

ESTUDIO DE LAS BASES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LA
RESISTENCIA CONTRA LA INFECCIÓN DE *ASPERGILLUS*
PRODUCTORES DE AFLATOXINAS EN LA SEMILLA DE MANÍ.

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Bioq. VIRGINIA MÜLLER



CIBICI-CONICET

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

2014

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Siglas: R-T
Temperatura: 589.2
M
N.º de 12401
A:
P: Del Autor
Pr:
E:
U:
LUG:
Región:
Fecha de: 4/7/14

Xp	Xp		
----	----	--	--



Director de Tesis:

Dr. Ramón Asis

Evaluador Externo:

Dr. Sebastián Asurmendi

Comisión de Tesis:

Dr. Carlos Argaraña

Dra. Nancy Ferreyra

Dr. Daniel Wunderlin



A mis nonos, quienes

marcaron el significado del

amor y del respeto en mi

historia...

AGRADECIMIENTOS

Opté por el *amor* y la *gratitud* hacia aquellos seres que aparecieron en medio de este proceso para acompañarme en el aprendizaje, porque como decía un sabio Doctor: “*la luna siempre está, lo que falta es poesía*” (ML, 2012).

Momento de balance, balanza que ha quedado negativa a tantos sueños más ha potenciado innumerables aspectos personales que yacían esperando su turno en tiempo y espacio. Solo me resta plasmar en papel lo que ya les he expresado oportunamente, aunque de más nunca esté reiterarlo:

Gracias!!!

Al Doc Aldao, quien me abrió las puertas de su laboratorio, gran hombre, íntegro, responsable, cariñoso, quien sobre todo me enseñó que era posible trabajar en armonía, y que al frustrarse con un experimento siempre había un mate esperándome para reconfortarme.

Al Director y a la Comisión de Tesis por sus palabras acertadas y su guía a lo largo de todos estos años.

A CONICET por confiar en mí, por apostar a mi capacidad y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba por permitirme ser parte del *staff*.

A Vale, por heredarme, por tu tiempo que nunca te sobra, pero que generosamente lo invertís en ayudar a un colega! Por tus palabras, tus consejos, tu sabiduría, tu cordura, tu dulzura y tu tranquilidad contagiosa.

A mis compañeros de bromato por los comienzos, por lo que fuimos, por la época de los *afters*, de las caminatas en las sierras, cuando teníamos tiempo de preguntarnos como estábamos, como habíamos pasado el *finde*, cuando mirábamos al costado y sabíamos que no estábamos solos. A Verito, que paciencia hasta que aprendí a usar el *HPLC*! A Romi, Magda, Luquitas, Rocío, Euge, Mari, Naty y la genia de los programas Lid. A las biólogas por el entusiasmo atropellador por momentos, las risas agudas, la mirada desde otro punto: Noe, Ange y Laurita.

A todos y cada uno de los miembros del CIBICI porque en más de una ocasión pedí ayuda y allí estuvieron. A los chicos de practicanato por las técnicas compartidas, los reactivos prestados, a Vachu porque una sonrisa cambia el día de cualquiera.

A la gente del Cequi, por los préstamos, los datos, los *tips*: a Silvita, Flor, las chicas *real time* Ceci y Mari Núñez por sus consejos y su maravillosa predisposición, a Germán por sus abrazos y su pasión para vivir intensamente!!!

A quienes fueron mis alumnos porque me enseñaron a enamorarme de la docencia, a estar siempre actualizada, a reírme con sus ideas, a recordar lo que fue ser alumno y no olvidarme nunca, que si el docente existe es porque del otro lado una persona quiere aprender con el entusiasmo propio de la juventud.

A mi familia, aquellos seres que me contuvieron, me alentaron, me bancaron cuando comencé sin destino el sinuoso camino de la investigación. Gracias a mis viejos, por enseñarme el valor de la palabra, la pasión por el trabajo y el poder de la responsabilidad. Gracias por las largas charlas, por los silencios eternos donde nos inculcaron la libertad para arriesgarnos. A mi nono, quien hoy sería el hombre más feliz del planeta por su nieta, por los *papers* que leí en voz alta en tu compañía mientras mateábamos. A mi tío, ejemplo de alegría eterna, diversión del niño mezclada con la nostalgia del adulto. A mis hermanos por sus risas, por su apoyo continuo, por las gastadas a diario; Negro: hombre de pocas palabras pero puro corazón; Lu: chispita continua, intensa, práctica, sensible, fuerte. A mi ahijada Giovana, por tu ingenuidad, por tu mirada rebelde y desestructurada de la realidad. A Noe, por estar siempre, por hacer salir a la niña interior. A mi madrina, aquella gran mujer que mi corazón eligió, porque no recuerdo un momento de mi vida, donde no hayas estado. Qué más puedo decirles a ustedes que no les haya dicho ya?

A mis amigos brasileros, quienes me reciben como una más de la familia, intensos, apasionados, expectantes, motivadores, cariñosos, por hacerme sentir en casa en cada oportunidad: Vivi, Jacir, Marilda, Nereu, Rô, Edú, Adriano, Giselle, Sandro, Elías, Dona Maria, mi querida Nerilda, mujer luchadora, fuerte y esperanzadora si las hay, y a todos los niños de la familia que cada año son más....

A mi profe de Portu y amigo, Victor Giagetto, a quien le debo todo lo que sé de *essa língua maravilhosa, quem me fez apaixonar pelo sotaque, pelas palavras, por ser você quem me falou pela primeira vez da pesquisa.*

A Pau por acompañarnos mutuamente cuando decidimos dejar de fingir no saber! Por las tardes, las catarsis, las risas sin motivos, las salidas, las críticas y los consejos. A Juli por la alegría contagiosa y tu inmensa predisposición siempre. A mi amiga del alma Loly por tantas horas de compañía a lo largo de esta tesis. Isa, por el compartir del *gym*, de almuerzos con ironías, las búsquedas y sus conclusiones, las salidas y los eternos *mails* a través de todos estos años, por el toque de *glamour* con el que pintas las horas a tu lado. A Silvi Aguirre, por enseñarme con tu experiencia, por escucharme, por prepararme para el próximo paso mientras caminamos.

A los amigos que la muni me dejó: Dani De Julis, desde aquella primera charla telefónica supe que nuestros caminos podrían estar cruzados, paralelos u opuestos, pero que estaríamos ahí para el otro, por las palabras de amor, de cariño, de sinceridad, por invertir tu tiempo para que fuese una experta en el estatuto, desayunara bien y me dejara cuidar. José, mi amigo de otra vida! Cuántas charlas de política, de religión, cuántos te quiero hubo en un año! Por comprometerte con mi causa como si fuese la tuya, por pensar y pensar juntos para encontrar otra mirada, por mostrarme que todo, absolutamente todo, hasta el milagro de la vida es un *PROCESO*, con la connotación emocional que esa palabra posee sobre tu historia... Caro! Modelo de super poderosa, laburante por naturaleza, bioquímica de vocación y elección, gracias por creer en mí y por confiar en mi capacidad...

A Marcelo, por las mil horas, si no es que fueron más!!! Por tu eterna sabiduría, por tu compromiso con mi causa, por mostrarme el camino del respeto, por hacerme valer lo que valgo, por ayudarme a redescubrir cada una de mis cualidades. Por ver más allá y ayudarme a reencontrarme con mi esencia resguardada.

A los chicos de escalada por creer y hacerme creer, por confiar y dejarme confiar, por las horas disfrutadas con ustedes entre *boulders* y charlas.

A Ger mi gran compañero, por intentar no dejarme caer cada vez que me caí, por comprender que no tuve un trayecto simple, fácil ni planificado, por ayudarme a ver las cosas buenas en medio del diluvio. Qué hubiese sido de mis PCR, de los análisis de secuencias, de los geles sin los mates y las discusiones mediante; con la mirada del biólogo, la dedicación incondicional aun en la distancia y el amor de los amigos....

Y a todos aquellos, a quienes les hicieron creer que no podían... porque el reflejo de otra historia hizo replantearme la mía para llegar luego a poder.

Hubo piedras y caídas como en todo proceso, agradezco a quienes intentaron evitarlas y a quienes las motivaron, desconociendo que fomentaban mi fortaleza y mi perseverancia. Gracias, gracias, gracias a aquellos seres por tantas historias escuchadas, por el esfuerzo que hicieron por entender qué era un tegumento, qué le había pasado a la semilla con el hongo, aunque solo sabían que el maní es el que nos acompañó siempre con las cervezas que nos tomamos durante todos estos años...

Tenías razón, la luna siempre está, lo que falta es poesía.... Gracias por devolverme la poesía!!!

INDICE

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	v
I- INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	
1. Introducción.....	1
2. Hipótesis.....	11
3. Objetivo General.....	11
4. Objetivos Específicos.....	11
II- MATERIALES Y MÉTODOS	
1. VÍA DE LIPOXIGENASAS.....	13
1.1. Diseño experimental: Ensayo de cinética de infección.....	13
1.2. Determinación de la actividad de Lipoxigenasas.....	16
1.2.1. Extracción de la enzima y los aceites.....	16
1.2.2. Determinación de la actividad de Lipoxigenasas.....	16
1.3. Análisis de regio especificidad de Lipoxigenasas.....	17
1.4. Cuantificación de productos de Lipoxigenasas por GC-MS.....	18
1.5. Determinación de acidez en aceites.....	19
1.6. Cuantificación de hidroperóxidos en aceites.....	20
1.7. Cuantificación de aflatoxinas por HPLC.....	20
1.8. Análisis de expresión génica.....	22
1.8.1. Extracción de ARN y síntesis de ADN.....	22
1.8.2. Diseño de cebadores.....	23
1.8.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.....	24
1.9. Secuenciación de genes candidatos en la vía de Lipoxigenasas.....	26
1.10. Análisis estadístico.....	27
2. VÍA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.....	27
2.1. Diseño experimental: Ensayo de infección a tiempo final.....	27
2.2. Separación por cromatografía de intercambio iónico.....	29
2.3. Separación por cromatografía de filtración molecular.....	30
2.4. Determinación de la actividad inhibitoria de tripsina.....	31
2.5. Ensayo anti fúngico.....	31
2.6. Análisis de fracciones proteicas por electroforesis en gel de poliacrilamida	32
2.7. Análisis de actividad enzimática por zimografía reversa.....	33
2.8. Separación de las fracciones seleccionadas por electroforesis	
bidimensional.....	34
2.9. Análisis por MALDI-TOF/TOF.....	36
2.10. Análisis de expresión génica en el transcurso de la infección.....	36
2.11. Secuenciación de los genes candidatos de la Vía de Inhibidores de	37

Proteasas.....	
2.12. Análisis estadístico.....	38
III- CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE LIPOXIGENASAS	
1. Antecedentes bibliográficos.....	39
2. Objetivos.....	44
3. Resultados.....	44
3.1. Ensayo de cinética de infección.....	44
3.2. Determinación de la actividad de Lipoxigenasas.....	48
3.3. Análisis de regio especificidad de Lipoxigenasas.....	48
3.4. Determinación de acidez en aceites.....	53
3.5. Cuantificación de hidroperóxidos en aceites.....	55
3.6. Cuantificación de aflatoxinas por HPLC.....	57
3.7. Análisis de genes candidatos.....	58
3.7.1. Selección de genes candidatos.....	58
3.7.2. Análisis filogenético de genes candidatos.....	64
3.7.3. Análisis de expresión génica.....	68
4. Discusión y Conclusiones.....	70
IV- CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS	
1. Antecedentes bibliográficos.....	77
2. Objetivos.....	80
3. Resultados.....	80
4. Discusión y Conclusiones.....	107
V- ENSAYOS A CAMPO	
1. Antecedentes bibliográficos.....	112
2. Objetivos.....	115
3. Campaña 2007-2008 y 2008-2009 Tolerancia a <i>Aspergillus spp</i>	116
3.1. Infección interna.....	118
3.2. Resultados y Discusión.....	118
3.2.1. Campaña 2007-2008 Tolerancia a <i>Aspergillus spp</i>	118
3.2.2. Campaña 2008-2009 Tolerancia a <i>Aspergillus spp</i>	120
3.3. Conclusiones.....	120
4. Campaña 2011-2012 Tolerancia a <i>Aspergillus spp</i>	121
4.1. Resultados y Discusión.....	123
4.2. Conclusiones.....	129
VI- CONCLUSIONES FINALES	131
BIBLIOGRAFÍA	136
PUBLICACIONES	158

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxiribonucleico

ADNc: ácido desoxiribonucleico complementario

ANOVA: análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

Ct: *threshold cycle*, ciclo de PCR donde ocurre un aumento en la fluorescencia sobre el nivel de fondo

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

GADPH: gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa

GC-MS: *gas chromatography–mass spectrometry*, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

HPLC: *high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta precisión

9-HODE: ácido 9 hidroxioctadeca-10,12-dienoico

13-HODE: ácido 13 hidroxioctadeca-9,11-dienoico

9-HPODE: ácido 9-hidroperoxioctadeca-10,12dienoico

13-HPODE: ácido 13-hidroperoxioctadeca-9,11dienoico

IES: isoelectroenfoque

IP: inhibidores de proteasas

LD: límite de detección

LQ: límite de cuantificación

LOX: lipoxigenasa

M-MLV: *Moloney Murine Leukemia Virus*

NADHD: nicotidamida adenina dinucleotido deshidrogenasa

ORF: *open reading frame*, marco abierto de lectura

PBS: solución tampón fosfato salino

PDA: agar papa dextrosa

SDS-PAGE: *sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sodio

RESUMEN

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue identificar y comprender los mecanismos de resistencia de la semilla de maní frente a la infección con *Aspergillus* que permitan evitar la contaminación con aflatoxinas a campo, a través de la búsqueda de cultivares resistentes. Para ello el estudio fue dividido en la caracterización de dos vías de defensa: la de las lipoxigenasas (LOX) y la de los inhibidores de proteasas (IP).

Los resultados obtenidos permitieron establecer una infección diferencial entre los cultivares ensayados. Las semillas del cultivar resistente Pi 337394, presentaron alta tolerancia a la infección con *Aspergillus parasiticus* y a la contaminación con aflatoxinas, mientras que las semillas del cultivar susceptible Florman mostraron elevada susceptibilidad.

El análisis de la Vía de la LOX durante el proceso de infección a través de los estudios bioquímicos y moleculares realizados permitió afirmar que los productos de la LOX, 9-HPODE y 13-HPODE, actuarían como factores de resistencia y susceptibilidad respectivamente. Con la finalidad de dilucidar el control transcripcional de la vía en ambos cultivares durante la infección, fueron analizadas las expresiones de genes de LOX 2-3, LOX 4 y LOX 5. La resistencia a la infección aparenta estar relacionada a la respuesta temprana de 9-HPODE y de 13-HPODE, mediada por la expresión génica de las LOXs tipo 9-LOX y 13-LOX respectivamente. En el presente trabajo fueron propuestas dos nuevas LOXs: LOX 4 y LOX 5 como responsables de dichas acciones. Mientras que una respuesta meramente de una 13-LOX como es el caso de la LOX 2-3, estaría induciendo la infección.

Por otra parte, la profundización en el estudio de la vía de IP permitió concluir que el cultivar resistente presentó actividad inhibitoria de tripsina incrementada. La identificación del perfil proteico con actividad inhibitoria demostraron diferencias entre ambos cultivares. En el resistente, fueron reconocidos los inhibidores de tripsina tipo

Kunitz y tipo *Bowman-Birk* (BBTI) AI, AII, BI y BIII, mientras que en cultivar susceptible solo se encontró el inhibidor de tripsina tipo *Bowman-Birk* BIII y un inhibidor de proteasas.

En cuanto a los estudios a campo de las vías de defensa se pudo concluir que la infección a campo con *Aspergillus* en semillas de maní resultó ser compleja y altamente dependiente de variables que no pudieron ser totalmente controladas como es el caso del estrés hídrico. El régimen de lluvia y aguas subterráneas afectaron el parámetro, junto con las temperaturas y otras variables no identificadas como la flora competente. La caracterización de la resistencia a la infección con *Aspergillus* y contaminación con aflatoxinas en el ensayo a campo, corroboró la descripción propuesta donde el cultivar Pi 337394 fue resistente y el Florman susceptible. Situación coincidente con la encontrada en los ensayos realizados *in vitro*. En lo referente a la Vía de la LOX, se demostró que a campo los cultivares del modelo de estudio propuesto han presentado diferencias en términos de expresión génica. De acuerdo a los resultados de la Vía de IP, el cultivar Florman presentaría en el momento de la cosecha una mayor respuesta a la infección, sin embargo la misma sería insuficiente como para inhibir la infección.

ABSTRACT

The overall aim of this Doctoral Thesis was to identify and understand the mechanisms of resistance of peanut seeds against infection with *Aspergillus* that avoid aflatoxin contamination in the field, through the search for resistant cultivars. This study was divided into the characterization of two defense pathways: the lipoxygenase (LOX) and the protease inhibitors (PI).

The results obtained allowed to establish a differential infection among the tested cultivars. The seeds of PI 337394 cultivar showed high tolerance to infection with *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin contamination, while seeds of Florman cultivar showed high susceptibility.

Analysis of LOX pathway among infection through biochemical and molecular studies allowed claiming that the products of LOXs, 9-HPODE and 13 -HPODE, act as factors of resistance and susceptibility respectively. In order to elucidate the transcriptional control in both cultivars during infection, were analyzed gene expressions of LOX 2-3, LOX LOX 4 and 5. Resistance to infection appears to be linked to the early response of 9-HPODE and 13-HPODE, mediated gene expression of type 9- LOX and 13 -LOX respectively. In this work two novel genes were proposed: LOX 4 and 5 as the responsible for such actions. While a response of 13 -LOX such as LOX 2-3, would induce infection.

The study of IP demonstrated that the resistant cultivar showed increased trypsin inhibitory activity. Identification of the protein profile with inhibitory activity showed differences between cultivars. Trypsin inhibitor *Kunitz* and *Bowman-Birk* type (*BBTI*) AI, AII, BI and BIII were found in resistant cultivar while in susceptible cultivar only trypsin inhibitor *Bowman -Birk* BIII and a protease inhibitor were found.

In field studies, *Aspergillus* infection in peanut seeds revealed to be complex and highly dependent on variables that could not be fully controlled. The regime of rain and groundwater affected parameter, along with temperatures and other variables not identified as the competent flora. Characterization of resistance to *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination in the field, demonstrated the hypothesis that Pi 337394 cultivar was resistant and Florman was susceptible. Coincident with the situation found in the *in vitro* tests. LOX pathway, demonstrated differences in gene expression between both cultivars. The results obtained in IP studies revealed that Florman cultivar present in the harvest a greater response to infection, but it would be insufficient to inhibit *Aspergillus* infection and aflatoxin contamination.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

I-INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es uno de los cultivos leguminosos más importantes del mundo. Su origen se relaciona a Sudamérica, donde el género *Arachis* está ampliamente distribuido, principalmente en Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay.

La planta de maní es un miembro de la familia *Leguminosae* perteneciente al género *Arachis* L (tribu *Aeschynomeneae*, subtribu *Stylosanthinae*), que cuenta con dos subespecies: *hypogaea* y *fastigiata*, cada una de ellas con diversas variedades. La clasificación se encuentra basada en la posición de las flores sobre el eje central, el tipo de ramificación alternada o secuencial, la distribución de los tricomas sobre los folíolos, la morfología del fruto y el número de semillas (Krapovickas y Gregory, 1994).

Arachis hypogaea es una hierba anual con hábito de crecimiento indeterminado de porte erecto, semi erecto o rastrero; que florece en la superficie del suelo y que produce frutos hipógeos a través de la penetración del clavo en el suelo (**Figura I.1**).



Figura I.1: Imagen fotográfica de la planta de *Arachis hypogaea* con frutos.

El sistema radicular está formado por una raíz principal y raíces laterales que salen a diferentes alturas de la principal. Es común la presencia de nódulos producidos por simbiosis con *Rhizobium leguminosarum* para la fijación de nitrógeno atmosférico.

El eje central de la planta es siempre erecto y puede tener inflorescencias (tipo botánico Valencia y Español) o no (tipo botánico Virginia). Las ramas secundarias pueden ser erectas, rastreras o intermedias. Una vez producida la fecundación, se alarga la base del ovario generando una estructura denominada *clavo* que lleva en su extremo los óvulos fecundados. El clavo se dirige hacia el suelo donde se entierra y se transforma en el fruto, denominado *caja* (Figura I.1). Los frutos son indehiscentes, es decir que su cubierta (pericarpio) no se cae espontáneamente al alcanzar la maduración. El pericarpio está formado por tres capas de tejidos: exo, meso y endocarpo. En etapas tempranas de su desarrollo los frutos conteniendo de 1 a 5 semillas pueden absorber agua y nutrientes, entre estos calcio principalmente. En la Figura I.2. se observa la anatomía del fruto y de la semilla.

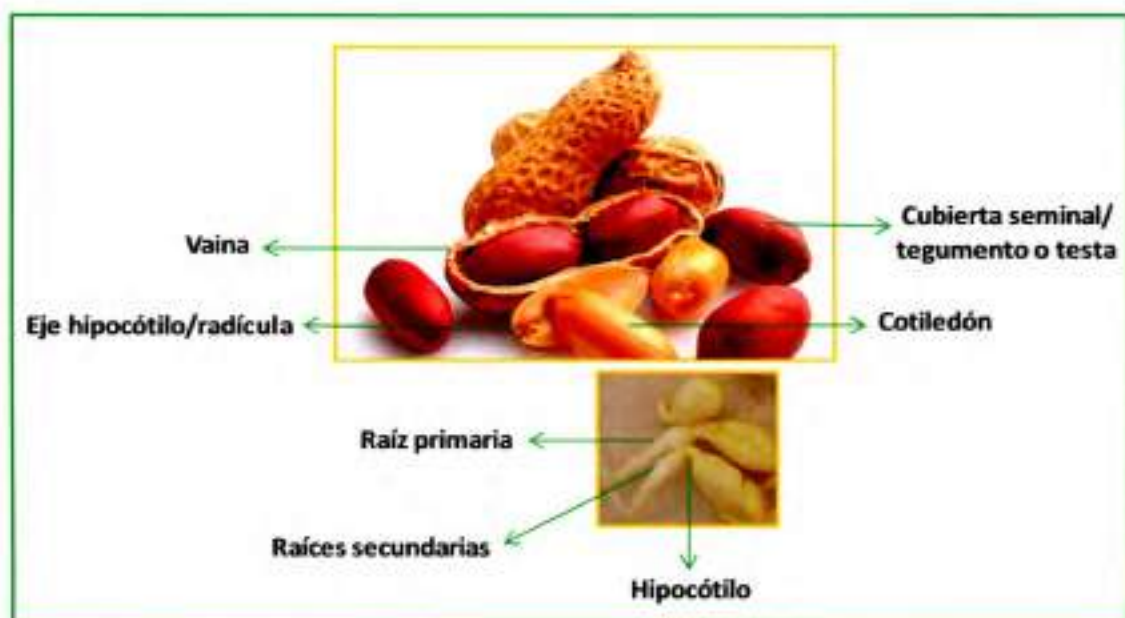


Figura I.2: Esquema representativo de la anatomía del fruto y semilla de maní.

