TESIS DOCTORAL

“Investigación de glucosinolatos presentes en crucíferas (*Brassica*) y su potencial aplicación industrial en la obtención de nuevos biocidas”

DOCTORANDO: D. Daniel Eugui Arrizabalaga.

DIRECTORES: Dr. Jorge Poveda Arias y Dra. Sara Caballero Berasategui.

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 6 de febrero de 2024. Sala Nicolás de los Salmones del Edificio de los Olivos (Universidad Pública de Navarra, Pamplona).

RESUMEN

Los glucosinolatos (GSLs) son compuestos presentes en las plantas de la familia de las brasicáceas, que han sido ampliamente estudiados debido a sus efectos beneficiosos para la salud humana. Además, se han descrito sus efectos inhibitorios sobre diversos patógenos vegetales, una vez que son hidrolizados por la enzima mirosinasa, tanto sobre bacterias como *Pseudomonas syringae* o *Xanthomonas campestris*, hongos y oomicetos como *Fusarium* sp., *Verticillium* sp. o *Pythium* sp., o incluso nematodos parásitos de plantas, como los pertenecientes a los géneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Globodera* o *Heterodera*.

La gran mayoría de trabajos previos del uso de estos compuestos en la protección de cultivos ha sido mediante biofumigación, enterrando restos de cosecha o tejidos vegetales de estas especies de plantas directamente en el suelo, para reducir la incidencia de las enfermedades causadas por estos patógenos. También se han realizado multitud de experimentos *in vitro* con los GSLs individuales o sus compuestos de hidrólisis. No obstante, pocos estudios se han basado en la obtención de extractos vegetales de estas plantas como herramienta en el control de enfermedades.

Por lo tanto, el presente Doctorado Industrial se basó en la obtención de extractos bioactivos de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) con capacidad de inhibición de patógenos en campo, a partir de residuos de cultivo. En primer lugar, se recogieron muestras de hoja de una misma variedad de brócoli de cuatro fincas diferentes, dos de ellas en manejo convencional y otras dos en manejo ecológico, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron congeladas a -80°C. El análisis inicial de estas muestras vegetales por UHPLC mostró un total de 5 GSLs diferentes: los alifáticos glucoiberina (GIB) y glucorafanina (GRA) y los indólicos glucobrasicina (GBS), metoxiglucobrasicina (MEOGBS) y neoglucobrasicina (NEOGBS). En cuanto a las diferentes entre ambos grupos, el brócoli ecológico mostró un mayor contenido en GSLs totales, específicamente en GIB y en GRA.

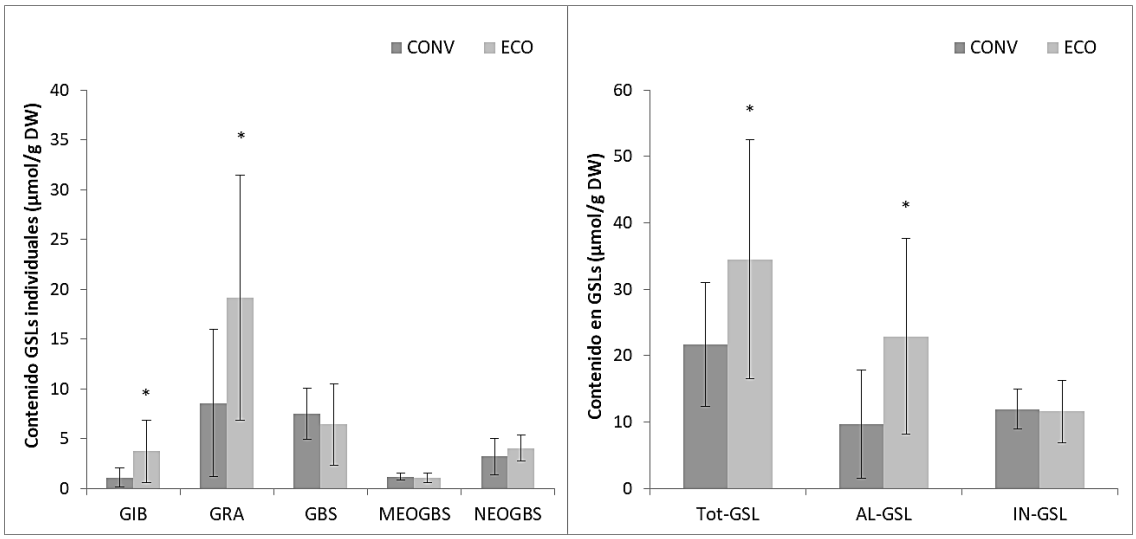

Figura 1: Contenido en GSLs individuales y agrupados. Individuales de izquierda a derecha: glucoiberina (GIB), glucorafanina (GRA), glucobrasicina (GBS), metoxiglucobrasicina (MEOGBS) y neoglucobrasicina (NEOGBS). Agrupados de izquierda a derecha: glucosinolatos totales (Tot-GLS), glucosinolatos alifáticos (AL-GSL) y glucosinolatos indólicos (IN-GSL).

