SIN en los 5 ambientes.

Variedad	P Fresco (g)	P Seco (g)	Altura (cm)
HSIN	1428 b	158,9 b	50,37 b
LSIN	1707 a	197,1 a	54,73 a

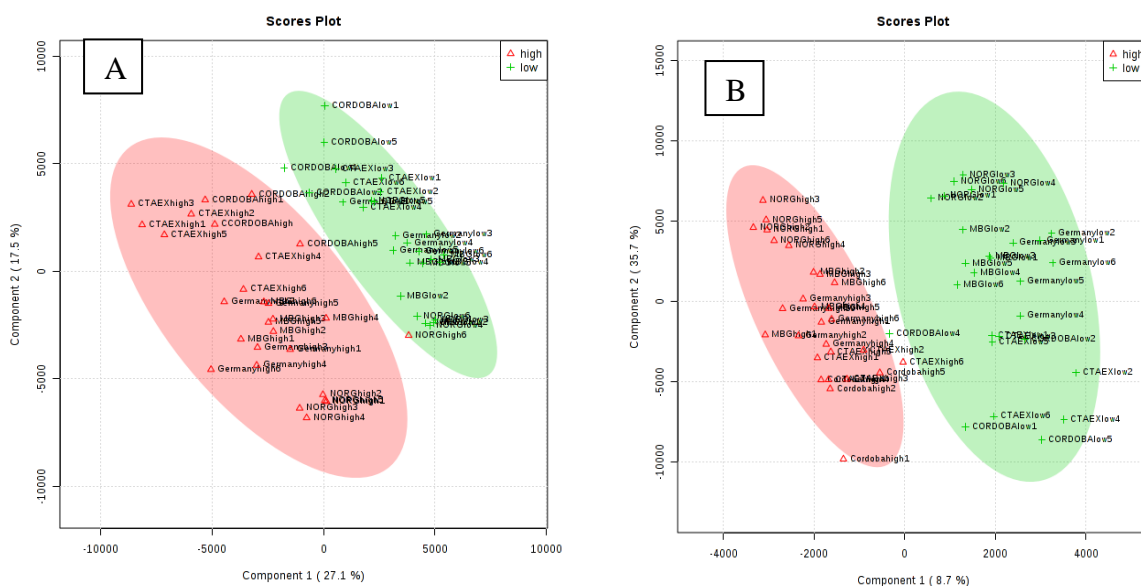


Fig. 1. Análisis PLS-DA para la selección de GBS (A) y SIN (B).