Las semillas son alargadas o redondeadas, con tegumento muy delgado y poseen como característica el extremo correspondiente a la radícula muy expuesto, lo cual predispone a la ocurrencia de daño mecánico. El peso de la semilla puede variar entre 0,3 a 1,5 g.

Resumiendo, cada vaina o caja (tejido proveniente del ovario y con máximo desarrollo cuando se lo encuentra bajo tierra) consta de 2-5 semillas, las cuales se encuentran formadas por dos cotiledones, un hipocótilo, una radícula y un testa o tegumento (Rao, 1994).

En la actualidad, la región manisera de la Argentina se compone de unas 220.000 hectáreas en la provincia de Córdoba; unas 30.000 hectáreas en San Luis y La Pampa y unas 10.000 distribuidas entre Salta y Jujuy (Cámara Argentina de Maní, 2013).

El mayor productor a nivel mundial de maní en los últimos años ha sido China, con una producción promedio de 14 millones de toneladas, sin embargo solo menos del 5% es exportable. El segundo productor con 2 millones de toneladas de maní en caja es Estados Unidos, y su exportación también es despreciable debido al elevado consumo interno. La Argentina se ha convertido en uno de los mayores exportadores, con cerca de 500.000 toneladas enviadas a 88 países, el 65 % de las cuales se dirigen hacia la Unión Europea (principalmente Holanda, Alemania, Inglaterra, España, Italia, Grecia y Francia), y el resto se reparte entre Estados Unidos, Canadá, México, Emiratos Árabes, Sudáfrica, Brasil, Australia, Chile, Rusia, Argelia, Ucrania, China, India, Jordania, Taiwan, Japón y Tailandia entre otros. Las exportaciones no solo cuentan con granos, sino también con maníes para confitería (*Shelled, Blanched, Splits*), maníes preparados y/o saborizados, pasta, manteca, grana de maní, y unas 60.000 toneladas de aceite de maní y subproductos, como harina y *pellets* (Cámara Argentina del Maní, 2013).

El lugar preponderante que ocupa en la actualidad el cultivo y la producción de maní en la provincia de Córdoba, en conjunto con actividades relacionadas a dicha industria tales como proyectos de investigación y desarrollo de cultivos, tecnologías de apoyo a la

producción, maquinarias agrícolas y transporte; han generado un movimiento económico en amplio crecimiento. Estos factores junto con políticas de buenas prácticas de manufactura, han posicionado al cultivo nuevamente. En el año 2012, la Legislatura unicameral cordobesa aprobó la Ley de Protección de la Denominación de Origen Maní de Córdoba. De esta manera se corrobora la alta calidad que desde hace años posee internacionalmente la producción local.

Para el abastecimiento sostenido en calidad y cantidad a los mercados externos, la selección de terrenos, el control de plagas y la utilización de cultivares resistentes a las mismas constituyen los aspectos más importantes a tener en cuenta.

La rentabilidad del cultivo de maní depende del rendimiento y de la calidad del producto cosechado. Los principales factores del manejo del cultivo son entre otros: elección del lote, rotación de cultivos, fertilidad y laboreo del suelo, elección del cultivar, implantación del cultivo, control de malezas, insectos y enfermedades, riego suplementario, arrancado, cosecha, secado y almacenamiento (Pedelini, 2012). Los suelos sueltos son los más adecuados ya que el clavo penetra fácilmente, produce vainas de buen tamaño, se arranca sin dificultad. Sin embargo estos suelos arenosos, tienden a ser propicios para la sequía, al secarse comienza a limitarse el acceso de nutrientes esenciales como el calcio, sobre todo durante el periodo de llenado de las vainas. La rotación de cultivos se torna necesaria, dado que el maní responde de mejor manera a la fertilización residual del cultivo anterior que a la aplicación directa (Pedelini, 2008). Los minerales requeridos para un cultivo adecuado son nitrógeno, fósforo, potasio y calcio, todos afectados por los procesos de sequía, en términos de su disponibilidad (Pedelini, 2012).

Dentro de las enfermedades que producen mayores pérdidas de calidad de los cultivos de maní, se encuentran las relacionadas a hongos ambientales, tal es el caso del *Aspergillus spp.*, quien genera metabolitos secundarios capaces de contaminar las semillas. Las especies del género *Aspergillus*, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo, aislándose con mayor frecuencia en climas templados y subtropicales (Klich, 2003). Este género pertenece a la clase *Hifomicetes* de la subdivisión

Deuteromicotina, división *Deuteromicota*. La subdivisión *Deuteromicotina* incluye organismos con estados conidiales (asexuales), siendo desconocido su estado sexual (Beuchart, 1987). Los hongos *Hifomicetes* consisten en organismos con conidias producidas sobre el micelio o conidióforos simples o agrupados (Klich, 1988).

Estas especies poseen tanto impactos positivos como negativos en la producción de alimentos, entre las primeras se encuentran la producción industrial de enzimas hidrolíticas como amilasas y ácidos orgánicos, compuestos de uso farmacológico (Hara *et al.*, 1992; Van der Hondel, 1992; Ward *et al.*, 1992), degradación de desechos (Griffin y Garren 1976), control biológico de insectos (Wadhvani y Srivastava, 1985). Dentro de los impactos negativos, el de mayor importancia es la biosíntesis de metabolitos secundarios altamente tóxicos, principalmente las aflatoxinas. Las características morfológicas de las especies de este género, presentan un rango taxonómico común, sus conidióforos distintivos (Pitt y Hocking, 1997). Para la clasificación de las mismas, las características macroscópicas y microscópicas de las colonias son las tenidas en cuenta. Dentro de los aspectos macroscópicos se presentan el color, y el diámetro de las colonias, el color de los micelios; mientras que dentro de los microscópicos es posible enumerar la formación de esclerocios y cleistotecios, conidióforos, vesículas, esterigmas, conidios, células de *Hulle*, entre otros.

Las especies de *Aspergillus: flavus* y *parasiticus* han sido consideradas con baja patogenicidad, dado que poseen capacidad parasítica limitada, sin embargo, *Aspergillus parasiticus* se presenta como dominante en diversos cultivos (Horn *et al.*, 1994; Singh y Shukla, 2007; Reddy, 2009; Yin-Hiu *et al.*, 2010) ya que produce una elevada cantidad de enzimas extracelulares (van den Hondel *et al.*, 1992). Dicha característica aumenta la capacidad para utilizar sustratos de las semillas y muestra una carencia de especialización del huésped, que le otorga la permanencia de sus poblaciones a través de diferentes cultivos (St. Leger *et al.*, 2000).

Las aflatoxinas son tóxicas, carcinogénicas, teratogénicas e inmunosupresoras, producidas cuando especies del género *Aspergillus*, crecen sobre semillas de diversos cultivos, entre ellos el maní (Turner *et al.*, 2000). Químicamente, las aflatoxinas son difurano cumarinas, las del grupo B están fusionadas con ciclo pentona y las del G con lactona (Figura I.3).

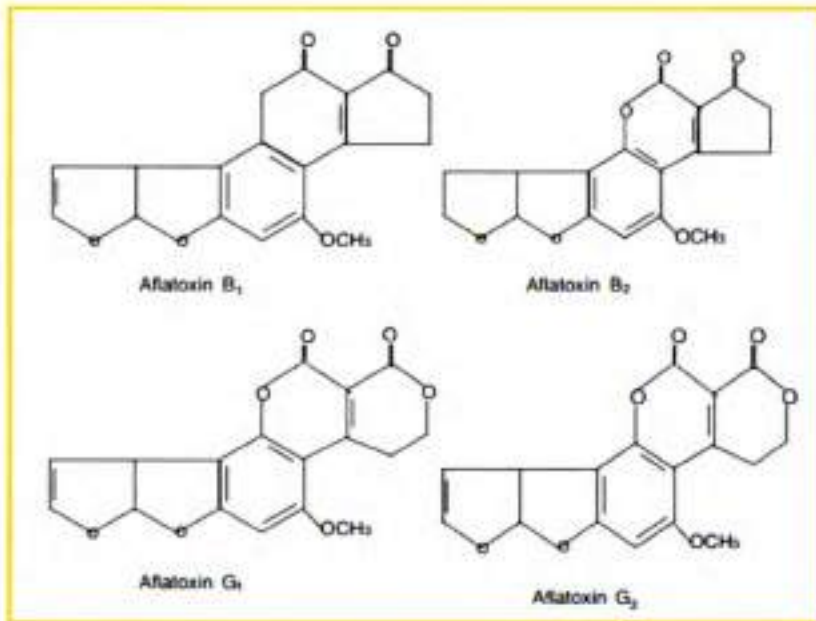


Figura I.3: Estructura química de aflatoxinas (Saleemullah *et al.*, 2006).

Las aflatoxicosis pueden producir daño hepático, cirrosis, inducción de tumores, afecciones del sistema nervioso central, desórdenes a nivel de la piel y alteraciones hormonales (Pitt, 1989; Villa y Markaki, 2009; Fernández-Ibañez *et al.*, 2009; Mohammad *et al.*, 2011), síndromes de mala absorción y disminución en la densidad ósea han sido descritas también (Hamilton y Burmeister, 1982). La toxicidad de estos metabolitos secundarios se basa en la formación de moléculas intermediarias reactivas al unirse al ADN y al ARN, confiriéndole la capacidad mutagénica y carcinogénica (Sermand *et al.*, 1999). El término aflatoxina deriva de *Aspergillus* (A), *flavus* (fla) y toxina. Existen aproximadamente 14 tipos de aflatoxinas, sin embargo las que poseen mayor relevancia

son las B1, B2, G1 y G2. Las dos primeras han sido designadas así, debido a la tonalidad azul (del inglés *blue*) al ser expuestas a la luz ultravioleta, mientras que las dos últimas presentan una coloración verde (del inglés *green*) (Wogan y Busby, 1980). Dentro de las micotoxinas, las aflatoxinas presentan una elevada estabilidad térmica, que dificulta su eliminación en los procesos de calentamiento y cocción de alimentos. Además son escasamente solubles en agua, razón por la cual el lavado, la molienda húmeda y el escaldado no reducen su contenido en los alimentos (Rubinstein, 2006).

Existen más de 300 micotoxinas aisladas y químicamente identificadas, sin embargo las investigaciones se han focalizado en aquellas que producen daño significativo al hombre, sus cosechas o animales. Dado que las aflatoxinas poseen una ocurrencia muy amplia en los cultivos agrícolas, es que han sido foco de numerosas investigaciones, siendo los cultivos mayoritariamente afectados: el maíz, el maní, el sorgo, el algodón, la soja, el arroz y las nueces (Gourama, 2005). La existencia de una correlación positiva entre la contaminación con aflatoxinas a campo y la presencia de carcinoma hepato celular, ha sido indicada por varios autores (David *et al.*, 1994; Henry *et al.*, 1999; Set y Erkmen, 2010; Zorzete *et al.*, 2011; Kamika y Tokoy, 2011). Con lo cual los límites permitidos de contenido de aflatoxinas ha sido establecido en los diferentes países de acuerdo al balance realizado entre los intereses económicos, la afección de la salud de una población y los avances en términos de metodología analítica (FAO, 1991). Los límites permitidos han ido cambiando a través del tiempo, en función del avance en las investigaciones de las metodologías analíticas para la cuantificación de micotoxinas. Dentro de las aflatoxinas, la B1 ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) como clase I, razón por la cual su límite máximo permitido es controlado con recelo (IARC, 1986).

El Mercado Común del Sur (MERCOSUR) ha propuesto permitir como límite de contaminación para maní en pasta 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la suma total de aflatoxinas (B1, B2, G1 y

G2) y 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para la aflatoxina B1. Mientras que la Unión Europea solo permite 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para todas las aflatoxinas y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para B1 (EC, N° 1525/98) (Burdaspal y Legarda, 1998).

Las aflatoxinas pueden aparecer contaminando los cultivos en la pre cosecha y en la post cosecha. El momento con mayor influencia en la calidad y el que genera mayor interés en ser controlado es la pre cosecha. En el caso de maní controlar los insectos que dañan las vainas, dejando el punto de acceso del hongo hacia las semillas; eliminar malezas, especialmente aquellas que aportan elevada cantidad del agua al maní arrancado, favoreciendo la germinación de las esporas; evitar el estrés hídrico y utilizar cultivares resistentes, forman parte de las acciones pre-cosechas más relevantes. El estrés hídrico se ha considerado en algunas regiones semiáridas y áridas como la variable que promueve la mayor contaminación de los cultivos antes de ser cosechados (Holbrock *et al.*, 2000). Estudios realizados en cultivos de maní en situación de estrés hídrico, señalan que la pérdida de agua por dicho estrés afecta la capacidad de producir fitoalexinas (compuestos de defensa inducidos por la infección), lo cual resulta en una mayor producción de aflatoxinas. La actividad del agua (definida como el agua biodisponible) de semillas es uno de los factores más influyentes en la producción de fitoalexinas (Dorner *et al.*, 1989; Fennema, 2008). Numerosos factores como la actividad del agua, la edad, la capacidad de respuesta de las semillas, el período de exposición entre otros; parecen estar relacionados a la resistencia al estrés hídrico y su consecuente contaminación con aflatoxinas en semillas de maní, involucrando mecanismos bioquímicos y moleculares (François, 2003).

Algunas de las acciones tendientes a ser aplicadas para evitar la proliferación fúngica y la producción de aflatoxinas durante la cosecha y la post-cosecha, podrían ser: minimizar la exposición de las semillas a los patógenos del suelo; retirar el maní uniformemente, descartando las semillas lastimadas o dañadas; una correcta exposición de tiempo y temperatura de secado, mantener la higiene en los equipos de cosecha, transporte y

almacenado de maní; condiciones adecuadas de temperatura y humedad de almacenado (Fernandez y Giayetto, 2006).

Diversos han sido los esfuerzos que se han realizado para eliminar las aflatoxinas de las semillas de maní, sin embargo dichos procedimientos no han sido lo suficientemente exitosos. Métodos físicos como la inactivación por calor y la irradiación han sido experimentados (Goldblatt, 1971; Philipis, 1988) junto a metodologías de índole químicas como la degradación con ácidos o álcalis y la implementación de agentes oxidantes (Moss, 1985). Estas metodologías no han sido efectivas en la reducción de aflatoxinas y/o han afectado significativamente la calidad del alimento. Por lo tanto las acciones preventivas son los objetivos actuales de mayor interés, intentando controlar las variables que favorecen la contaminación pre y post cosecha.

Conseguir implementar acciones pre cosecha capaces de inhibir la contaminación con aflatoxinas, se ha convertido en el objetivo principal de las actividades de estudio en el sector. De esta manera, evaluar el estrés hídrico, controlar la proliferación fúngica, seleccionar materiales resistentes a la infección con *Aspergillus spp.* y la contaminación con los metabolitos secundarios, son la base para prevenir la pérdida de la calidad de la semilla de maní.

Cultivares tolerantes y susceptibles a la contaminación con aflatoxinas han sido identificados. La selección de cultivares resistentes, se encuentra sustentada en los resultados de investigaciones a campo y a laboratorio, donde se han evaluado condiciones de infección natural y artificial, forzando los sistemas de defensa de las plantas e integrando los conocimientos en la metabolómica producida por el estrés biótico (Asis *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2005).

Los ensayos de laboratorio aportan datos esenciales para el entendimiento del comportamiento defensivo, sin embargo carecen de representatividad de lo que ocurre a campo; en donde las condiciones ambientales se presentan sin poder ser controladas, generando así una elevada variabilidad e interfiriendo en los resultados. De manera tal,

que la combinación de ambos ensayos, permitiría obtener un panorama con mayor representación del comportamiento fisiológico ante la infección fúngica.

El estudio de las Vías de Defensa de maní ha demostrado la presencia de barreras defensivas y de compuestos bioquímicos incrementados o inducidos ante la infección (Burow *et al.*, 1997; Burow *et al.*, 2000; Tsitsigiannis *et al.*, 2005; Tsitsigiannis *et al.*, 2006; Tsitsigiannis *et al.*, 2007). La barrera mecánica de las semillas se encuentra formada por:

- La cutina, polímero de ácidos grasos unidos entre sí por uniones éster.
- La suberina, polímero de ácidos grasos de constitución similar y de mayor complejidad que la cutina, constituyente de la pared celular.
- Las ceras, mezclas de acil- lípidos sintetizados por las células y segregados sobre la superficie externa de la cutícula.

Situaciones lesivas para los tejidos de las plantas, activan un complejo sistema de receptores, liberándose lipasas que actúan sobre la membrana, generando ácidos grasos, los que dan comienzo a una Vía de Defensa denominada de las lipoxigenasas (Ryan, 2000), como consecuencia, diferentes genes son activados para inducir la producción de compuestos productos de la acción enzimática. En el caso de la semilla de maní, estudios previos realizados en el grupo de trabajo demostraron la producción de compuestos anti-fúngicos derivados de esta Vía, con producción diferencial entre un cultivar resistente y uno susceptible. En estos estudios también fueron encontradas proteínas con actividad inhibitoria de tripsina que se producían diferencialmente en ambos cultivares, como respuesta a la infección (Tesis Doctoral Dr. Asis). En estudios posteriores se pudo demostrar que la acción de las proteasas fúngicas inducen daños en la germinación, viabilidad y quiebre o disminución de la resistencia a la infección en las semillas de maní, lo cual nos induce a pensar que las proteínas inhibitorias de proteasas también participarían en los mecanismos de defensa (Asis *et al.*, 2009). Ambas Vías se encuentran relacionadas cuando es afectada la concentración de los inhibidores de proteasas a través de la biosíntesis de jasmonatos (productos de la Vía de la Lipoxigenasa), los cuales activan los genes de los inhibidores de proteasas (De Carvalho *et al.*, 1999).

De esta manera se desprende la necesidad de profundizar en el estudio de ambas Vías de Defensa de maní ante la infección con *Aspergillus* sobre los cultivares en el laboratorio y observar las respuestas de los mismos ante la infección a campo.

2. HIPÓTESIS

La hipótesis del presente trabajo supone que las diferencias en la resistencia a la infección de *Aspergillus* y contaminación con aflatoxinas entre cultivares de maní podrían estar originadas por la diferente capacidad defensiva de las semillas. Situación causada por una expresión diferencial de compuestos relacionados a la defensa o a la capacidad adaptativa de las plantas a las condiciones favorables para la infección fúngica.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar y comprender los mecanismos de resistencia de la semilla de maní frente a la infección con *Aspergillus parasiticus* que promueva la obtención de cultivares resistentes a la contaminación con aflatoxinas a campo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar la composición bioquímica de las semillas en términos de la Vía de las enzimas Lipoxigenasas (LOX) y sus productos, principalmente en aquellos que fuesen participes de los mecanismos de defensa ante la infección con *Aspergillus* y posterior contaminación con aflatoxinas.
- Seleccionar los genes candidatos a ser analizados en la Vía de Defensa: Lipoxigenasas, y analizar sus niveles de expresión génica durante la infección fúngica.

- Investigar la composición bioquímica de las semillas en términos de la Vía de los Inhibidores de Proteasas (IP), principalmente en aquellos que fuesen participes de los mecanismos de defensa ante la infección con *Aspergillus* y posterior contaminación con aflatoxinas.
- Seleccionar los genes candidatos a ser analizados en la Vía de Defensa de Inhibidores de Proteasas y analizar los niveles de expresión génica durante la infección fúngica.
- Evaluar a campo la capacidad defensiva de los cultivares de maní, analizando la respuesta de las Vías de Defensa de Lipoxigenasas y de Inhibidores de Proteasas ante la infección con *Aspergillus*.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II-MATERIALES Y MÉTODOS

1. VÍA DE LIPOXIGENASAS

1.1. Diseño experimental: Ensayo de cinética de infección

El ensayo fue realizado en base al modelo de dos genotipos provistos por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Manfredi. Uno de ellos caracterizado como genotipo resistente (Pi 337394) y el otro como susceptible (Florman) a la infección con *Aspergillus spp.* y contaminación con aflatoxinas (Asis *et al.*, 2005).

INÓCULO

El inóculo utilizado para realizar las infecciones del ensayo fue producido a partir de *Aspergillus parasiticus* aislado de semillas y vainas de *Arachis hipogaea*, los mismos fueron identificados y clasificados como virulentos (Asis *et al.*, 2005). El hongo creció en medio sólido de agar papa dextrosa (PDA) a 30°C durante 7 días. Las esporas fueron lavadas de la superficie de crecimiento con Tween 80 (0,5 ml/l) (Anedra) y re suspendidas en una solución tampón de fosfato de sodio (0,2M pH 7). Posteriormente la concentración del inóculo fue 1×10^4 esporas/ml de solución cuantificada por recuento en cámara de Neubauer.

INOCULACIÓN

Las semillas de maní sufren un proceso de secado post cosecha hasta contener entre el 8-11 % p/p de humedad para luego ser almacenadas. Por esta razón deben ser rehidratadas, activando así su metabolismo antes de la realización de cualquier ensayo (Fernandez *et al.*, 1996).

El ensayo de cinética de infección fue realizado a partir de semillas desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% v/v por 3 minutos y enjuadas con agua destilada estéril (Fajardo *et al.*, 1995).

Posteriormente fueron hidratadas en agua estéril, por medio de adsorción con papeles hidratados previamente durante 3 períodos de contacto de 3 minutos cada uno, para evitar el shock osmótico de las semillas y la rotura posterior de las mismas (Mehan et al., 1980). Para evitar la interferencia en el proceso de respuesta a la infección y en las determinaciones analíticas espectrofotométricas de los pigmentos taninos del tegumento de las semillas, los tegumentos fueron quitados con el cuidado necesario para no marcar, lesionar y/o contaminar la superficie de cada semilla (Sanders y Mixon, 1978).

Las semillas fueron colocadas en placas de *Petri* estériles e infectadas con la suspensión de *Aspergillus* anteriormente descrita con 100 μ l por semilla. Los controles recibieron el mismo tratamiento con la solución de Tween 80. Las placas fueron colocadas en una cámara húmeda y llevadas a 30°C. Las semillas fueron colectadas a diferentes tiempos. Para seleccionar los tiempos adecuados se llevaron a cabo ensayos previos de cinética de infección para ajustar las condiciones de acuerdo a la inspección visual de las semillas, observando su grado de necrosis y midiendo algunos parámetros como actividad de lipoxigenasas, contenido de aflatoxinas, entre otros.