A continuación, se obtuvieron un total de 16 extractos de brócoli mediante diferentes metodologías de extracción y se procedió a analizar el contenido en GSLs de cada uno de ellos. Además, ya que el proyecto se enmarca en un entorno de colaboración universidad-empresa, se valoró también la escalabilidad y la reproducibilidad industrial del proceso, estudiando la influencia de diversos factores de la extracción desde el punto de vista de su adopción industrial. Los resultados de la primera parte del trabajo indicaron que la extracción con metanol era más efectiva que la acuosa en la obtención de GSLs, mientras que la liofilización y las temperaturas de almacenamiento del material vegetal no tuvieron una influencia en el contenido extraído de estos compuestos. De esta forma, se obtuvo una metodología de extracción de residuos de brócoli efectiva y adaptable industrialmente y se seleccionaron 4 de los extractos de brócoli obtenidos para continuar la investigación.

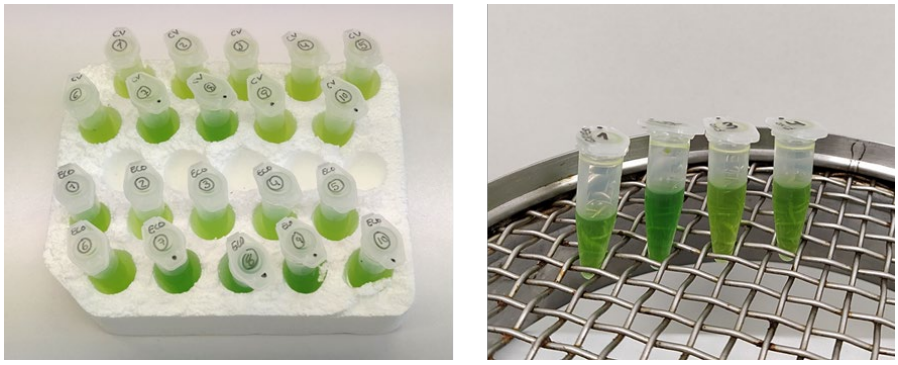

Figura 2: Extractos de brócoli obtenidos mediante diferentes metodologías.

En la segunda fase del trabajo, se estudió *in vitro* la bioseguridad y el efecto de los extractos de brócoli sobre el crecimiento de una colección de patógenos agrícolas, así como el papel de la enzima mirosinasa en su acción biocida. Tras eliminar el metanol de los extractos, se aplicaron a diferentes concentraciones sobre semillas de plantas cultivadas para estudiar la fitotoxicidad. Los extractos de brócoli ricos en GSLs resultaron tóxicos para la mayoría de semillas a concentraciones del 10% y superiores. Se determinó también la toxicidad celular de los extractos de brócoli mediante cultivo *in vitro* de la línea celular hepática HePG2 en presencia de diferentes concentraciones de los extractos seleccionados, determinando la viabilidad celular mediante tinción con bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). Los extractos no afectaron a la viabilidad celular a concentraciones inferiores al 50%, lo cual se consideró baja toxicidad celular, con la línea celular y el diseño experimental utilizados.

Se determinó la capacidad de los extractos de brócoli seleccionados para inhibir el crecimiento de una colección de hongos y oomicetos fitopatógenos *in vitro* en medio de cultivo sólido y líquido. Los extractos de brócoli fueron capaces de inhibir el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos como *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* o *Sclerotinia sclerotiorum*, mientras que no redujo el crecimiento de oomicetos. Se añadió también la enzima mirosinasa a los extractos, para producir compuestos de hidrólisis de GSLs y se observó como los extractos hidrolizados tenían mayor efecto inhibitorio.