Fue necesario enfocar el estudio a periodos cortos de tiempo post inoculación y acotar el estudio a 72 hs., dado que posteriormente la infección y la necrosis era excesiva. Los tiempos post inoculación escogidos fueron: 5, 10, 20, 27, 48 y 72 horas.

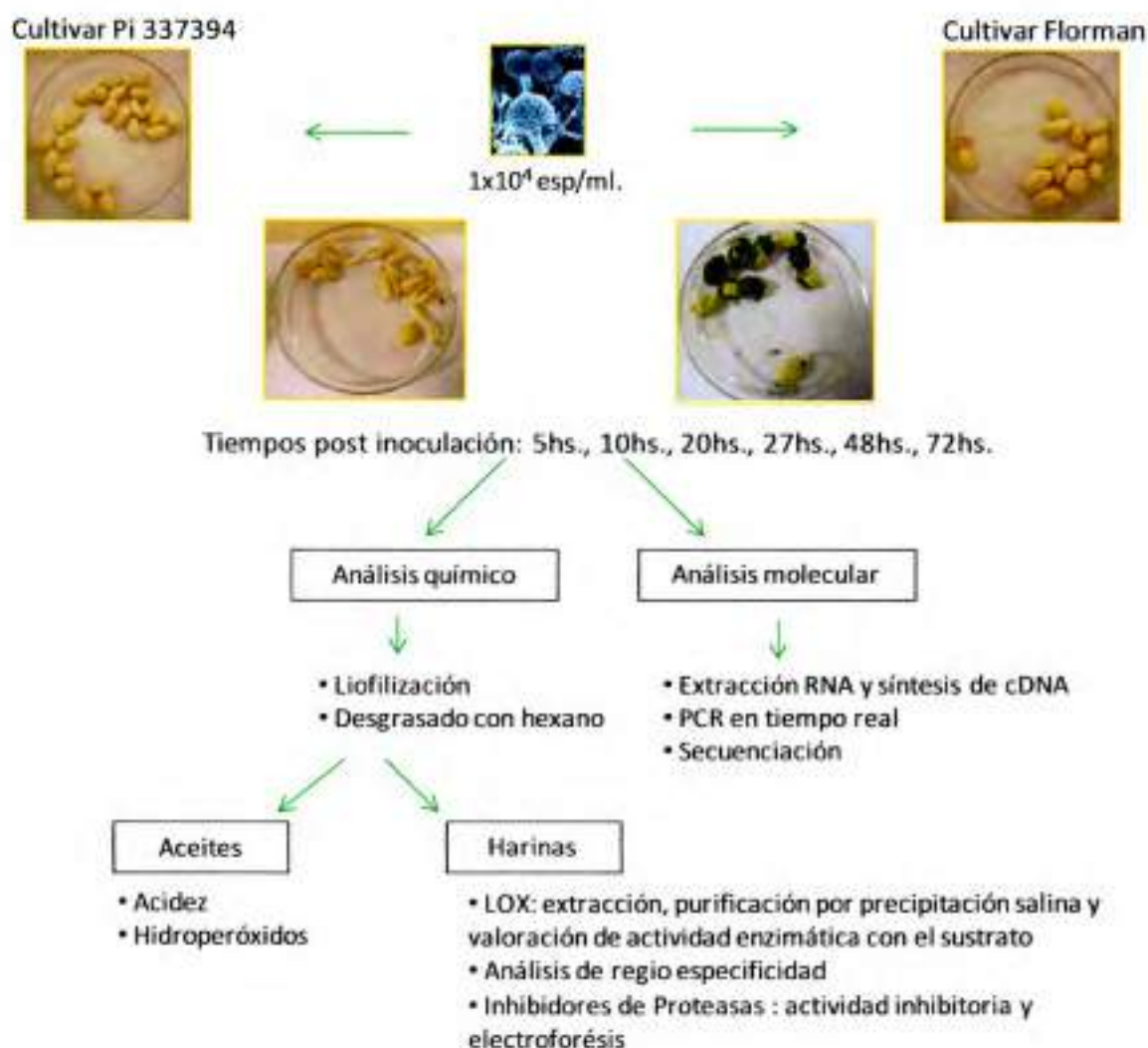
Las semillas colectadas fueron rociadas con etanol al 70% v/v y enjuagadas con agua destilada estéril, y luego congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta ser utilizadas en las determinaciones analíticas. Se realizaron triplicados en paralelo de tratamientos de infectados y controles, definiendo éstos como 3 placas de *Petri* por cada tiempo post inoculación, conteniendo cada placa las semillas que luego serán utilizadas para los ensayos bioquímicos y para los análisis de expresión génica.

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN E INFECCIÓN

La determinación del porcentaje de germinación e infección fue realizada por inspección visual del total de las semillas tratadas en las placas de *Petri*.

La aparición de micelio fúngico fue utilizada como presencia de infección visual, ya sea parcial o total sobre la superficie de las semillas. En el caso de la germinación, la aparición de la raíz fue utilizada para determinar la presencia del proceso germinativo (Li *et al.*, 2007).

A continuación se presenta un esquema de la secuencia analítica empleada durante el ensayo de infección en el tiempo.



1.2. Determinación de la actividad de Lipoxigenasas

1.2.1. Extracción de la enzima y los aceites

Las semillas fueron liofilizadas durante 16 horas y posteriormente desgrasadas con hexano a -20°C triplicando el volumen de las mismas con el solvente, utilizando Ultraturrax T18 basic (IKA Works Inc.) hasta la disgregación completa y obtención de una harina fina. El procedimiento de desgrasado se realizó 3 veces, hasta que el solvente de extracción fue incoloro. El hexano fue evaporado mediante la ayuda de un evaporador rotatorio bajo vacío a 30°C y los aceites fueron utilizados para determinar acidez e hidroperóxidos.

A partir de las harinas secas se realizó la extracción enzimática con solución tampón de fosfato de sodio (0,2M pH 6,5) en relación 1:10 p/v con agitación magnética en baño de hielo a 4°C durante 1 hora. El homogenato fue centrifugado a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifugadora refrigerada (Sorval RC 5B).

La purificación fue iniciada con la adición lenta bajo agitación magnética de sulfato de amonio al sobrenadante hasta una concentración del 85% p/v en baño de hielo a 4°C durante 1 hora y luego centrifugada a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Las proteínas precipitadas fueron re-disueltas en el mínimo volumen posible de solución tampón de fosfato de sodio (0,2M pH 6,5), desalinizadas con columnas DP10 Sephadex G25 (GE Healthcare) y eluidas con 3,5 ml de la misma solución tampón.

1.2.2. Determinación de la actividad de Lipoxigenasas

Una alícuota del extracto enzimático (0,1 ml) fue mezclado con el sustrato (0,8 ml linolato de sodio 10 mM) y llevando a 1 ml de volumen con solución tampón de fosfato de sodio (0,2M pH 6,5). La absorbancia fue medida a 234 nm a 25°C cada 1 segundo durante 5 minutos en espectrofotómetro (Shimadzu UV1601).

La solución del sustrato de linolato de sodio 10 mM fue preparada mezclando ácido linoléico (Fluka) y Tween 20 (Anedra) en la misma proporción, solubilizándolo con agua ultra pura (MilliQ) (4ml) y clarificándolo con 0,1 ml de hidróxido de sodio 0,5 M, para posteriormente llevarlo a volumen final de 25 ml con agua ultra pura (MilliQ). La preparación del sustrato se realizó bajo flujo de nitrógeno y conservado a 4°C para evitar la oxidación del ácido graso. Una *Unidad de Lipoxigenasa* fue definida como la cantidad de enzima que produce un aumento de la absorbancia de 0,001 a 234 nm por segundo a 25°C, cuando el ácido linoléico es usado como sustrato.

Para determinar la actividad específica de LOX, las unidades de LOX fueron divididas por la cantidad de proteína contenida en el extracto ensayado y expresadas por microgramo de proteína a 25°C. El contenido de proteínas fue determinado por el Método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como estándar albúmina sérica bovina (Sigma).

1.3. Análisis de regio especificidad de Lipoxigenasas

La reacción entre el sustrato linolato de sodio 10 mM (1,5 ml) y el extracto enzimático (0,5 ml) descrita previamente fue desarrollada durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz. La reacción fue detenida con ácido acético grado HPLC (0,1ml). Los productos de la reacción fueron reducidos a los correspondientes hidroxí ácidos grasos con el agregado de cloruro estagnoso 50 mM (2 ml). Esta reacción fue detenida con ácido acético nuevamente. La extracción lipídica fue realizada en presencia de cloroformo (2 ml). Luego de la agitación, las fases acuosa y orgánica fueron separadas cuidadosamente por centrifugación a 1500 rpm durante 2 minutos. Se recuperó la fase orgánica y el solvente fue evaporado bajo corriente de nitrógeno, los productos fueron re suspendidos en la fase móvil (0,1 ml). Para la separación cromatográfica, se utilizó un equipo Hewlett-Packard 1100, equipado con detector UV, el sistema se acopló a una estación de control y tratamiento de datos HP Chem Station para cromatografía líquida de Hewlett-Packard. La fase estacionaria utilizada fue una columna para HPLC de

fase directa (Phenomenex Luna Silica; 5 μm ; 150 mm x 4,60 mm), termostatzada a 35^o C. Como fase móvil se utilizó n-hexano: 2-propanol: ácido acético (100:2:0,1 v/v). La longitud de onda seleccionada fue 234 nm. Se inyectaron en el cromatógrafo 100 μL de muestra a un flujo de 0,6 mL/min. Previo al análisis, las muestras y los solventes fueron filtrados con filtros de 0,45 μm (Millipore, tipo HA).

Los criterios de identificación utilizados fueron los tiempos de retención y las características espectrales (máximos de absorvancia) de los picos obtenidos mediante la separación cromatográfica, comparados con la bibliografía. Debido a la carencia de estándares de hidroxí ácidos grasos, los picos observados en los cromatogramas fueron recolectados para luego ser analizados por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS).

A causa de la existencia de abundante bibliografía para los análisis de la Vía de la LOX en soja, se realizó en paralelo el análisis descrito en las **Secciones 1.2.** y **1.3** del presente **Capítulo** con extractos de soja, a los fines de ajustar la metodología. La única modificación que se introdujo fue el cambio de pH de la solución tampón de extracción para obtener diferentes isoenzimas de soja. De esta manera, se logró corroborar la existencia de la enzima en los extractos y su actividad, como así también los productos identificados por *HPLC* y *GC-MS*, utilizando como control en paralelo las LOXs de soja.

1.4. Cuantificación de productos de Lipoxigenasas por *GC-MS*

Las fracciones de hidroxí ácidos grasos fueron colectadas a partir de las corridas de *HPLC*. Se realizó el proceso de metilación con *n*,*Obis*(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y de silación con trimetilclorosilano (TMCS) (Supleco) respectivamente (Johnson *et al.*, 1997). Para el estudio cromatográfico se utilizó el cromatógrafo de gases Varian 3800, acoplado al espectrómetro de masas Varian CP3800-Saturn 2200, con una columna capilar Factor Four VF-5 ms (30 m x 0,25 mm ID; DF=0,25 μm) (Varian), y un inyector 1079 con septum Varian AG3 en modo *split less*.

La fase móvil utilizada fue helio de alta pureza (mayor a 99,99%) con un flujo de 1,6 ml/minuto. Las condiciones para el análisis fueron las siguientes: la temperatura del horno inicial de 100°C y mantenida por 2 min., luego se aumentó la misma a una velocidad de 10°C por min. hasta los 160°C y luego a una velocidad de 2°C por min. hasta los 225°C y finalmente a una velocidad de 40°C por min. hasta los 300°C, manteniendo a esta temperatura por 5 min. El colector, la trampa y la línea de transferencia fueron mantenidos a temperaturas de 100, 200 y 220 °C respectivamente. La emisión del filamento de ionización se seteo a 40 IA, la amplitud del voltaje fue 200 V y el periodo de tiempo de *scan* 0,8 segundos (Mariken *et al.*, 2007).

Para el análisis de masas fue utilizado el modo *full scan* en un rango entre 100 y 500 *m/z*. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de los espectros de masa con la librería *NIST MS 2,0* y comparación posterior con los antecedentes bibliográficos.

El 9-HODE y el 13-HODE fueron caracterizados por el pico a 382 *m/z* para el ion molecular (M+) y por fragmentos iónicos representados por los picos a 311 *m/z* y 225 *m/z*, coincidiendo con la bibliografía consultada (Johnson *et al.*, 1997).

1.5. Determinación de acidez en aceites

La acidez es definida como la cantidad de ácidos grasos libres expresados como gramos de ácido oleico en 100 g de aceite (*Norma IRAM 5512*).

Los aceites de las semillas obtenidos según la **Sección 1.2.1** fueron utilizados para determinar la acidez en los mismos.

El fundamento de la técnica se basa en neutralizar los ácidos grasos libres de la muestra en un solvente apropiado con solución alcalina valorada, empleando fenoftaleína como indicador.

El aceite fue pesado y se le agregó la mezcla etanol: éter dietílico (1:2 v/v), con el indicador. Luego se tituló con hidróxido de sodio 0,1 M hasta punto final.

1.6. Cuantificación de hidroperóxidos en aceites

El principio del método consiste en el tratamiento de la muestra, disuelta en ácido acético y cloroformo, con solución de yoduro de potasio y posterior titulación del yodo liberado con solución valorada de tiosulfato de sodio. Se define el índice de peróxidos como la cantidad de mili equivalentes de oxígeno por cada 1000 g de aceite que producen la oxidación del yoduro de potasio bajo las condiciones de análisis (Standard Methods, 1979). Los hidroperóxidos de los aceites obtenidos según la **Sección 1.2.1** fueron cuantificados siguiendo esta metodología.

A la muestra se le adicionó la mezcla de ácido acético: cloroformo (6:4 v/v) y la solución saturada de yoduro de potasio. Posterior a la incubación en oscuridad, se agregó agua destilada y solución de almidón. La titulación del yodo liberado se realizó con tiosulfato de sodio (0,100+/-0,001 M) hasta la decoloración total de la capa acuosa.

1.7. Cuantificación de aflatoxinas por HPLC

Para optimizar el procedimiento de purificación de aflatoxinas de las muestras de maní, se utilizaron columnas de Florisil, y las aflatoxinas obtenidas por elución fueron cuantificadas por HPLC. El fundamento de utilizar columnas empaquetadas con Florisil para limpiar las muestras y purificar las aflatoxinas antes de cuantificarlas por HPLC, se basa en su adsorción selectiva que posee sobre las mismas y la simple desorción posterior por cambio en la polaridad de los solventes de elución (Sobolev, 2007).

Las semillas obtenidas según la **Sección 1.1** (50g) fueron incubadas por 20 minutos con 100 ml de solución metanol: agua (80:20 v/v) (Cole *et al.*, 1994) y luego trituradas en una licuadora comercial (Waring HGB2WTG4). El extracto (entre 1-3 ml) fue filtrado por papel y purificado a través de la columna de Florisil (Sobolev, 2007). Las columnas de polipropileno de 1,5 ml fueron empaquetadas con 130 mg de Florisil grano 60-100 (Fisher Chemical). El extracto fue lavado y eluido de acuerdo al protocolo de la **Tabla II.1**. El

eluato fue llevado a sequedad en corriente de nitrógeno y protegido de la luz para ser derivatizado con ácido trifluoroacético (Riedel de Haën). Las aflatoxinas fueron cuantificadas por fluorescencia post separación de las mismas por HPLC.

Tabla II.1 Soluciones de lavado y elución

Paso	Volumen (ml)	Mezcla de Solventes (v/v)
1	0,5	metanol: agua (80:20)
2	0,5	metanol
3	0,5	cloroformo: metanol (90:10)
elución	6	acetona: H ₂ O: ácido fórmico (96:3,7:0,3)

Las muestras fueron inyectadas en el sistema de HPLC Hewlett-Packard Series 1100 con detector de fluorescencia (λ excitación = 360nm, λ emisión = 440nm). La fase estacionaria fue una columna de fase reversa (Varian, C18, 150 mm x 4.6 mm). Como fase móvil fue utilizada una solución de acetonitrilo: metanol: agua (17:17:66 v/v) a un flujo de 0,8 ml/min. Los criterios de identificación utilizados fueron los tiempos de retención de los picos obtenidos mediante la separación cromatográfica, comparados con los de estándares de aflatoxinas (Aflatoxina B1, B2, G1, G2 de *Aspergillus flavus* todas ellas, provistos por Sigma) analizados en idénticas condiciones.

Para la preparación de los testigos se utilizaron las recomendaciones y técnicas propuestas por Métodos Oficiales de Análisis de la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC, 1999) así como para evaluar la pureza y calidad de los mismos.

A partir de la regresión de la curva de calibración de cada aflatoxina, se obtuvieron los parámetros analíticos presentados: sensibilidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ), rango lineal (Miller *et al.*, 2007).

En la **Tabla II.2.** se presentan los valores analíticos obtenidos para aflatoxinas:

Tabla II.2 Parámetros de análisis de aflatoxinas

Parámetro analítico (ng/mL)	Aflatoxina			
	B 1	B 2	G 1	G 2
Sensibilidad	(284 ± 9)	(294 ± 1)	(134 ± 3)	(181,8 ± 0,8)
LD	24,3	1,4	26,5	1,7
LQ	80,9	4,5	88,2	5,7
R ²	0,993	1	0,996	1
SD	2095,9	128,.	1072,6	96,3
Límite respuesta lineal	hasta 249,6	hasta 125,4	hasta 372,6	hasta 126

1.8. Análisis de expresión génica

1.8.1. Extracción de ARN y síntesis de ADN

Para la extracción del ácido ribonucleico (ARN) se utilizaron las semillas inoculadas y los controles guardados a -80°C según se describió en la **Sección 1.1**. Se probaron varias metodologías para realizar la extracción del ARN y se seleccionó el *kit* comercial *RNeasy* (Qiagen), dado que aportó mayores rendimientos en términos de cantidad y de calidad. Se realizaron algunas modificaciones a las indicaciones del fabricante para incrementar la calidad del ARN entre ellas, utilizar 80 mg de material biológico de partida y macerar el mismo en nitrógeno líquido utilizando mortero para producir lisis total de las semillas. El tejido fue transferido rápidamente a un tubo y se agregaron 0,6 ml de solución tampón de *RLT* (tiocianato de guanidina y β -mercaptoetanol (0,01 ml/ml)). El paso de lavado subsiguiente fue realizado según las indicaciones del fabricante y modificado el periodo de tiempo de incubación con la solución tampón de *RWI* (que contiene etanol) por 5 minutos. A los fines de aumentar la recuperación, la recolección del ARN purificado fue realizada tres veces con agua libre de enzimas *ARNsas* a 56°C en baño seco durante 5 minutos cada vez.

Posteriormente se procedió a precipitar con cloruro de litio 2,25 M por una hora a -80°C para luego ser lavado con etanol y re suspendido en agua libre de ARNsas.

La calidad y cantidad de ARN fueron evaluadas por espectrofotometría, determinando la absorvancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Synergy HT, Biotek Inc.); a su vez se corrió un gel de agarosa al 1 % en condiciones no desnaturalizantes y con tinción mediante bromuro de etidio a los fines de observar la integridad.

Para eliminar cualquier contaminación con ácido desoxiribonucleico (ADN), las muestras de ARN fueron tratadas con una ADNsa (Fermentas).

Para la transcripción reversa se utilizó 5 µg de ARN de cada muestra y la enzima Transcriptasa Reversa Revertaid M-MuLV (Fermentas) según las especificaciones del fabricante y utilizando cebadores oligo(dT) (Biodynamics).

Como control negativo de contaminación con ADN genómico, se corrieron en paralelo muestras de ARN en ausencia de la transcriptasa reversa (Amé *et al.*, 2009).

1.8.2. Diseño de cebadores

Los cebadores fueron diseñados para *Arachis hypogaea* en base a los genes identificados por el programa BLAST, a partir del banco de genes publicados en GenBank. La totalidad de cebadores estudiados fueron diseñados con la ayuda del software Primer Express TM (Biosystems) y obtenidos a partir de Sigma-Aldrich e IDT (Inegrated ADN Technologies).

En la **Tabla II.3** se observan el nombre del cebador, su secuencia sentido, su secuencia anti sentido, el tamaño del amplicón y la temperatura de *melting*.

Tabla II.3 Lista de Genes Seleccionados

Símbolo	Nombre	NCBI Número de Acceso	Secuencia		Tamaño Amplicón (pb)	Temperatura Melting (°C)
			Cebador Sentido [5'-3']	Cebador Antisentido [5'-3']		
LOX2	Lipoxigenasa 2	DQ068249.1	CCTCATCCTCCTCTTCTTC	AAGGTGTCAACGTCCAGG	145	54,45
LOX3	Lipoxigenasa 3	DQ068250.1	CCTCATCCTCCTCTTCTTC	AAGGTGTCAACGTCCAGG	145	54,45
LOX4	Lipoxigenasa 4	EZ722311.1	GCGCTCAGGGACTCATCGGC	GAGGGAGACAGAGCGGCCCA	89	63,4
LOX5	Lipoxigenasa 5	JR564445.1	GAACATCATCGACGCTGTCTACT	CCACCGTCCCTTTCACTGTCT	71	58,2

1.8.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real se utilizó el *kit* comercial QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen). Se prepararon *master mix* de SYBR Green y de cebadores para cada par de cebadores a ser estudiado, conteniendo 50 ng de ADNc, 0,3 μ M de cada primer y 10 nM de fluoresceína (Biosystems) en un volumen final de 15 μ l. La PCR en tiempo real fue realizada en un termociclador Bio-Rad iQ cycler (Bio-Rad).

El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización a 95°C por 3 minutos; 45 ciclos de amplificación: 94°C por 15 segundos, 61,3°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; y la curva de disociación con rango de temperatura de 52°C a 62°C con incrementos de 0,5°C cada 5 segundos. La temperatura de amplificación determinada fue 61,3°C ya que a dicha temperatura se obtenía mayor eficiencia que al resto de las temperaturas ensayadas: 52; 54; 58,2; 58,7 y 62°C.

Las reacciones fueron desarrolladas por duplicado y en paralelo, también se corrieron reacciones con ausencia de templado como controles negativos. Los productos de amplificación fueron cuantificados utilizando el valor de Ct (*threshold cycle*) experimental, definido como el ciclo de PCR donde ocurre un aumento en la fluorescencia sobre el nivel de fondo. Los valores de Ct obtenidos a partir de CFX manager 2.0 (Bio-Rad) fueron transformados en cantidades relativas mediante el método delta-Ct (Maroufi *et al.*,

2010). La presencia del amplicón deseado fue confirmada mediante el estudio de las curvas de disociación producidas en cada corrida. La visualización de los mismos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% p/v, utilizando un marcador de peso molecular de 50 a 500 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos).

Para la cuantificación de la expresión génica, se realizaron curvas de calibración estándar, preparadas a partir de diluciones seriadas de *pools* de muestras, incluyendo controles e inoculados del mismo genotipo a diferentes tiempos post inoculación. De esta manera fue posible determinar la eficiencia de cada gen, como la pendiente de la curva estándar, mediante regresión lineal. La eficiencia de amplificación de cada gen fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1) \times 100 \text{ (Maroufi et al., 2010).}$$

Para determinar la expresión relativa de cada gen en cada tratamiento de las semillas, el valor de expresión génica fue normalizado, dividiéndolo por el valor de expresión génica del gen de referencia.

Varios genes fueron testeados para ser utilizados como gen de referencia, entre ellos *factor de elongación 1- α* , *β -actina*, *β -tubulina*, *histona H3*, *nicotidamida-adenina-dinucleotido-dehidrogenasa (NADHD)*, *gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa (GADPH)*, *18S ácido ribonucleico ribosomal (rARN)* y *18S ácido ribonucleico ribosomal de *Arachis hypogaea* (IDL)*.

En la **Tabla II.4** se observan los números de acceso del banco de genes, las secuencias de los cebadores utilizados, y sus características. Algunos de los posibles genes de referencia fueron diseñados para *Cichorium intybus* (achicoria) (Maroufi et al., 2010).

El gen seleccionado fue el de *histona H3*, dado que presentó estabilidad sin diferencias significativas entre las semillas de los dos genotipos, a diferentes tiempos de germinación e infección fúngica y entre controles no inoculados y semillas inoculadas con *Aspergillus*.

Tabla II.4 Lista de posibles Genes de Referencia

Símbolo	Nombre	NCBI Número de Acceso	Secuencia Cebador	Secuencia Cebador	Tamaño Amplicón (pb)	Temperatura Melting (°C)
			Sentido [5'-3']	Antisentido [5'-3']		
ACT	Actina	EF528575	CCAAATCCAGCTCATCAGTCG	TCTTTCGGCTCCGATGGTGAT	74	80,26
TUB	β-tubulina	AF101419	GCACGGCATTGATGTGACC	GAACAAACCTCCCGCCACT	101	82,56
NADHD	nicotinamida adenina dinucleotido dehidrogenasa	L39390	TGCAGCAAAGGCTTGTCAAA	TCGAAACTTCCCGTTATCCAA	102	75,84
EF	Factor de elongación 1α	AY378166	CATGCGTCAGACGGTTGCTGT	CTTCACTCCCTTCTTGGCTGC	100	82,17
rRNA	18S rRNA	U42501	GGCGACGCATCATTCAAAT	TCCGGAATCGAACCCCTAAT	102	80,61
GAPDH	gliceraldehido-3 fosfato- dehidrogenasa	AK317337	AGGGCGGTGCTAAGAAAGTCA	TCTGGCTGTATTCTCTTCTCATT	91	81,55
H3	Histona	AY378165	A/CAGCTCGCAAATCAACCG	GCGGCTTCTTCACTCCACC	100	83,79
IDL	18S rRNA <i>A. hypogaea</i>	AF156675.2	ATTCTAGTAAGCGCGAGTCATCAG	CAATGATCCTTCCGACGGTTCAC	226	67,2

1.9. Secuenciación de genes candidatos en la vía de Lipoxigenasas

Luego de analizar los resultados obtenidos, el ADN producto de las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) de los diferentes genes estudiados, fueron sometidos al análisis de secuencias para confirmar la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el Instituto de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas del Instituto Nacional Agropecuario.

Para la secuenciación del ADN se utilizó la técnica de *Sanger* y la electroforesis en secuenciador automático de capilares. Con las secuencias obtenidas, se compararon en la base de datos *blast*, obteniéndose la identidad de 100% para LOX2-3, con el gen de LOX 2 (número de acceso de *GenBank* gb|DQ068249.1) y de LOX 3 (número de acceso de *GenBank* gb|DQ068250.1) indistintamente en ambos cultivares ensayados. En el caso de la LOX 4 se obtuvo una identidad del 100% para una LOX 1 de *Arachis hypogaea* (número de acceso de *GenBank* gb|DQ889574.1) para ambos cultivares. Para la LOX 5, la identidad fue del 100% para un unigen de *Arachis hypogaea* (número de acceso de *GenBank* gb|JR564445.1).

1.10. Análisis Estadístico

El Análisis de la Varianza (ANOVA), permite probar hipótesis referidas a las medias de dos o más distribuciones. La hipótesis que se somete a prueba generalmente se establece con respecto a las medias de las poblaciones en estudio y supone distribución normal de los datos (Miller *et al.*, 1993; Gardiner, 1997; Di Rienzo *et al.*, 2003).

La distribución normal fue analizada por la prueba de Shapiro-Wilks y la prueba de Levene fue utilizada para corroborar la homogeneidad de varianzas. El análisis de ANOVA se aplicó a los resultados obtenidos para determinar si existen diferencias entre los distintos genotipos y a su vez, si existen entre controles e inoculados. El nivel de confianza p utilizado fue de 0,05 ($p < 0,05$). Las diferencias significativas encontradas fueron comparadas con la ayuda de la prueba Fischer.

En aquellos casos, en los cuales no fue encontrada distribución normal de los datos u homogeneidad de varianzas, la prueba no paramétrica utilizada fue Krustal-Wallis, seguida por la prueba Dunn's (Sokal *et al.*, 1999; Grupo Infostat, 2002-2008).

2. VÍA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

2.1. Diseño experimental: Ensayo de infección a tiempo final

El ensayo fue realizado en base al modelo de dos genotipos que fueron utilizados en el estudio de la vía de las Lipoxigenasas **Sección 1.1** del presente **Capítulo**.

INÓCULO

El inóculo utilizado para realizar las infecciones del ensayo, fue producido de la misma manera que en la **Sección 1.1** del presente **Capítulo**.

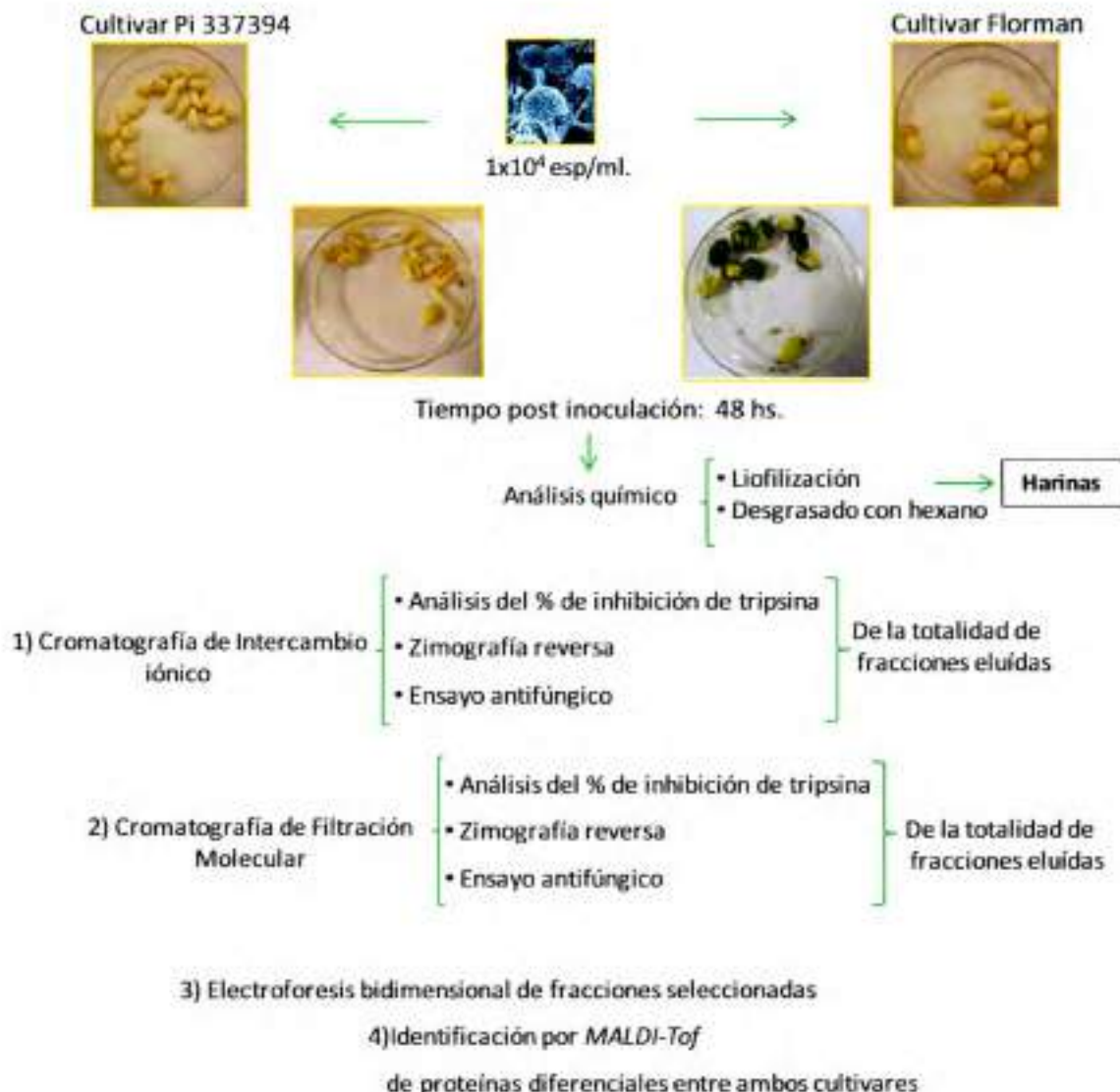
INOCULACIÓN

Para los ensayos de los estudios bioquímicos y moleculares, el ensayo de cinética de infección fue realizado como fuera descrito en la **Sección 1.1** del presente **Capítulo**. La única modificación realizada fue el tiempo de exposición de las semillas al inóculo, el cual fue de 48 horas. Este tiempo fue seleccionado en función de ensayos previos de niveles de inhibición de actividad de tripsina, que permitieron ajustar las condiciones del mismo.

A las 48 hs. post inoculación, las semillas control e inoculadas de ambos cultivares fueron colectadas, rociadas con etanol al 70% v/v y enjuagadas con agua destilada estéril, para luego ser congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta ser utilizadas en cada determinación analítica.

Se realizaron triplicados en paralelo de infectados y controles, definiendo éstos como 3 placas de *Petri* por cada tiempo post inoculación, conteniendo cada placa las semillas que luego serán utilizadas para los ensayos bioquímicos y en los análisis de expresión génica.

A continuación se presenta un esquema de la secuencia analítica empleada durante el estudio de la Vía de los Inhibidores de Proteasas: infección con *Aspergillus parasiticus* del cultivar resistente PI337394 y del cultivar susceptible Florman.



2.2. Separación por cromatografía de intercambio iónico

Como comienzo de la marcha analítica para la purificación e investigación de las proteínas de la vía de defensa de IP, se utilizó la cromatografía de intercambio aniónico.

Las semillas fueron liofilizadas y tratadas como fue descrito en la **Sección 1.2.1** del presente **Capítulo** hasta obtener harinas desgrasadas.

A partir de las harinas secas se realizó la extracción con una solución de ácido acético glacial (0,05M) en relación 1:10 p/v utilizando Ultraturrax T18 basic (IKA Works Inc.) El homogenato fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrifugadora refrigerada (Sorval RC 5B). Posteriormente las proteínas fueron precipitadas con acetona al 70% v/v a - 20°C y re suspendidas en solución tampón Tris-HCl (20 mM pH 6,4).

Los extractos obtenidos fueron utilizados para realizar la separación por Cromatografía de Intercambio Iónico utilizando un equipo de *FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography* (Amersham Bioscience). El extracto proteico fue cargado en una columna Mono Q HR 5/5 (1 ml), equilibrada con 30 ml de solución tampón Tris-HCl (20mM, pH 7,5), solución A. Posteriormente la columna fue lavada con 10 ml de la solución A y las proteínas eluidas con 20ml, utilizando un gradiente lineal de 0-100% NaCl 0,5 M en solución A. El flujo de elución fue de 60 ml/h y se monitoreó la absorbancia a 280 nm de los eluatos. En las fracciones colectadas (0,5 ml) se evaluó la actividad inhibitoria de tripsina. En los análisis cromatográficos de ambos cultivares se encontró una fracción que eluye con el volumen de exclusión. Con la finalidad de estudiar dicha fracción, la misma fue recolectada y sometida a una cromatografía de filtración molecular.

2.3. Separación por cromatografía de filtración molecular

Las fracciones colectadas en el volumen de exclusión de la cromatografía de intercambio iónico fueron sometidas a separación por cromatografía de filtración molecular utilizando *FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography* (Amersham Bioscience). Para este estudio se empleó una columna de filtración Bio-Gel-P (Bio-Rad). El flujo fue de 15 ml/h y el solvente de elución una solución tampón Tris-HCl (50 mM pH 6,8) y 200 mM de NaCl (Huang et al., 1997). Al igual que en la cromatografía de intercambio iónico, las fracciones eluidas fueron colectadas (0,5 ml) y analizadas su actividad inhibitoria de tripsina.

2.4. Determinación de la actividad inhibitoria de tripsina

La actividad inhibitoria fue determinada por espectrofotometría utilizando solución de α -benzoil-arginina-p-nitroanilina (Sigma) como sustrato de la tripsina y aprotinina como inhibidor control. Aprotinina es la versión bovina del inhibidor de tripsina pancreática, e inhibe no sólo la tripsina sino también otras enzimas proteolíticas relacionadas.

Una alícuota del extracto eluido de las cromatografías (0,047 ml) fue mezclada con el sustrato (0,233 ml) y tripsina (0,047 ml) llevando a 1 ml con solución tampón de trietanolamina con CaCl_2 (20mM pH 7,8). La absorbancia fue medida a 405 nm a 25°C durante 5 minutos, registrando su valor cada 1 segundo en espectrofotómetro (Shimadzu UV1601) utilizando el modo *scan* en el tiempo.

Una *Unidad Inhibitoria de Tripsina* (TIU) es definida como la cantidad de enzima no inhibida capaz de producir un cambio de absorbancia a 405 nm de 0,001 por minuto a 25°C, con respecto al control de inhibición aprotinina.

Para determinar la actividad inhibitoria específica de IP, las unidades de inhibición de tripsina fueron divididas por la cantidad de proteína contenida en el extracto ensayado, expresadas como las unidades que disminuyen la absorbancia a 405 nm de 0,001 por minuto por miligramo de proteína a 25°C.

El contenido de proteínas fue determinado por el Método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como estándar albúmina sérica bovina (Sigma).

2.5. Ensayo anti fúngico

Para este y los posteriores ensayos que se describirán en el presente **Capítulo**, se emplearon aquellas fracciones con mayor actividad inhibitoria de tripsina de las purificaciones cromatográficas de las **Secciones 2.2 y 2.3** mencionadas previamente.

Con la necesidad de eliminar las sales remanentes, las fracciones seleccionadas fueron dializadas y liofilizadas durante 16 horas, para luego ser almacenadas hasta su análisis.

Las fracciones secas fueron re suspendidas en solución tampón de Tris-HCl (20 mM pH 6,4). Para el ensayo anti fúngico, una alícuota de esta solución (0,010 ml) fue incubada con una suspensión de *Aspergillus parasiticus* de 1×10^4 esporas/ml en medio líquido *Mueller Hinton* con cloranfenicol (0,045 ml/50ml) a 37°C durante 18 hs. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la absorbancia a 595 nm para expresar el desarrollo del micelio fúngico, corroborada por observación microscópica. El mismo procedimiento fue realizado utilizando un medio líquido enriquecido (sacarosa 1,5%; caseína disódica 2%; metales 0,01% y cloranfenicol 0,1%) para verificar el crecimiento fúngico e independizar los resultados de las limitantes nutricionales de los medios de cultivo.

2.6. Análisis de fracciones proteicas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida, es una metodología que permite la separación proteica, mediante condiciones desnaturalizantes, efectuado por adición de detergente como el dodecilsulfato sódico (SDS). Este detergente otorga una carga neta negativa a las proteínas que les permite migrar a través del gel de poliacrilamida en relación directa a su masa, ya que la cantidad de cargas negativas que se unen a la proteína depende del tamaño de ésta, existiendo una relación carga/masa constante.

Las fracciones seleccionadas y recolectadas de las cromatografías, que fueron cuantificadas para actividad inhibitoria de tripsina, y que también fueron utilizadas para el ensayo anti fúngico, se utilizaron para ser caracterizadas por separación electroforética en geles de poliacrilamida.

La electroforesis fue realizada en condiciones desnaturizantes siguiendo el protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970). El gel concentrador fue preparado al 4% de acrilamida en solución Tris-HCl (0,5 M pH 6,8); mientras que el gel de resolución fue preparado al 12% de acrilamida en solución de Tris-HCl (1,5 M pH 8,8). La corrida electroforética fue realizada con una corriente constante de 30 mA a 4°C en un equipo *Mini Protean III electrophoresis cell* (Bio-Rad Laboratories), utilizando como solución de electroforesis: Tris-HCl (0,1 M); tricina (0,1 M); SDS: sodio lauril sulfato (0,1%, pH 8,3) (Schägger, 2006).

Las muestras fueron sembradas en un medio conteniendo glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% p/v y ditionitrol 20 mM, previo calentamiento por 5 minutos a 95°C. Las proteínas fueron detectadas con la tinción de *Coomassie Brilliant Blue R250* 125 mg% en solución de metanol al 40% v/v y ácido acético al 10% v/v. Luego los geles fueron decolorados con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 10%. Los pesos moleculares (PM) se calcularon a partir de la gráfica del log PM en función de la movilidad relativa, utilizando proteínas de peso molecular conocido (Bio-Rad).

2.7. Análisis de actividad enzimática por zimografía reversa

La zimografía es una técnica electroforética que permite observar la actividad de enzimas. Las muestras conteniendo inhibidores son separadas mediante una electroforesis en gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) conteniendo caseína, en un sistema tampón Tris-HCl-tricina que mejora la resolución de péptidos y proteínas de bajo peso molecular (Le y Katunuma, 2004). Posterior a la corrida electroforética, el gel se incubó con una solución de enzima proteolítica que hidroliza la proteína co-polimerizada en el gel (caseína). Los inhibidores protegen la caseína de la enzima proteolítica, permitiendo posteriormente a la tinción del gel ser observados mediante una banda en la región donde migraron los inhibidores de proteasas.

La polimerización de acrilamida fue realizada de la misma manera que en la electroforesis de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) previamente descrita, salvo que fue en presencia de caseína soluble 0,1%. La corrida electroforética fue realizada a 100 V a 4°C en un equipo *Mini Protean III electrophoresis cell* (Bio-Rad Laboratories), utilizando como solución de electroforesis: Tris-HCl (0,1 M); tricina (0,1 M); SDS (0,1% pH 8,3).

Las muestras eluidas de las purificaciones cromatográficas fueron sembradas en un medio conteniendo glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% p/v y ditiotriol 20 mM, sin calentamiento para evitar pérdida de actividad. Finalizada la corrida electroforética, el gel fue incubado durante 1 hora en una solución de Tritón X-100 al 2,5% para remover el SDS.

Al término de 1 hora, todas las calles excepto las que contenían los marcadores de peso molecular fueron colocadas en una solución de tripsina (1,8 ml/100ml), Tris-HCl (10 mM), NaCl (200 mM) y CaCl₂ (10 mM) e incubadas a 37 °C durante 8 horas con la finalidad que la enzima digiriera la caseína del gel. Posterior a la proteólisis, los geles fueron coloreados con la tinción de *Coomassie Brilliant Blue R250* 125 mg % en solución de metanol al 40% v/v y ácido acético al 10% v/v. Luego la decoloración fue realizada con una solución de metanol al 5% y ácido acético al 10%. Los estándares de pesos moleculares fueron teñidos de igual manera y se calcularon a partir de la grafica del log PM en función de la movilidad relativa, utilizando proteínas de peso molecular conocido (Bio-Rad).

2.8. Separación de las fracciones seleccionadas por electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional en geles de poli(acrilamida) (2D PAGE) es la herramienta más empleada para el análisis global y la separación de los componentes del proteoma. Se basa en la separación de las moléculas en dos dimensiones, así en la primera dimensión, las partículas son separadas en función de un gradiente de pH y en la segunda en función de su tamaño.

Las moléculas anfotéricas como es el caso de las proteínas, migran según la diferencia de potencial y del gradiente de pH.

Las moléculas que se encuentren en regiones donde el pH sea inferior a su punto isoeléctrico se cargarán positivamente y migrarán hacia el cátodo, mientras que aquellas que se encuentren en medios con pH superiores a su punto isoeléctrico tendrán una carga negativa y su migración será hacia el ánodo. La migración siempre será hasta la región donde el pH coincida con el punto isoeléctrico de las proteínas, ya que la carga neta será nula y se detendrán.

Las fracciones seleccionadas fueron re suspendidas en una solución tampón Tris-HCl (20 mM pH 8,9) y fueron tratadas con el *kit* (2-D Clean-up kit, Amersham Biosciences), a los fines de remover impurezas capaces de interferir con la primera dimensión tales como sales, detergentes, etc.

La electroforesis fue llevada a cabo en tiras IPG (pH 3-10, 7 cm) y con el equipo para isoelectroenfoque *Ettan IPGphor 3* (Amersham Biosciences) en la primera dimensión y luego para la segunda dimensión *SDS-PAGE* como fue descrito en la **Sección 2.6** del presente **Capítulo**.

Las tiras IPG fueron hidratadas cuidadosamente para evitar introducir burbujas con la muestra (0,125 ml), en la bandeja de rehidratación dentro de la caja IPG box (Amersham Biosciences) durante 10-24 horas a temperatura ambiente. Para realizar la separación por isoelectroenfoque, las tiras fueron cubiertas con aceite mineral (*cover fluid*, Amersham Biosciences), y la corrida constó de 4 pasos a 20°C con 6299 Vh.

Las tiras fueron retiradas e incubadas por 15 minutos en la bandeja de rehidratación en un agitador orbital con una solución tampón Tris-HCl (50 mM pH 8,8); urea 6 M; glicerol 30% v/v; SDS 2% p/v; DTT 1%; azul de bromofenol 0,002%. Luego se retiró la solución y se reemplazó por otra conteniendo los mismos componentes, excepto que el DTT fue reemplazado por iodoacetamida 4%. Las tiras así tratadas se posicionaron sobre un gel *SDS-PAGE* al 16 % y se procedió a la corrida con amperaje constante de 50 mA.

Los gels fueron coloreados como fue descrito en la **Sección 2.6** del presente **Capítulo** y los *spots* diferenciales entre las muestras de ambos cultivares fueron seleccionados, cortados y derivados para ser analizados por *MALDI-Tof*.