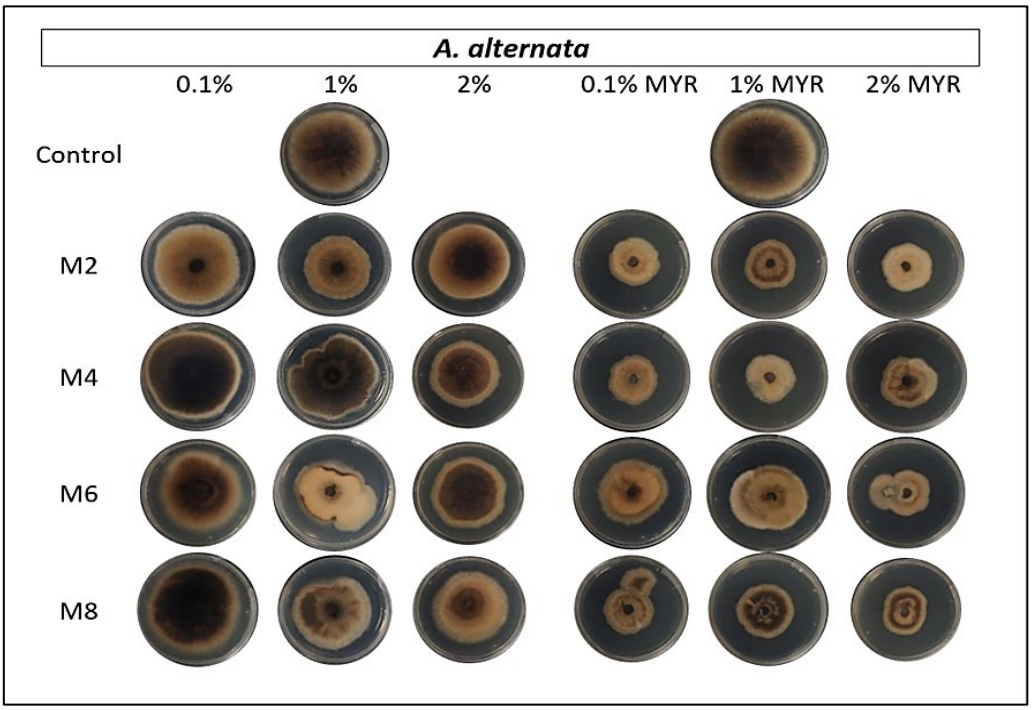

Figura 3: crecimiento de Alternaria alternata en presencia de diferentes concentraciones de extractos de brócoli (M2, M4, M6 y M8), solos o hidrolizados con la enzima mirosinasa (MYR).

Se estudió el efecto de los extractos de brócoli sobre el nematodo fitoparásito *Meloidogyne javanica in vitro*, tanto en la mortalidad de su estadio móvil J2 como sobre la eclosión de sus huevos y no tuvo ningún efecto a las concentraciones utilizadas. Tampoco redujeron el número de agallas en plantas de tomate *in vitro*.

En la última fase se realizaron experimentos en condiciones cercanas a las reales con los extractos frente a podredumbre de fruta en etapa de postcosecha y en la infección de patógenos radiculares en plantas de tomate en invernadero. Los extractos de brócoli lograron reducir la enfermedad causada por los patógenos en invernadero y también disminuir la podredumbre causada por *Botrytis cinerea* en tomate Cherry, manzana Golden y uva de mesa. Por último, se realizaron cuatro experimentos con tomate de invernadero infectado con cuatro hongos patógenos de suelo diferentes (*F. oxysporum*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *V. dahliae*) y tratados posteriormente con extracto de brócoli en la zona radicular. La aplicación del extracto de brócoli redujo significativamente los síntomas de la enfermedad en las plantas y produjo un aumento en el vigor, el desarrollo y la biomasa de las mismas frente a las plantas no tratadas.

Figura 4: Plantas de tomate del ensayo de infección con patógenos en invernadero.

Este trabajo confirma la viabilidad de la estrategia de aprovechamiento de residuos de brócoli para la obtención de extractos bioactivos en la protección de cultivos frente a diversos patógenos de suelo y aéreos, desde la industrialización del proceso hasta su eficacia en condiciones cercanas a las reales.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Poveda, J., Eugui, D., & Velasco, P. (2020). Natural control of plant pathogens through glucosinolates: An effective strategy against fungi and oomycetes. Phytochemistry Reviews, 19, 1045-1059.

Eugui, D., Escobar, C., Velasco, P., & Poveda, J. (2022). Glucosinolates as an effective tool in plant-parasitic nematodes control: Exploiting natural plant defenses. Applied Soil Ecology, 176, 104497.

Eugui, D., Velasco, P., Abril-Urías, P., Escobar, C., Gómez-Torres, Ó., Caballero, S., & Poveda, J. (2023). Glucosinolate-extracts from residues of conventional and organic cultivated broccoli leaves (*Brassica oleracea* var. *italica*) as potential industrially-scalable efficient biopesticides against fungi, oomycetes and plant parasitic nematodes. Industrial Crops and Products, 200, 116841.

AGRADECIMIENTOS

Quería mostrar mi sincero agradecimiento a todas las personas con las que he tenido el placer de colaborar y aprender en este Doctorado Industrial, en especial a Alicia Fernández y Jon Veramendi de la Universidad Pública de Navarra, a Carolina Escobar, Patricia Abril y Óscar Gómez de la Universidad de Castilla-La Mancha, a Pablo Velasco y Víctor Rodríguez de la Misión Biológica de Galicia. También quiero agradecer al Grupo Delso Fertilizantes su apuesta por este proyecto.

***Fotografía del acto de lectura y defensa**. De izquierda a derecha: Jorge Poveda Arias (Director, Universidad de Valladolid), Óscar Santamaría Becerril (Vocal, Universidad de Valladolid), Fernando González Andrés (Presidente, Universidad de León), Daniel Eugui Arrizabalaga (Doctorando), Alicia Fernández San Millán (Secretaria, Universidad Pública de Navarra) y Sara Caballero Berasategui (Directora, Delso Fertilizantes). La Tesis Doctoral fue calificada con sobresaliente Cum Laude.*