2.9. Análisis por MALDI-TOF/TOF

Es una técnica de ionización utilizada en espectrometría de masas, que permite el análisis de moléculas que se fragmentan. Los iones formados son separados con el objeto de determinar su relación masa/carga (m/z), y obtener un espectro de masas (m/z en función de su abundancia en la muestra). Se denomina *MALDI* (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*, (desorción/ionización láser asistida por matriz) y *TOF* por el detector de iones que se acopla al (*Time-Of-Flight*, tiempo de vuelo).

El análisis de las huellas peptídicas de los *spots* seleccionados ha sido llevado a cabo mediante un tratamiento del gel de la electroforesis bidimensional con tripsina durante 16 horas (Promega, grado de secuenciamiento). Los péptidos fueron extraídos del gel con una solución de acetonitrilo 60% con 0,2% de ácido trifluoroacético, concentrados por medio de secado al vacío y desalinizados utilizando una microcolumna C18 de fase reversa (Omix, Varian). La elución de los péptidos de la microcolumna fue inyectada directamente en el espectrómetro de masas con 3 μ l de la solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 60% con ácido trifluoroacético 0,2%). El espectro de masas de las muestras digeridas fue realizado en un equipo *MALDI-TOF/TOF* (Biosystems) en modo reflector y calibrado externamente con una mezcla de estándares peptídicos (Biosystems). Las proteínas fueron identificadas con la base de datos de *NCBI nr*, utilizando la búsqueda con los valores de m/z y el programa *MASCOT* con los siguientes parámetros pre-seleccionados: tolerancia de masa mono isotópica 0,05 Da; tolerancia del fragmento de masa 0,25 Da; oxidación de metionina y una escisión triptica como posibles modificaciones permitidas.

2.10. Análisis de expresión génica en el transcurso de la infección

Para el análisis de expresión génica, fueron utilizadas las mismas semillas de los cultivares resistente y susceptible descritas en las **Sección 1.1** del presente **Capítulo**.

La extracción de ARN, síntesis de ADN, diseño de cebadores, la reacción en cadena de la polimerasa y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real fueron realizadas como fuera descrito en la **Sección 1.8** del presente **Capítulo**.

Los genes seleccionados para ser analizados, surgieron a partir del resultado de los estudios de proteómica de las fracciones seleccionadas. De esta manera los *spots* de las proteínas seleccionadas fueron analizados y comparados con la librería *NCBI* y con *EST* de *Arachis hypogaea*, y utilizadas para la búsqueda de los genes correspondientes en el banco de genes publicados *GenBank*.

Una vez definidos los genes a estudiar, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real sobre las muestras del ensayo de cinética de infección descrito en el presente **Capítulo**, de manera tal de integrar la evaluación de las dos vías de defensa propuestas en el presente trabajo en el modelo de dos cultivares de capacidad defensiva diferencial ante la infección con *Aspergillus*. Sobre dichas muestras también fue determinada la actividad inhibitoria de tripsina y se realizó el análisis de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

En la **Tabla II.5** se observan el nombre del cebador, su secuencia, el tamaño del amplicón.

Tabla II.5 Lista de Genes Seleccionados

Símbolo	Nombre	NCBI Número de Acceso	Secuencia Cebador Sentido [5'-3']	Secuencia Cebador Antisentido [5'-3']	Tamaño Amplicón (pb)	Temperatura Melting (°C)
BBTI	Inh. Bowman-Birk	AY330200.1	TTGTGTTGACACGTTTCGATCATT	TGGAGGATTAGACCTTGTGCAA	70	56,1
IP Kunitz	Inh. Kunitz	DQ889567.1	CGACACAGACGGCAACCTT	CCACCGCCTCGAAAA	72	58

2.11. Secuenciación de genes candidatos en la Vía de Inhibidores de Proteasas

Los productos de la PCR en tiempo real fueron sometidos al análisis de secuencias en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología perteneciente al Instituto

Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), tal como fue descrito en la **Sección 1.9** del presente **Capítulo**.

2.12. Análisis estadístico

Para el estudio estadístico fue utilizado el mismo procedimiento analítico que el mencionado en la **Sección 1.10** del presente **Capítulo**.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE LIPOXIGENASAS

III-CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE LIPOXIGENASAS

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las lipoxigenasas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y animal. Pueden expresarse en diferentes tejidos vegetales dependiendo del estadio evolutivo de la planta y del medio ambiente, por ejemplo en leguminosas es posible encontrarlas en las semillas (Creelman *et al.*, 1992), en los tubérculos de papas (Baysal y Demirdoven, 2006), en los cuerpos lipídicos de plantas superiores (Schmidt y Herman, 2008), en los nódulos y raíces de las legumbres (Hayashi *et al.*, 2008).

Las lipoxigenasas (LOXs) son enzimas linolato oxígeno oxidoreductasa (EC 1.13.11.12) que pertenecen a la familia de dioxinasas que contienen hierro sin la presencia del grupo hemo (Brash, 1999).

Las LOXs son proteínas monoméricas de aproximadamente 95-100 kDa que contienen dos dominios. El dominio amino terminal de aproximadamente 25-30 kDa con estructura de β -barril, formada por una serie de láminas beta que se tuercen y enrollan para formar una estructura cerrada en donde la primera cadena de láminas beta se une a la última a través de enlaces por puente de hidrógeno. Estas láminas beta generalmente forman arreglos anti paralelos. Las estructuras de barril se encuentran comúnmente en proteínas que atraviesan membranas celulares y que se unen a ligandos hidrofóbicos en el centro del barril (Corbin *et al.*, 2007). El dominio carboxi terminal es de aproximadamente 55-65 kDa y consiste en α -hélices que contienen el sitio catalítico de la enzima (Schneider *et al.*, 2007). En el mismo, el sitio activo del hierro es un grupo no hemo coordinado octaédricamente por cinco amino ácidos, que en el caso de las plantas son tres histidinas, una asparragina y una isoleucina y un ligando hidrofílico (Andreu *et al.*, 2009).

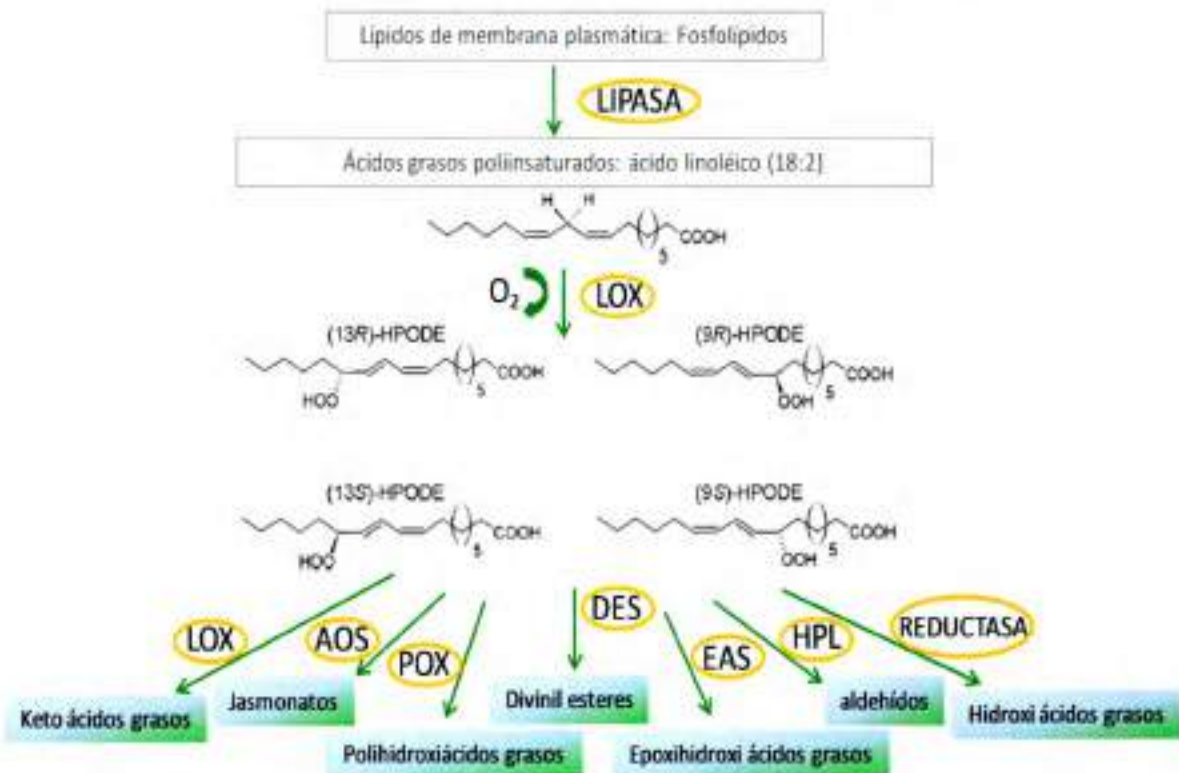
La función de las LOXs es la catálisis de la inserción de oxígeno molecular en ácidos grasos poli insaturados, los cuales contienen uno o más fracciones pentadienos para convertirlos en los correspondientes hidroperóxidos (Liavonchaka *et al.*, 2006).

En general los metabolitos derivados de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados ya sea a través de la vía de la lipoxigenasa como de reacciones alternativas de oxidación, son llamados oxilipinas.

A continuación se presenta a modo de resumen un esquema de la Vía de la LOX, las posibles causas de activación, sus productos y la cascada de reacciones motivada por la formación de los mismos.

ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA VÍA DE LIPOXIGENASA

- | | |
|---|--|
| <p>Ambiente</p> <ul style="list-style-type: none"> Ataque de Patógeno Herbívoro Daño Mecánico Respuesta al tacto Shock osmótico. Sequía Luz UV Ozono | <p>Desarrollo</p> <ul style="list-style-type: none"> Dehiscencia de arteras Desarrollo del polen Tuberización Senescencia Floración Crecimiento de raíz Germinación de semillas Formación de tricomas Almacenamiento |
|---|--|



Abreviaturas: AOS, aleno óxido sintetasa; DES, divinil ester sintetasa; EAS, epoxi alcohol sintetasa; HPL, hidroperóxido liasa; LOX, lipoxigenasa; POX peroxigenasa.

Las LOXs pueden ser clasificadas en base a: a) localización subcelular y/o b) especificidad posicional.

a) Localización subcelular: es posible identificar dos tipos de LOXs: Tipo I, aquellas en las cuales no se produce tránsito peptídico y Tipo II, existe un tránsito de la secuencia peptídica en el cloroplasto.

b) Especificidad posicional de la oxigenación del ácido linoléico. El oxígeno puede ser introducido tanto en el átomo de carbono de posición 9 del ácido siendo así una 9-LOX que produce ácido 9-hidroperoxioctadeca-10,12dienoico (9-HPODE); como en el átomo de carbono de posición 13 del ácido, siendo así una 13-LOX y que produce ácido 13-hidroperoxioctadeca-9,11dienoico (13-HPODE) (Andreu *et al.*, 2009).

Gracias a los aportes realizados por estudios inmunocitoquímicos en plantas ha sido posible localizar a nivel celular a las LOXs; su ubicación ha sido descrita en el citosol del parénquima celular y en vacuolas en la epidermis de semillas (Wang *et al.*, 1999) alrededor del haz vascular. Los tejidos en donde predomina la enzima y la localización subcelular de la misma es similar tanto en los cotiledones germinantes como en los estadios vegetativos (Stepherson *et al.*, 1998).

Si bien las funciones fisiológicas de las diferentes isoenzimas de LOX no han sido totalmente descritas aún, es posible relacionar las LOXs a diferentes funciones en plantas como por ejemplo: en el crecimiento y el desarrollo (Kubacka-Zebalska *et al.*, 1980), en la senescencia (Leshem, 1988), en respuesta a patógenos (Slusarenko, 1996), en el daño mecánico (Creelman *et al.*, 1992), en el estrés abiótico (Maccarrone *et al.*, 1991), como proteínas de reserva (Tranbarger *et al.*, 1991), en la biosíntesis de compuestos regulatorios como el ácido abscísico, la traumatina y los jasmonatos (Zimmerman *et al.*, 1979).

En plantas, las lipoxigenasas han sido involucradas en dos grandes vías metabólicas de los ácidos grasos hidroperóxidos, conocidas como la vía de la lipoxigenasa (LOX). Una

de ellas involucra al ácido traumático, compuesto relacionado a la respuesta al daño celular (Zimmerman *et al.*, 1979); mientras que la otra vía produce el ácido jasmónico, una molécula involucrada en el rol regulatorio celular (Staswick, 1992).

Las lipoxigenasas al oxigenar los ácidos grasos poli insaturados como es el caso del ácido linoléico, producen ácidos grasos hidroperóxidos (HPODE). En función de la posición del átomo de oxígeno incorporado a la cadena carbonada, es posible determinar los diferentes isómeros de los ácidos grasos hidroperóxidos formados tras la oxidación (Andreu *et al.*, 2009).

Como fue mencionado con anterioridad, los metabolitos originados a partir de la oxigenación o de la conversión de ácidos grasos poli insaturados, son llamados en general como oxilipinas, las mismas pueden provenir tanto de plantas como de patógenos como hongos (Tsitsigiannis *et al.*, 2007). Pueden generarse por medio de la vía de la LOX, del complejo citocromo P450 en el retículo endoplasmático y de una dioxigenasa con similitud estructural a la cicloxigenasa animal (Shea *et al.*, 2006). Se sintetizan *de novo* ya sea por daño mecánico, herbívoro, o bien por ataque de patógenos, por cambios medio ambientales que generan estrés y por desarrollo fisiológico (Howe *et al.*, 2002).

En la interacción que se produce entre el huésped y el patógeno fúngico, las oxilipinas presentan un papel fundamental, pudiendo ser generadas por ambos actores de la interacción dado que estimulan señales implicadas en el mantenimiento de la defensa en las plantas. Las oxilipinas poseen efectos antimicrobianos, actuando como barreras directas de defensa, regulan la muerte celular y producen hormonas como el ácido jasmónico (Shah, 2005). Dicha hormona se produce a partir de la acción de la vía de la LOX, en la defensa ante patógenos. La enzima actúa sobre el ácido linoléico, dando origen al ácido hidroperóxido correspondiente (ácido hidroperoxioctadecatrienoico, HPOTE), luego por acción de la aleno oxido sintetasa (AOS), la hidroperóxido liasa (HPL), la divinil ester sintetasa (DES), la epoxyalcohol sintetasa, la peroxigenasa, la alquil hidroperóxido reductasa y la propia lipoxigenasa, se desarrolla una cascada de reacciones que da origen a la familia de los jasmonatos (ácido jasmónico, ácido metil jasmónico y su

precursor el ácido oxofitodienoico). La acción de la familia de compuestos resultantes se encuentra en estudio, sin embargo se cree que poseen acciones tendientes a preservar la viabilidad de las plantas o en su defecto regulando la muerte celular (Blée, 2002; Taniguchi *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2014; Warternack, 2014).

Diferentes estudios han permitido concluir que la vía de la LOX juega un papel fundamental en la interacción planta-patógeno y más específicamente en la interacción *Aspergillus spp.*-semilla, donde productos derivados de ácidos grasos poli insaturados inhiben la esporulación de *Aspergillus spp.* y a su vez productos como el jasmonato de metilo inhibe la biosíntesis de aflatoxinas sin modificar el crecimiento fúngico (Doehlert *et al.*, 1993).

La penetración de las hifas fúngicas, causa la liberación de ácidos grasos que se convierten en hexanal, compuesto que inhibe el crecimiento fúngico, además las LOXs pueden actuar directamente, inhibiendo las lipasas fúngicas (Gardner *et al.*, 1995) y afectar también la concentración de los inhibidores de proteasas a través de la biosíntesis de jasmonatos, los cuales activan los genes de los inhibidores de proteasas (De Carvalho *et al.*, 1999).

En trabajos previos ha sido estipulado que los ácidos grasos hidroperóxidos 9-HPODE y 13-HPODE, productos de la acción enzimática de LOXs aplicados exógenamente a cultivos de *Aspergillus* afectan de manera diferencial a la producción de micotoxinas de *Aspergillus spp.* Así el 9-HPODE aumenta la expresión génica y produce el estímulo para la producción de micotoxinas, mientras que 13-HPODE induce la esporulación, reprimiendo la biosíntesis de las micotoxinas (Burow *et al.*, 1997). De esta manera los ácidos grasos hidroperóxidos provenientes de la vía de la LOX, actuarían como factores de esporulación y de defensa, sugiriendo que las LOXs jugarían un papel en la defensa ante la infección con *Aspergillus spp.* y la contaminación con aflatoxinas.

En estudios realizados previamente en el grupo de trabajo, fueron aislados e identificados en la semilla de maní compuestos hidroxí ácidos grasos con actividad anti-fúngica que derivan de la vía de la LOX (Tesis Doctoral Dr. Asis). Estos compuestos fueron

formados en respuesta a la infección de *Aspergillus parasiticus*, encontrando una producción diferente en composición y contenido entre un cultivar resistente y otro susceptible a la infección con este hongo, lo cual pone en evidencia una relación de la vía de LOX y la resistencia de la semilla.

Con base a los antecedentes mencionados previamente, surge la necesidad de investigar acerca de la Vía de Defensa de la LOX, observar que sucede durante la infección fúngica sobre las semillas de maní con: la actividad enzimática, la expresión génica, los productos derivados de la enzima y la biosíntesis de micotoxinas, las interrelaciones con la expresión de los inhibidores de proteasas, la presencia de proteínas relacionadas a la defensa en plantas y el análisis de las respuestas en ensayos a campo.

2. OBJETIVOS

La hipótesis del presente trabajo sostiene que la resistencia a la infección fúngica y contaminación con aflatoxinas estaría relacionada con la capacidad defensiva de la semilla de *Arachis hypogaea* ante la infección con *Aspergillus spp.*, la cual se manifestaría con una regulación y producción de compuestos de defensa diferente entre los genotipos.

Como primer objetivo en el presente capítulo se planteó investigar la composición química de las semillas en términos de la vía de las enzimas lipoxigenasas (LOX) y sus productos. Enfocando especial atención en la primera etapa limitante de esta Vía.

Posteriormente se propuso estudiar e identificar aquellos genes de LOX que participan en la defensa de la semilla de maní.

3. RESULTADOS

3.1. Ensayo de cinética de infección

En estudios previos en el grupo, fue evaluada la susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas en semillas de diversos cultivares generados en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, encontrándose tres cultivares con resistencia reportada: Pi 337394, Pi 337409 y J11; mientras que los cultivares Florman, Manfredi 68 y Colorado Irradiado presentaron susceptibilidad a la contaminación con las micotoxinas ensayadas (Asis *et al.*, 2005).

En dicho estudio, fueron utilizadas 21 especies aisladas de *Aspergillus flavus* y *parasiticus* obtenidos a partir de la producción local de maní. Fue posible determinar que el cultivar Pi 337394 posee una alta tolerancia a la contaminación con aflatoxinas asociada a una alta tolerancia también a la infección fúngica tanto en las semillas con tegumento como en los cotiledones desnudos. En contra posición en el cultivar Florman fue posible concluir que posee una elevada susceptibilidad tanto a la infección fúngica como a la contaminación con aflatoxinas.

En el presente trabajo, las semillas sin tegumento del cultivar Pi 337394, presentaron alta tolerancia a la infección con *Aspergillus parasiticus* y a la contaminación con aflatoxinas, mientras que las semillas del cultivar Florman mostraron elevada susceptibilidad tanto a la infección fúngica como a la contaminación con micotoxinas.

Para definir los tiempos post inoculación utilizados fueron realizados ensayos preliminares hasta 120 hs., encontrando que a las 72 hs. las diferencias fueron mayores entre ambos cultivares. Para lo cual fueron ajustadas metodologías bioquímicas y moleculares a fin de analizar las semillas inoculadas con la suspensión de *Aspergillus parasiticus* y las semillas no inoculadas (control) con el objeto de obtener la respuesta relativa a la infección a diferentes tiempos post inoculación (5hs., 10hs., 20hs., 27hs., 48hs. y 72hs.). Dichos tiempos se seleccionaron en función de ensayos previos de infección y germinación de las semillas de los cultivares seleccionados como modelo de estudio.

En la **Figura III.1 A y B**, se presenta el porcentaje de germinación junto al de infección relativizado a la media de los controles, con la finalidad de independizarse del efecto germinativo y de infección natural de las semillas propiamente dicho.

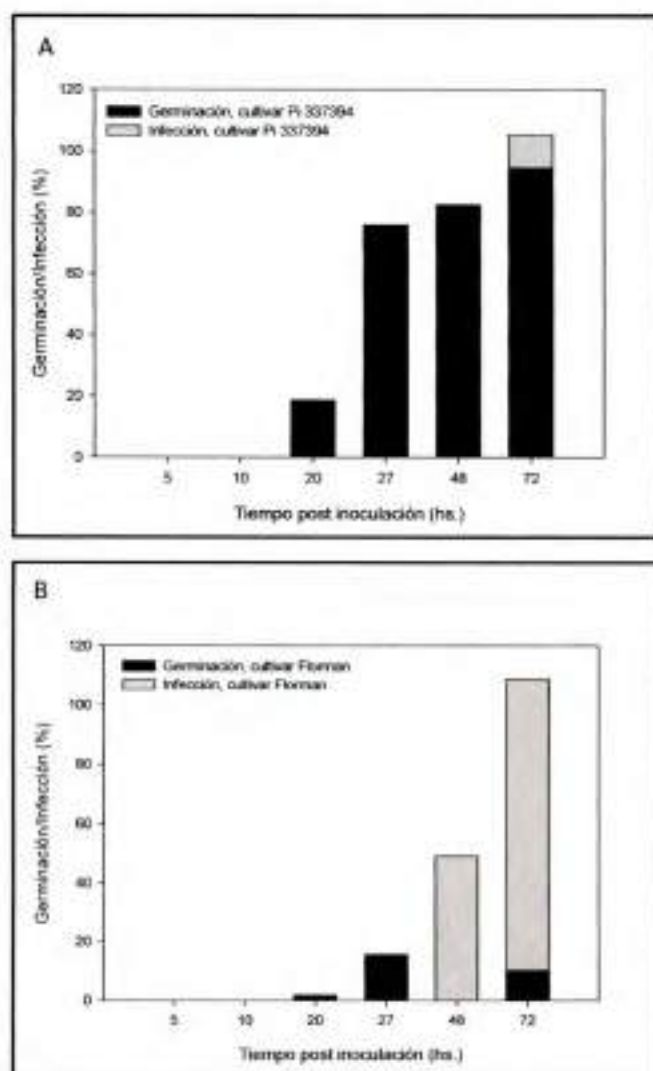


Figura III.1: Porcentaje de germinación e infección relativizado a la media de los controles en cada tiempo post inoculación. A: Cultivar Pi 337394, B: Cultivar Florman.

En términos de germinación, en el cultivar Pi 337394 a medida que avanzó el tiempo de estudio de las semillas control, las mismas germinaron en mayor proporción que las

correspondientes inoculadas con el hongo, lo que indicaría la interferencia de las respuestas a la infección en el proceso germinativo.

En cuanto al cultivar Florman, la germinación fue totalmente afectada por la infección fúngica. La determinación por inspección visual del grado de infección, en el cultivar Florman a partir de las 48 hs. post inoculación muestra que el 50% de las semillas se presentaron infectadas y que a las 72 hs. post inoculación la totalidad de las mismas denotaron infección masiva.

Por otro lado, en el cultivar Pi 337394 no fue observada infección alguna hasta las 72 hs. post inoculación, donde solo un 10% de las mismas presentaron signos de infección fúngica.

A modo ilustrativo en la **Figura III.2**, se presentan fotografías de una de las replicas de ambos cultivares y sus respectivos controles a 48 hs. post inoculación.

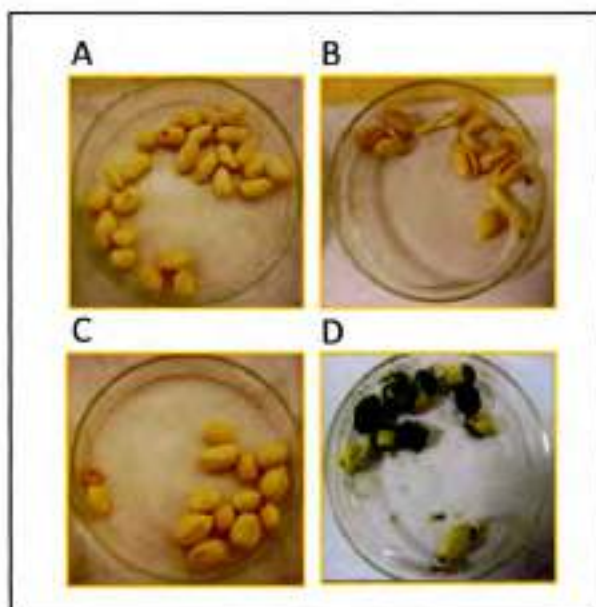


Figura III.2: Imagen fotográfica de las semillas a las 48 hs. post inoculación.

Cultivar Pi 337394: semillas control (A) e inoculadas (B). Cultivar Florman: semillas control (C) e inoculadas (D).

2.2. Determinación de la actividad de Lipoxigenasas

La actividad enzimática de lipoxigenasas (LOXs) fue cuantificada con la finalidad de evaluar la respuesta de la vía de LOX a la infección con *Aspergillus parasiticus* en el modelo de los genotipos resistente y susceptible a diferentes tiempos post inoculación.

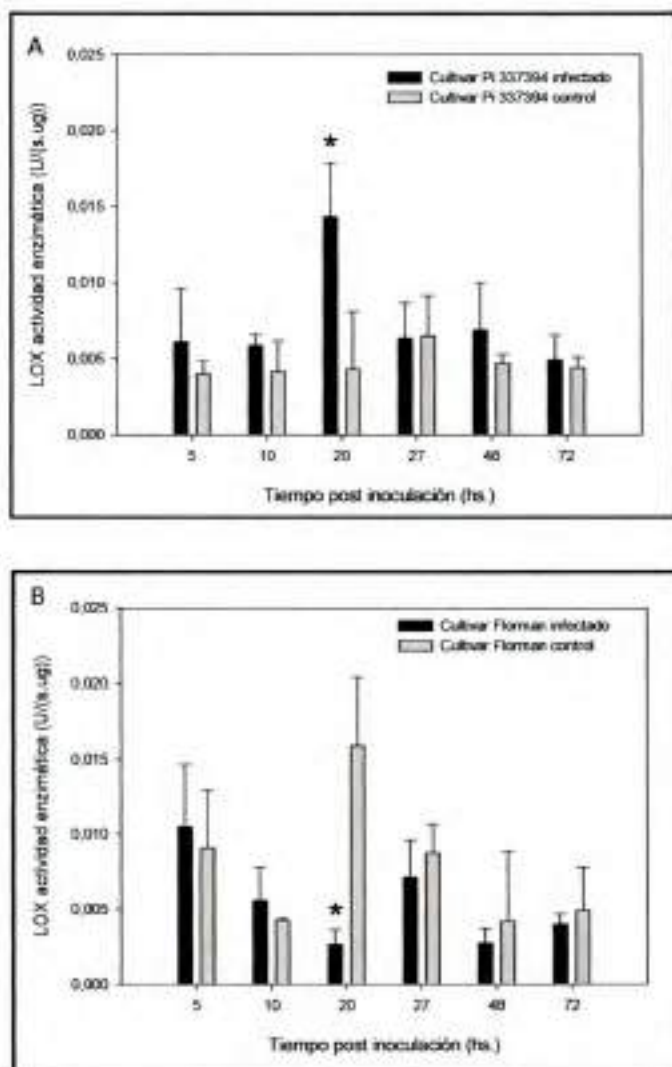


Figura III.3: Actividad enzimática de LOX, expresada como unidades de actividad enzimática/(segundo x μg de proteínas). A: Cultivar Pi 337394, B: Cultivar Florman. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$.

En la **Figura III.3**, se observa la actividad específica de la lipoxigenasa en las semillas infectadas y control, para el cultivar Pi 337394 en A y para Florman en B.

Las diferencias significativas en términos de actividad específica fueron encontradas a las 20 hs. post inoculación en ambos cultivares inoculados con respecto a los controles. A dicho tiempo de estudio, el cultivar Pi 337394 presentó un aumento significativo de actividad en las semillas infectadas con respecto a los controles, mientras que en el cultivar Florman las semillas infectadas manifestaron una menor actividad enzimática que los respectivos controles, indicando así una respuesta temprana a la infección por parte de la enzima en estudio.

3.3. Análisis de regio especificidad de Lipoxigenasas

Como se indicó en la **Sección 1** del presente **Capítulo**, las isoformas de las enzimas lipoxigenasas poseen regio especificidad diferencial, que se refleja en la proporción de los isómeros del ácido graso hidroperóxido formados. El oxígeno puede ser introducido tanto en el átomo de carbono de la posición 9 del ácido siendo así una 9-LOX y produciendo el ácido 9-hidroperoxioctadeca-10, 12 dienoico (9-HPODE); como en el átomo de carbono de la posición 13 del ácido siendo así una 13-LOX y produciendo el ácido 13-hidroperoxioctadeca-9,11dienoico (13-HPODE) (Andreu *et al.*, 2009).

Para estudiar la regio especificidad se cuantificaron por *HPLC* los hidroperóxidos formados tras la reacción de las enzimas extraídas de ambos cultivares a los diferentes tiempos post inoculación con el sustrato (ácido linoléico). Previo al análisis por *HPLC* los ácidos grasos hidroperóxidos (HPODE) fueron reducidos con cloruro estañoso a los correspondientes ácidos grasos hidroxilados (HODE) a los fines de obtener mayor estabilidad. Con el objeto de corroborar la identidad de los ácidos grasos hidroxilados (9-HODE: ácido 9 hidroxioctadeca-10,12-dienoico y 13-HODE: ácido 13 hidroxioctadeca-9,11-dienoico), los mismos fueron recolectados y posteriormente analizados por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (*CG-EM*).

En la **Figura III.4** se presentan los cromatogramas obtenidos por *HPLC* y por *CG-EM*. El 9-HODE y el 13-HODE fueron caracterizados de acuerdo al ión molecular (M^+), $382\ m/z$ y por los fragmentos representados por los picos a 311 y $225\ m/z$, comparados con la bibliografía correspondiente (Johnson *et al.*, 1997).

La **Figura III.5** muestra las posiciones de ionización de los compuestos.

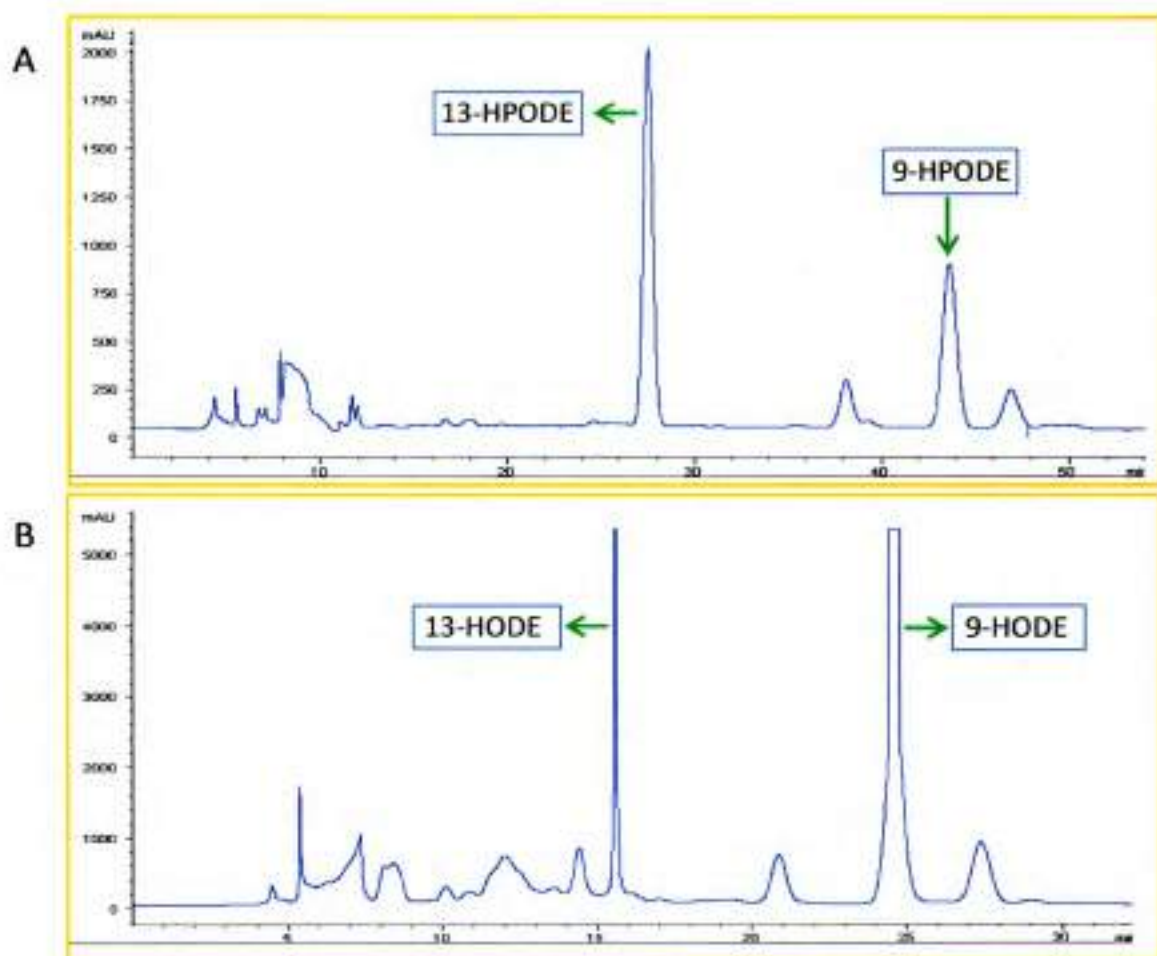


Figura III.4: Cromatogramas de *HPLC* de 13-HODE y 9-HODE (A), de 13-HODE y 9-HODE (B).

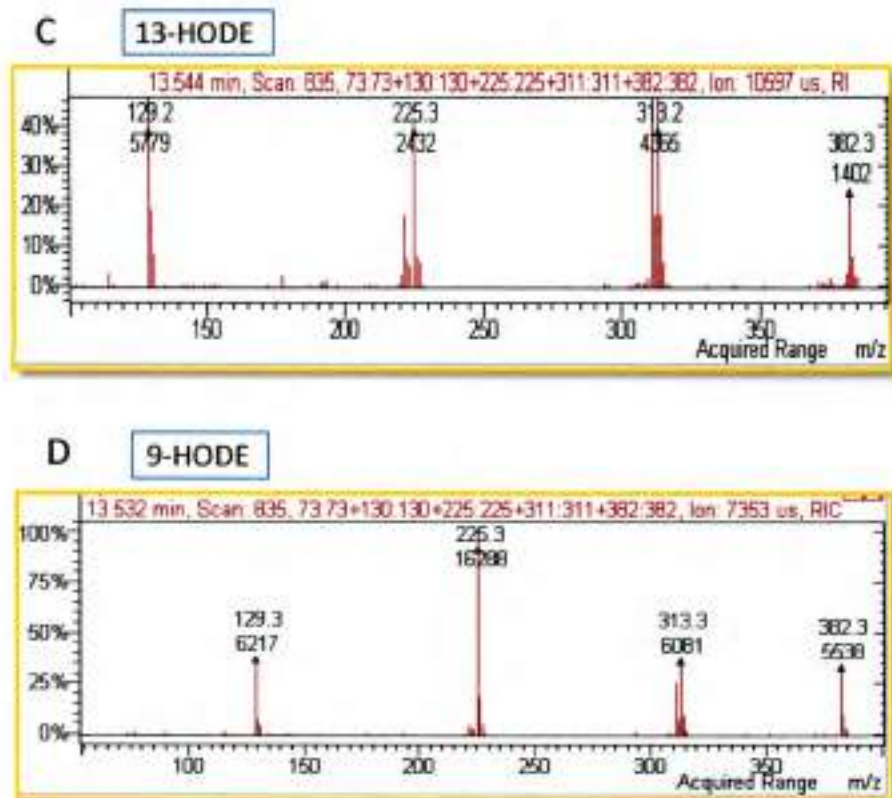


Figura III.4: Cromatogramas de GC-EM de 13-HODE (C) y 9-HODE (D).

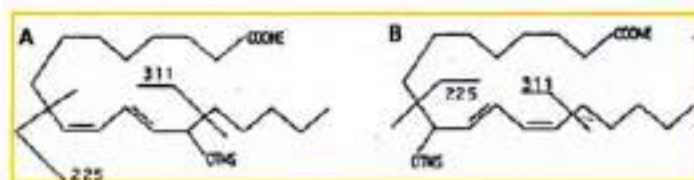


Figura III.5: Posiciones de ionización de los ácidos grasos: 13-HODE en A; 9-HODE en B.

La composición porcentual de 9-HPODE y 13-HPODE se muestra en la **Figura III.6** para ambos cultivares. Las diferencias significativas en la composición isomérica entre semillas infectadas y controles en el cultivar Pi 337394 fueron halladas a las 10 hs. post

inoculación donde la composición de HPODE presentó un incremento de la proporción de 9-HPODE (73%) en respuesta a la infección.

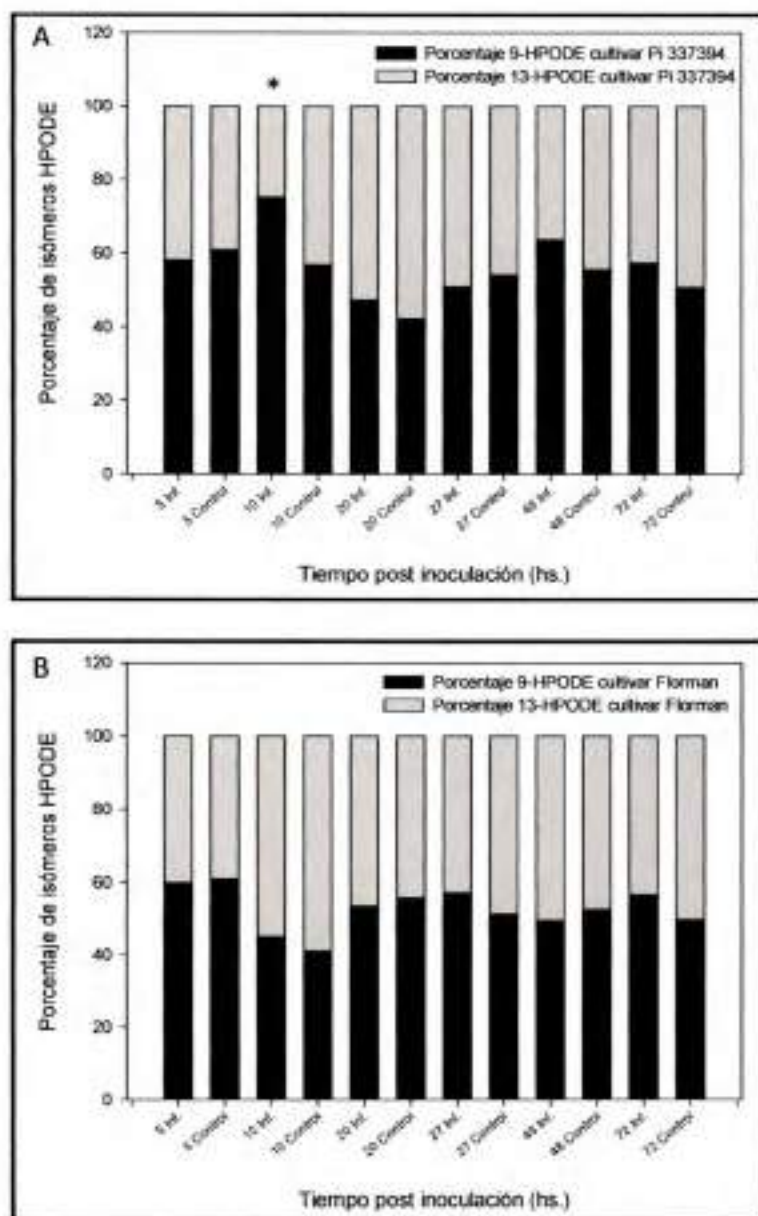


Figura III.6: Porcentaje de 9-HPODE y 13-HPODE. A: Cultivar PI 337394, B: Cultivar Florman. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$.

A partir de las 20 hs. post inoculación se observó un aumento en la proporción de 13-HPODE (53%) en el cultivar Pi 337394, el cual gradualmente se redujo hasta llegar al 36% a las 48 hs.

El cultivar Florman, no presentó diferencias significativas entre semillas infectadas y control. A las 10 hs., se encontró un aumento en la proporción del 13-HPODE (59%) en las semillas control e infectadas del cultivar susceptible. Posterior a este tiempo la proporción de 13-HPODE se redujo al 46% a las 20 hs., manteniéndose relativamente constante a lo largo del resto de los tiempos ensayados.

Al comparar las semillas control de cada cultivar, fueron encontradas diferencias significativas a las 10 hs.

Estos resultados ponen en evidencia la coordinación de la respuesta de las lipoxigenasas, no solo en cuanto a actividad de la misma, sino también a su modalidad de acción regio específica. Además muestran un predominio de la actividad de 9-LOX en el cultivar resistente y una actividad de 13-LOX en el susceptible.

3.4. Determinación de acidez en aceites

El contenido de ácidos grasos en el aceite de las semillas fue cuantificado a los diferentes tiempos post inoculación y refleja en cierta forma la actividad de lipasas en la semilla. Está descrito que las fosfolipasas son activadas por condiciones de estrés biótico y abiótico; y que actúan como activadores de la vía de la lipoxigenasas, liberando ácidos grasos insaturados desde la membrana plasmática como lo son el ácido linoléico y linolénico, ambos susceptibles de la acción de la lipoxigenasa en el citoplasma y en los plástidos (Upchurch, 2008).

Los ácidos grasos fueron determinados a partir de la titulación de la acidez de los aceites y expresados como gramos de ácido oleico por cada 100 gramos de aceite. La **Figura III.7** muestra los resultados, donde es posible observar un incremento gradual en la

acidez tanto de las semillas resistentes como susceptibles, control e infectadas. Sin embargo, el cultivar Florman presentó diferencias marcadas a partir de las 48 hs.

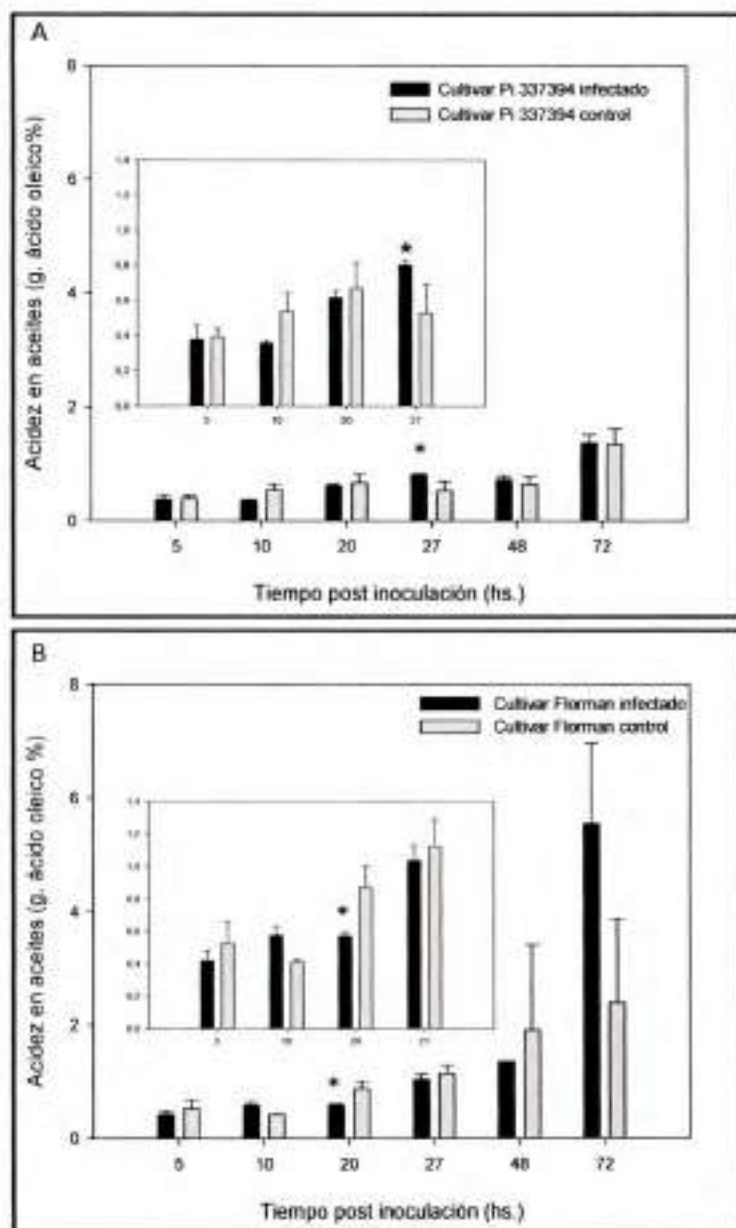


Figura III.7 Acidez en aceites, expresado como gramos de ácido oleico por cada 100 g de aceite. A: Cultivar Pi 337394, B: Cultivar Florman. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$.

Las diferencias significativas en acidez entre semillas control e infectadas del cultivar Pi 337394 fueron encontradas a las 27 hs., mientras que en el cultivar Florman fueron a las 20 hs. post inoculación. En el cultivar Florman se observa un aumento de la acidez con respecto al control a las 10 hs. y a las 72hs. post inoculación, mientras que a las 20 hs. y 48 hs. la regulación de la acidez se presenta disminuida con respecto a los controles. En contraposición, en el cultivar Pi 337394 muestra una acidez aumentada con respecto a los controles a las 27 hs. y disminuida a las 10 hs. post inoculación.

3.5. Cuantificación de hidroperóxidos en aceites

Los ácidos grasos hidroperóxidos son producidos por acción enzimática de las lipoxigenasas. Se cuantificó el peróxido en los aceites de las semillas a los diferentes tiempos post inoculación fúngica de los cultivares del modelo ensayado.

La **Figura III.8** nos muestra que las diferencias significativas en el contenido de peróxidos entre las semillas control y las infectadas fueron encontradas a las 10 hs. post inoculación en ambos cultivares.

Así mismo, cabe destacar que la regulación de la producción de peróxidos en las semillas infectadas con respecto al control en el cultivar Florman se encontró disminuida a las 27 hs.; en tanto en Pi 337394 lo fue a las 10 hs. y 20 hs. seguido de un aumento a las 27 hs.

Con lo anteriormente expuesto es posible concluir que las diferencias significativas entre ácidos grasos libres y ácidos grasos hidroperóxidos (HPODE) en las semillas de maní como respuesta a la infección con *Aspergillus parasiticus*, se detectaron entre las 10 hs. y las 27 hs. post inoculación y con una respuesta diferencial entre ambos cultivares; siendo dicho período de tiempo el cual presentó la mayor diferencia en la actividad enzimática de lipoxigenasa entre Pi 337394 y Florman.

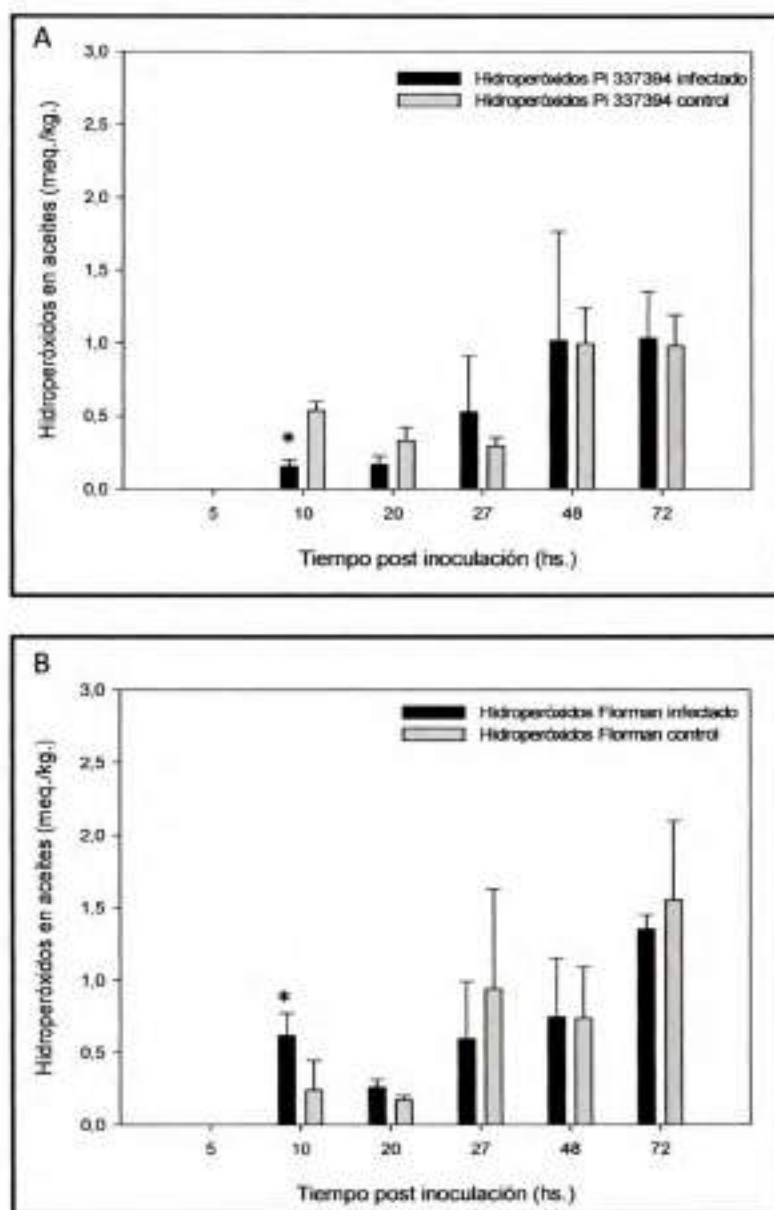


Figura III.8 Hidroperóxidos en aceites, expresados como miliequivalentes de oxígeno consumido por cada 1000 g de aceites. A: Cultivar Pi 337394, B: Cultivar Florman. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$.

3.6. Cuantificación de aflatoxinas por HPLC

En la **Figura III.9** se observan los valores obtenidos para aflatoxinas en las semillas inoculadas de ambos cultivares ensayados.

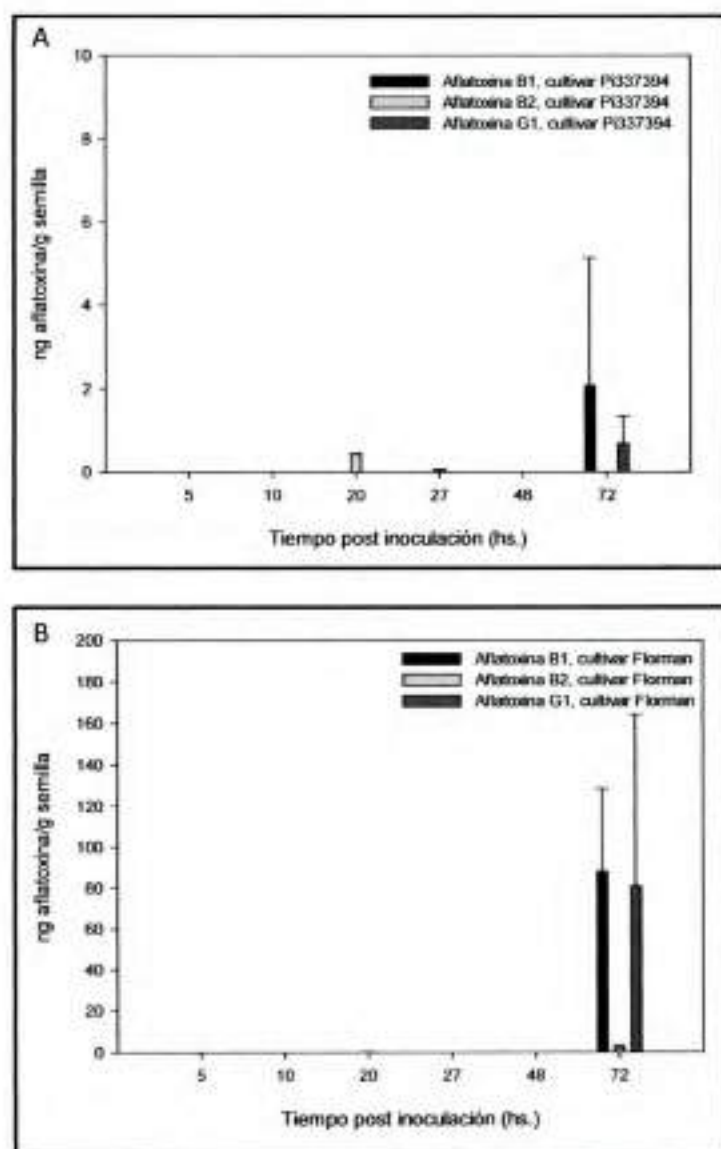


Figura III.9 Aflatoxinas, expresadas como ng de aflatoxinas por gramo de semillas. A: Cultivar Pi 337394, B: Cultivar Florman.

En el cultivar Florman se encontraron aflatoxinas a las 72 hs. post inoculación, siendo mayores los niveles de aflatoxina B1 y G1.

Si bien en los datos analizados es posible observar una alta dispersión de resultados, esto se debe a variabilidad biológica de las replicas analizadas en el ensayo, no habiéndose eliminado dichos valores por ser considerados representativos de la infección sufrida por las semillas a dicho tiempo. En tanto en el cultivar PI 337394, fue encontrada la aflatoxina B1 y la G2, con un aumento a las 20 hs. y un máximo a las 72 hs. post inoculación.

Con lo anteriormente expuesto, se puede concluir que el cultivar Florman presenta susceptibilidad a la contaminación con aflatoxinas en las condiciones del ensayo.

3.7. Análisis de genes candidatos

3.7.1. Selección de genes candidatos

Utilizando como base los cambios bioquímicos encontrados en el estudio del modelo de dos cultivares durante la infección con *Aspergillus spp.*, se propuso como objetivo identificar y estudiar los genes que codifican para las lipoxigenasas involucradas en tales respuestas bioquímicas. Para ello, fue necesaria la realización de una búsqueda de secuencias de *unigenes* a través de la base de datos de secuencias de montaje de transcriptomas: *Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database*, disponible de manera libre en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tsa>.

De esta manera dos secuencias depositadas en la base de datos fueron seleccionadas para realizar los análisis correspondientes. Las mismas fueron denominadas en el presente trabajo como LOX 4 y LOX 5, siendo los números de acceso en la base de datos gb|EZ722311.1 y gb|JR564445.1 respectivamente. De acuerdo a la secuencia publicada en la base de datos, se procedió a identificar los marcos abiertos de lecturas (en inglés *ORF: open reading frame*) que codifican para proteínas de 863 aminoácidos para

LOX 4 y 860 aminoácidos para LOX 5, los cuales albergan un dominio pequeño amino terminal *PLAT-LH2* y un dominio carboxi terminal mayor, de tipo catalítico y perteneciente al dominio de la *super familia* de las lipoxigenasas. Esto se observa en la **Figura III.10**.

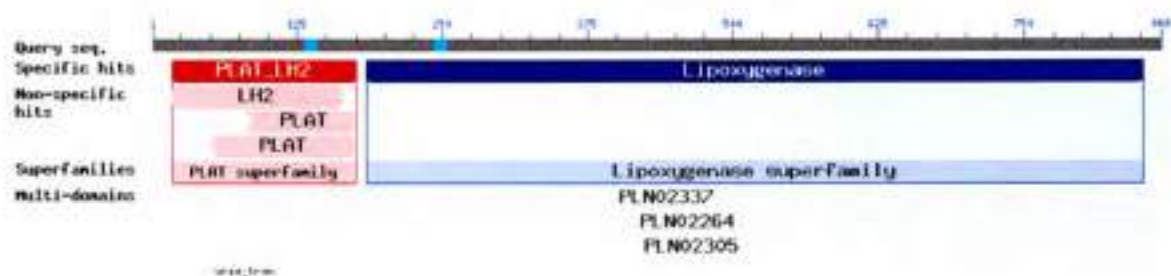
A su vez la localización subcelular de LOX 4 como LOX 5 fueron predichos por PSORT y TargetP, donde no se detectaron secuencias de tránsito peptídico, sugiriendo de esta manera la localización citosólica de ambos.

Por otra parte para el estudio de las LOX 2 y LOX 3, se utilizó un trabajo donde estudiaron la respuesta enzimática en función de la infección con *Aspergillus spp.*, a los fines de comparar dicha respuesta en nuestro modelo de estudio (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). Las lipoxigenasas 2 y 3 presentan una elevada homología, pudiendo ser variantes alélicas del mismo *locus* en el genoma tetraploide de mani.

Razón por la cual ha sido descrito en la bibliografía un par de cebadores que permiten analizar indiscriminadamente la presencia de los genes que codifican para ambas isoformas de enzimas (Tsitsigiannis *et al.*, 2005), de manera tal que serán referidas como LOX 2-3 de ahora en adelante, sin la posibilidad de diferenciarlas por medio de la metodología utilizada.

Figura III.10 Genes seleccionados de la base de datos, números de acceso y secuencia de nucleótidos (superior) y de aminoácidos (inferior) para LOX 4 y LOX 5. Asteriscos (*) indican el probable codón de terminación.

LOX4 -gi|298114570|gb|EZ722311.1| TSA: Arachis hypogaea CL1Contig1327. Arhy mARN sequence



31 atggttttcgggagtgacaagtctggtgaacaggggacacaagatt
 M F S G V T S L V N R G H K I
 76 aagggcacggtggtgctgatgcgcaagaacgtccttgacatcaac
 K G T V V L M R K N V L D I N
 121 tcccttaccagcgtcagggactcatcggccaaggcctcggcttc
 S L T S A Q G L I G Q G L G F
 166 gtccgctcaaccatcgataatctcacggccttcttgggcccgtct
 V G S T I D N L T A F L G R S
 211 gtctccctccacctcattagtccaccaaacccagatgggaatggg
 V S L H L I S A T K P D G N G
 256 aagggcaaagttgaaagagcacgtttttggaaggcataaatct
 K G K V G K S T F L E G I I S
 301 tcggtgccaacattggggagcagggcaatctgcattcactattcat
 S L P T L G A G Q S A F T I H
 346 ttogaatgggatgatggtgagatgggaattccaggagcattttac
 F E W D D G E M G I P G A F Y
 391 atcaagaatttcatgcaaaactgagttcttctccttactttgact
 I K N F M Q T E F F L L T L T
 436 cttgaagacattccaaacctgcaaactctcaaatccactttggt
 L E D I P N H A N L K I H F V
 481 tgcaactcctggatttataatgctaaaaactacaaaaccgatcgc
 C N S W I Y N A K N Y K T D R
 526 attttctttccaacaagacatatcttccaagtgcacgccagca
 I F F S N K T Y L P S D T P A
 571 ccacttgtaaagtacaggggaagatgaattgaagaatttaagagga
 P L V K Y R E D E L K N L R G
 616 gatggaaaaggagagcgaagaatgataggtatctatgattat
 D G K G E R K E Y D R I Y D Y
 661 gatggttacaatgatttggggaatccagatagcaatgaaaaat
 D V Y N D L G N P D S N E K Y
 706 gctcgcctggttcttggaggatctactttaccttaccctcgtaga
 A R P V L G G S T L P Y P R R
 751 ggaagaacaggaagaccaaccactaacaagatcctaagagcgag
 G R T G R P T T N K D P K S E
 796 aaacggagcgattttgtttacctaccaagggacgaagcatttgg
 K R S D F V Y L P R D E A F G
 841 cacttgaagtcatcagattttctaacttatggactaaaatctgta
 H L K S S D F L T Y G L K S V
 886 gcacaagatgtgatgacctgttctcacagatgcatttgattcaaat
 A Q D V M P V L T D A F D S N
 931 atcttaactcttggatttggatgattttgctgaagtggaataactc
 I L T L E F D D F A E V D K L
 976 tatactggtggaattacactacctacaaactttctcagcaagttt
 Y T G G I T L P T N F L S K F
 1021 tccccttggccagtactcaaggaaattctaogaacagatggtgaa
 S P L P V L K E I L R T D G E
 1066 caattccttaaatatccaccacccaaagtcgatgcaagtgaataaa
 Q F L K Y P P P K V M Q V N K
 1111 tctgcatggatgactgatgaagaattttctagagaaacactagct
 S A W M T D E E F S R E T L A
 1156 ggtgtaaatcctaagtgcattaagagcttggaggagttccacca
 G V N P N V I K S L E E F P P
 1201 ggtagcaagctagatagtaaagctctatggtgatcatactagtaca
 G S K L D S K V Y G D H T S T

1246 atgaaaaaagaacatttagagcctaacttagaagggcttactgta
 M K K E H L E P N L E G L T V
 1291 gaacaggctattgagaaaaagaattgttcattctagatccacat
 E Q A I E K K K L F I L D H H
 1336 gactatttgattccatatttgagaagaataaattcaagcaagaca
 D Y L I P Y L R R I N S S K T
 1381 aaggcctatgctacaaggactatcttcttgaagatgatgga
 K A Y A T R T I F F L K D D G
 1426 actttaaagccactggccattgagctaagcaagccacatcctcaa
 T L K P L A I E L S K P H P Q
 1471 ggagaagagcgtgctgctgagtgatgtctatctaccagacat
 G E E H G P V S D V Y L P A H
 1516 gaaggagttgaaggttatatttgggtactggccaagcctatggt
 E G V E G Y I W V L A K A Y V
 1561 gttgtaaagactcatgctatcaccaacttggttagtcattggta
 V V N D S C Y H Q L V S H W L
 1606 aacactcatgcagttggtgaaccattcgtgatagcaacaaatagg
 N T H A V V E P F V I A T N R
 1651 catttgaatgtggttccccattaataaactactttccccacac
 H L N V V H P I N K L L S P H
 1696 tacctgacaccatgaaatataaattcacttgctcggaaagccttg
 Y R D T M N I N S L A R K A L
 1741 attaatgcagatggtattatagaacaacattcttgtgggtaga
 I N A D G I I E Q T F L W G R
 1786 tatgctttggaaatgtctgctgactctataaggattgggtttt
 Y A L E M S A V L Y K D W V F
 1831 ctagatcaagcattacctaataatgatctcatcaagagaggatggca
 L D Q A L P N D L I K R G V A
 1876 gttaaaggattcatcttctccccatggtgtgcaccttgatgag
 V K D S S S P H G V H L V I E
 1921 gattacccttatgcttctgatggattagaaatatgggatgctatt
 D Y P Y A S D G L E I W D A I
 1966 aaatcatgggttaaagagatggtgttctttactacaactcagat
 K S W V K E Y V F F Y Y N S D
 2011 gatgcactaaaacaagacactgaactccaagaatggtggaaagag
 D A L K Q D T E L Q E W W K E
 2056 cttgtagaggtaggtcatggtgacaagaagaatgagacatggtgg
 L V E V G H G D K K N E T W W
 2101 ccaaagatggaaactcgaaacgagttgattgaagcttcaaccact
 P K M E T R N E L I E A S T T
 2146 ctcatattggattgcttcagcacttcatgcagctattaatttggc
 L I W I A S A L H A A I N F G
 2191 caatacccttatggaggttacattcttaaccgccaacacttagc
 Q Y P Y G G Y I L N R P T L S
 2236 agaagattcatgacctgagaaagggctcctgagtatgatgaattg
 R R F M P E K G S P E Y D E L
 2281 gctaagaatcatgagaaggagttcttgaaaacaatcacaggggaag
 A K N H E K E F L K T I T G K
 2326 aaagagacactaattgatcttacagttattgaaattttgtcaagg
 K E T L I D L T V I E I L S R
 2371 catgcttctgatgagtcctaccttggacaaagggatgatggtgag
 H A S D E S Y L G Q R D D G E
 2416 ttttggacttgtgatactgaggcattagatgcctttaagagattt
 F W T C D T E A L D A F K R F

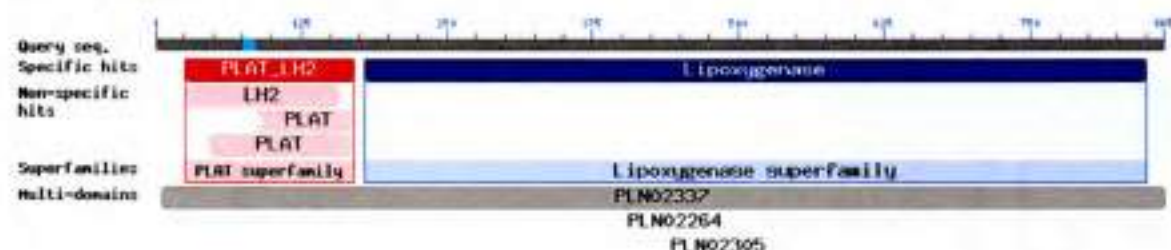
```

2461 ggaagaaaacttgcagagactgaacaaagattgatgcagaagaac
    G K K L A E T E Q R L M Q K N
2506 aatgatggatcattgaaaaatcgttctggaccagctaagatgcct
    N D G S L K N R S G P A K M P
2551 tacactttgctttatccttctagtgaggaaggggtgactttcaga
    Y T L L Y P S S E E G L T F R
2596 ggaattccaaatagtatctctatctaa 2622
    G I P N S I S I *

```

LOX5-gi|372416992|gb|JR564445.1| TSA: Arachis hypogaea Ahy.Unigene24553

mARN sequence



```

67 atgtttaagaacatcatcgacgctgtcactggcggaggcgacatg
    M F K N I I D A V T G G G D M
112 cagaaccaccgccagacagtgaaagggacggtggtgctcatgaaa
    Q N H R Q T V K G T V V L M K
157 aagaacggtgttggacttcaacgatttcagtgcttccctcctcgat
    K N V L D F N D F S A S L L D
202 cgccttcagtgatttctcgaaaaacgagtctctctccaaactcata
    R L H E F L G K R V S L Q L I
247 agtgcgctcaacgctgataatcatgaaatgggctgaaggggaag
    S A V N A D N H G N G L K G K
292 ctaggtaaggctgcatacttggaaagattggatcaccacattcaca
    L G K A A Y L E D W I T T F T
337 ccattgacagcaggagaagcagcattcacagttacttttgattgg
    P L T A G E A A F T V T F D W
382 gacaatgaggagataggaacaccaggtgcatttctaattaggaac
    D N E E I G T P G A F L I R N
427 aaccatcacagtgagttttaccttaaaagcctcacacttgaagat
    N H H S E F Y L K S L T L E D
472 gttccttcccattgggtgctcattcactttccttgtaattcttgggt
    V P S H G V I H F P C N S W V
517 tacctgtagtaaatatcaaaacgaccgggttttcttcccaac
    Y P A S K Y Q N D R V F F S N
562 aagacataccttccagctgaaacaccaaatatcaetgctcaagtat
    K T Y L P A E T P I S L L K Y
607 agagaagaagaactagagaatttaagaggggatgaaagggccag
    R E E E L E N L R G D G K G Q
652 ctccaagagtgggacagagctctatgattatgaagtctacaatgac
    L Q E W D R V Y D Y E V Y N D
697 ctgggaaatccagataaggggtccacaacatgctcgtccagttctt
    L G N P D K G P Q H A R P V L
742 ggaggggtccaccgaatatccatacctcgaagaggaagaaccggt

```

G G S T E Y F Y P R R G R T G
 787 agagcaccagctaaatcagatccaaagtatgagagtagggtgaat
 R A P A K S D P K Y E S R L N
 832 cttgctttgagcttaaacatataatgttccaagggatgaaagattt
 L A L S L N I Y V P R D E R F
 877 ggtcacttgaagttggcggattttctctcatatgcactgaaatct
 G H L K L A D F L S Y A L K S
 922 atagtccaagttctcaaaccggaattcgaatcaatattcgacaaa
 I V Q V L K P E F E S I F D K
 967 acccctaagtgaagttgacagctttgaagatgtactcaaactatat
 T P N E F D S F E D V L K L Y
 1012 gaaggtggacttgaagtgccctgaggggtgtaattaagggttattcgg
 E G G L E V P E G V I K V I R
 1057 gataatgttcctcttgagatgctcaaggaaatttttcgcaccgat
 D N V P L E M L K E I F R T D
 1102 ggtgaaaggttccctcaaatttccctctgcctcaagtgattgcagtg
 G E R F L K F P L P Q V I A V
 1147 gataagtttgcagtgagaacagacgaagaatttgcgagagatg
 D K F A W R T D E E F A R E M
 1192 ttggccggaataaaaccgggttatgatccgccgtctcgaagaattc
 L A G I N P V M I R R L E E F
 1237 ccaccagcaagcaagctagaccctaaagtctacggatgacaaacc
 P P A S K L D P K V Y G D Q T
 1282 agcacaataacaaaagaacacattgaaagtaatttggaaaggccac
 S T I T K E H I E S N L E G H
 1327 acaattaatgaggtaatccgsgaaagggaagttattcatattggat
 T I N E V I R E R K L F I L D
 1372 caccatgatgcactaatgcccatacctgagaaggataaaactccact
 H H D A L M P Y L R R I N S T
 1417 tctacaaagacttatgcttccagaacacttcttttggttgcaaaag
 S T K T Y A S R T L L L L Q K
 1462 aatgggacattaaagcccctcggccatcgagctgagtttggccgat
 N G T L K P L A I E L S L P H
 1507 cccgaggggatcaacatggtgccataagtaaagtttttggteccc
 P E G D Q H G A I S K V F V P
 1552 gaagaaaattccttggggcaactcgccaaagggttatgtcggagta
 E E N S L W Q L A K G Y V G V
 1597 gtcgactccggctatcatcaacttatcagccattggctacatact
 V D S G Y H Q L I S H W L H T
 1642 catgcagtcacgagccgtttattatcgcgacgaacaggcagctt
 H A V I E P F I I A T N R Q L
 1687 agtgttcttcatccaatttataagctgttacatcctcactatcgc
 S V L H P I Y K L L H P H Y R
 1732 gacaccatgaatataaatgcgcttggaaaggcagatcctcatcaat
 D T M N I N A L G R Q I L I N
 1777 gcaggtgggtgctctagaggtaacagtttttcatcaaaaatttcc
 A G G A L E V T V F T S K Y S
 1822 atggagttttcctctatgctttataaagattgggttttccggag
 M E F S S M L Y K D W V F P E
 1867 caagcactacctcaagatcttctcaagagaggagtggctgttaa
 Q A L P Q D L L K R G V A V K
 1912 gattcaagttgccacacggcattaagctattgatcgaggattac
 D S S C P H G I K L L I E D Y
 1957 ccttttgcagttgatggactagaaatctggttcgcatcaagata

```

P F A V D G L E I W F A I K I
2002 tgggttgaagactattgcagcgtttactacaaggacgatgagtca
W V E D Y C S V Y Y K D D E S
2047 atcaagaaagacgcagaactccaatcttgggtggaaggaaataagg
I K K D A E L Q S W W K E I R
2092 gagaagggccatggtgacaagaaagacgagccatggtggccaaag
E K G H G D K K D E P W W P K
2137 atgcagacacgtgaggagctcattgaaacatgogccatcattata
M Q T R E E L I E T C A I I I
2182 tggaccgcttcggctcttccatgcogccatcaacttcggacagtat
W T A S A L H A A I N F G Q Y
2227 ccgtacgggctaccocggcgaacocgtccagccataagtagcaaa
P Y G G Y P P N R P A I S S K
2272 ttggtgccgaaaaaaggaacgcccagatgatgaactgttggcg
L V P E K G T P E Y D E L L A
2317 aatcctgataagacttatctgaaaacattcacttcacagttcaaa
N P D K T Y L K T F T S Q F K
2362 gctgttcttgggaatttcacttgtggaatcttgtctaggcattct
A V L G I S L V E I L S R H S
2407 agtgatgaggtgtacttagggcagagagacactgaaaattggacg
S D E V Y L G Q R D T E N W T
2452 tcggatgctgacgcgttagaagcgtttgccaaagttcgggaagaag
S D A D A L E A F A K F G K K
2497 attgaagatattgaggaagggatgaagagaatgaacaatgatgag
I E D I E E G M K R M N N D E
2542 aaactgaggaacagatatggacctgttaagatgccctacactttg
K L R N R Y G P V K M P Y T L
2587 ctttacccttctagtgaaggtggactaacctggaagagggattcca
L Y P S S E G G L T G R G I P
2632 aatagtgtctcaatctaa 2649
N S V S I *

```

3.7.2. Análisis filogenético de los genes candidatos

Con la finalidad de observar la proximidad evolutiva y taxonómica de las lipoxigenasas estudiadas con las reportadas hasta el momento en la bibliografía, se realizó el análisis filogenético. Para lo cual se utilizó el programa *PHYLIP (Phylogeny Inference Package, version 3.63)*, en el cual las secuencias parciales aminoacídicas publicadas de lipoxigenasas de diferentes especies del reino vegetal fueron introducidas junto con las estudiadas en el presente trabajo.

El programa genera un árbol filogenético, donde se mencionan proteínas junto con los números de acceso de la base de datos *GenBank* correspondientes:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Las mismas se encuentran nombradas en base a la nomenclatura propuesta por Shibata (Shibata *et al.*, 1994).

En el esquema representativo del árbol filogenético de la **Figura III.11** se presenta la clasificación de las proteínas en función de las dos tipologías ya mencionadas en los antecedentes bibliográficos del presente capítulo (Tipo I son aquellas en las cuales no se produce tránsito peptídico. En las Tipo II existe un tránsito de la secuencia peptídica en el cloroplasto); además se agrega la clasificación de la regio-especificidad de las enzimas para producir los hidroperóxidos correspondientes (9-LOX y 13-LOX).

El análisis de la **LOX 2** y **LOX 3** según el árbol filogenético obtenido, las coloca dentro del grupo Tipo I, de las 13-LOX tal como fuera descrito por Tsitsigiannis (Tsitsigiannis *et al.*, 2005).

La **LOX 4** (seleccionada para ser estudiada en el presente trabajo) es encontrada dentro del grupo de las lipoxigenasas tipo 13 de leguminosas y agrupada a su vez como Tipo I.

Si bien en *Arachis hypogaea*, las lipoxigenasas LOX 1, LOX 2 y LOX 3 se encuentran en el mismo grupo, la LOX 4 estudiada presenta mayor cercanía a la LOX 4 (BAA03101), LOX 5 (AAB67732) y LOX 8 (AAC49159) de *Glycine max* (soja), con un porcentaje de identidad cercano al 80%.

Por otro lado la **LOX 5** en estudio se encuentra clasificada como Tipo I, y dentro del grupo de 9-LOX, encontrándose relacionada a la LOX 1 (CAB94852) de *Prunus dulcis* (almendro) con un 72% de identidad; y en menor grado relacionada a la LOX 1 (AAA32827) de *Arabidopsis* con un 68 % de identidad.

A continuación se presenta el listado de proteínas con nomenclatura de Shibata (Shibata *et al.*, 1994) y número de acceso a la base de datos *GenBank* utilizadas para la realización del árbol filogenético en el programa *PHYLIP*:

Arachis hypogaea: LOX1:Ah:1 (AAF60270), LOX1:Ah:2 (DQ068249), LOX1:Ah:3 (DQ068250).

Arabidopsis thaliana: LOX1:At:1 (AtLOX1, AAA32827), LOX2:At:1 (AtLOX2, AAA32749), LOX2:At:2 (AtLOX3, AAF79461), LOX2:At:3 (AtLOX4, AAF21176), LOX1:At:2 (AtLOX5, CAC19365), LOX2:At:4 (AtLOX6, AAG52309).

Cucumis sativus: LOX1:Cs:1 (AAC61785), LOX1:Cs:2 (CsULOX, AAA79186), LOX1:Cs:3 (CsLBLOX, CAA63483), LOX1:Cs:4 (CAB83038).

Glycine max: LOX1:Gm:1 (soybean LOX1, AAA33986), LOX1:Gm:2 (soybean LOX2, AAA33987), LOX1:Gm:3 (soybean LOX3, CAA31664), LOX1:Gm:4 (soybean vlxa, BAA03101), LOX1:Gm:5 (soybean vlxb, AAB67732), LOX1:Gm:6 (soybean vlxc, AAA96817), LOX1:Gm:7 (soybean vlxd, AAA03728), LOX1:Gm:8 (soybean vlxe, AAC49159).

Lycopersicon esculentum: LOX1:Le:1 (tomLOXA, P38415, AAA53184), LOX1:Le:2 (tomLOXB, AAA53183), LOX1:Le:3 (tomLOX-tox, AAG21691), LOX2:Le:1 (tomLOXC, AAB65766), LOX2:Le:2 (tomLOXD, AAB65767).

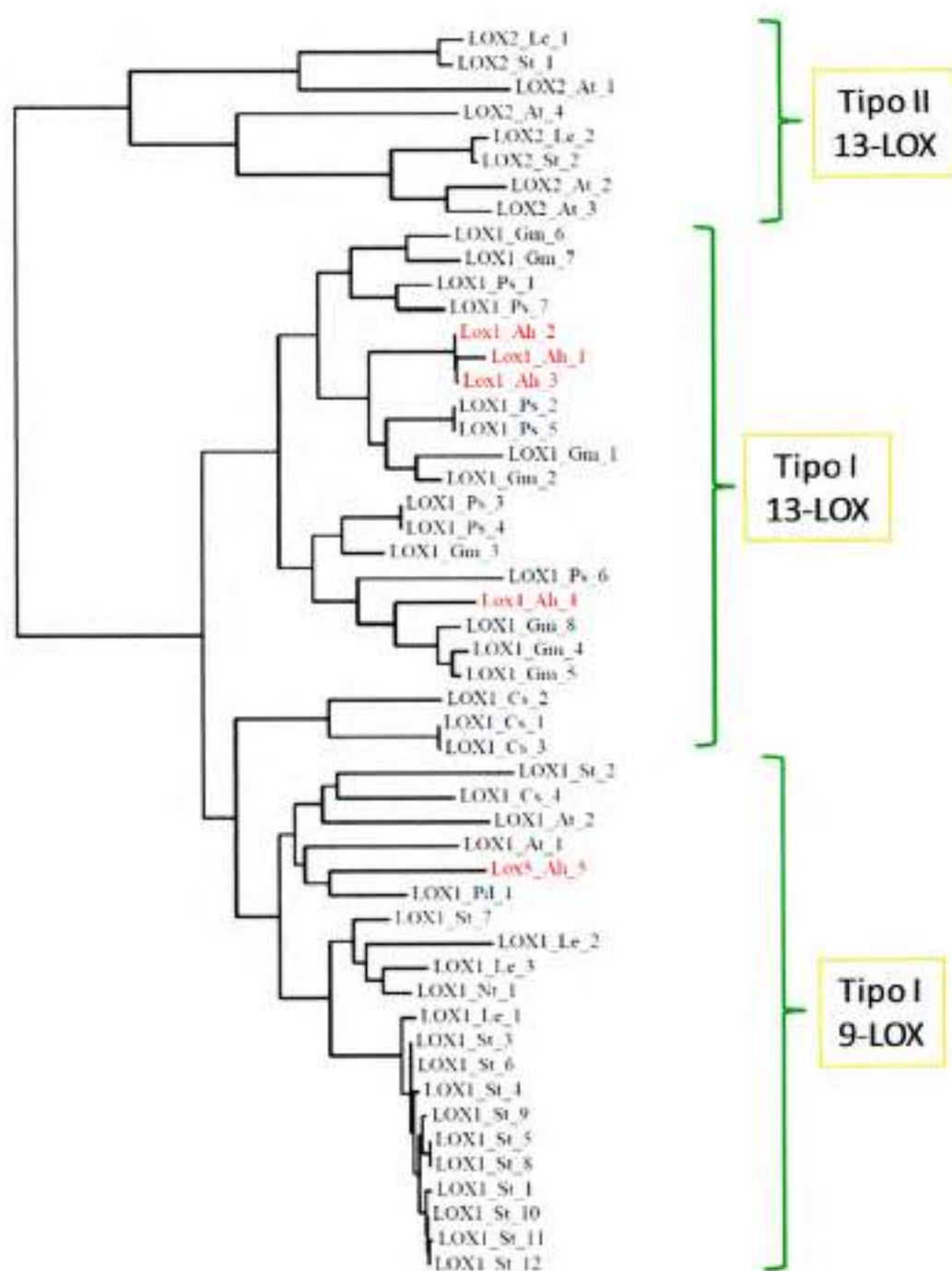
Nicotiana tabacum: LOX1:Nt:1 (NtLOX, CAA58859).

Pisum sativum: LOX1:Ps:1 (AAB71759), LOX1:Ps:2 (CAA55318), LOX1:Ps:3 (CAA55319), LOX1:Ps:4 (Pea LOX, CAA30666), LOX1:Ps:5 (Pea LOX2, CAA34906), LOX1:Ps:6 (Pea LOXG, CAA53730), LOX1:Ps:7 (CAC04380).

Prunus dulchis: LOX1:Pd:1 (CAB94852).

Solanum tuberosum: LOX1:St:1 (SOLTULOX1, CAA55724), LOX1:St:2 (STLOX, AAD09202), LOX1:St:3 (StLOX1, S73865 AAB31252), LOX1:St:4 (CAA64766), LOX1:St:5 (CAA64765), LOX1:St:6 (POTLX-2, AAB67860), LOX1:St:7 (POTLX-3, AAB67865), LOX1:St:8 (POTLX-1, AAB67858), LOX1:St:9 (AAD04258), LOX1:St:10 (pLOX2, AAB81595), LOX1:St:11 (pLOX1, AAB81594), LOX1:St:12 (CAB65460), LOX2:St:1 (StLOXH1, CAA65268), LOX2:St:2 (StLOXH3, CAA65269).

Figura III.11 Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de secuencias en el programa *PHYLIP*. Comparación de LOX 2, LOX 3, LOX 4 y LOX 5 con las secuencias de aminoácidos de diferentes LOX del reino vegetal.



3.7.3. Análisis de expresión génica

Para determinar los patrones de expresión génica durante la infección con *Aspergillus spp.*, se cuantificó la expresión génica de los genes seleccionados como candidatos en la vía en estudio: LOX 2-3, LOX 4 y LOX 5 tanto en semillas infectadas como controles en el modelo de los dos cultivares (resistente Pi 337391 y susceptible Florman).

Los tiempos post inoculación elegidos para el análisis de expresión génica, se seleccionaron en función de la aparición de la respuesta bioquímica ante la infección fúngica, con lo cual el período máximo de estudio fue de 48 hs. post inoculación en ambos cultivares ensayados.

Luego de analizar los resultados obtenidos, el ADN producto de las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) de los diferentes genes estudiados, fue sometido al análisis de secuencias para confirmar la especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como fue descrito en la **Sección 1.9 del Capítulo II**.

En la **Figura III.12** es posible apreciar los diferentes patrones de expresión génica entre los cultivares. Así la expresión de LOX 2-3 en el cultivar susceptible Florman fue superior que en el resistente Pi 337394 en las primeras 10 hs. post inoculación. Sin embargo en los períodos de tiempo posteriores, la expresión en el Florman comenzó a decaer, mientras que en el Pi 337394 se presentó un marcado incremento (**Figura III.12 A y B**). La expresión de la LOX 2-3 en las semillas infectadas de Florman respecto a los controles, se encuentra aumentada en las primeras horas alcanzando un máximo significativo a las 10 hs., esto es seguido de una expresión significativamente disminuida a las 20 hs. post inoculación y luego un suave aumento a las 48 hs. Al igual que Florman, el cultivar resistente presentó en las semillas infectadas un incremento de la expresión hasta las 10 hs. post inoculación respecto a la expresión de las semillas control pero una marcada disminución en los tiempos posteriores.

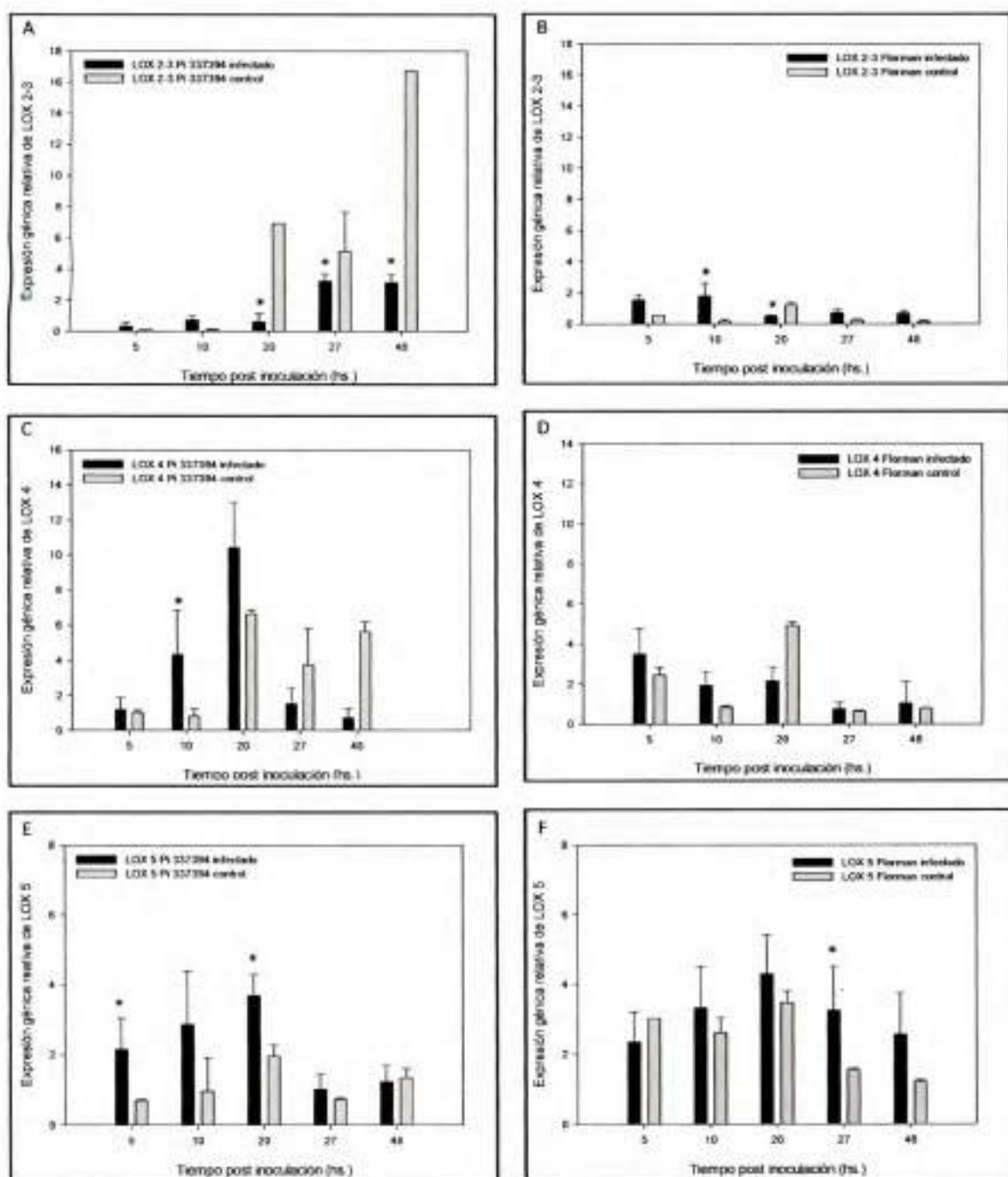


Figura III.12 Análisis de expresión génica relativa al gen de referencia *H3*. A y B: gen LOX 2-3 cultivar Pi 337394 y Florman; C y D: gen LOX 4 cultivar Pi 337394 y Florman; E y F: gen LOX 5 cultivar Pi 337394 y Florman respectivamente. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0,05$.

El análisis de expresión de LOX 4 presentó un patrón de expresión similar a los genes de LOX 2-3 en semillas infectadas y de control de la variedad Florman INTA (Figura III.12 D). Sin embargo, el patrón LOX 4 en Pi 337394 fue un poco diferente de la de LOX 2-3; ya que se incrementó fuertemente a las 10 y 20 hs. post inoculación (Figura III.12 C).

La LOX 5 (Figura III.12 E y F) presentó un patrón de expresión diferente con respecto a los otros genes estudiados. En el cultivar Florman su expresión en las semillas infectadas no se diferenció con los controles hasta las 20 hs. post inoculación pero se incrementó significativamente en los tiempos posteriores (Figura III.12 F). En el cultivar Pi 337394 las diferencias de las semillas infectadas respecto los controles se presentaron con un incremento significativo entre las 5 hs. y 20 hs., sin mostrar variación en tiempos posteriores (Figura III.12 E).

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En un estudio previo se evaluó la susceptibilidad a la contaminación por aflatoxinas en semillas de tres variedades con conocida susceptibilidad a la infección de *Aspergillus spp.*: Pi337394, Pi337409 y J11 (Kisyombe, 1985; Mehan, 1981; Mixon, 1973), junto con un grupo de cultivares desarrollados localmente (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina: Florman, Manfredi 68 y Colorado irradiado) (Asis *et al.*, 2005).

En dicho estudio se realizaron ensayos de infección de semilla utilizando 21 cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* obtenidos de la zona de producción de maní argentino. Se concluyó que Pi337394 presentó la mayor resistencia a la contaminación por aflatoxinas y que ésta se vincula con una resistencia a la infección fúngica, específicamente en el tegumento de las semillas y en los cotiledones.

Por el contrario, el cultivar Florman presentó la mayor susceptibilidad a la infección y una alta susceptibilidad a la contaminación por aflatoxinas. En el presente estudio, las

semillas sin tegumentos de estos dos cultivares también mostraron este comportamiento. Mediante el uso de estos dos cultivares como modelo, en este estudio se procedió a investigar cómo se regula la vía de la lipoxigenasa durante la infección por *Aspergillus spp.* utilizando análisis bioquímicos y moleculares. De esta manera, se evaluó la actividad enzimática de LOX en las semillas infectadas y los controles, encontrándose una respuesta temprana (durante las primeras 20 hs.) a la infección con el hongo (Figura III.3). Notablemente, a las 20 hs. el cultivar resistente presentó la actividad más alta en respuesta a la infección mientras que el cultivar susceptible mostró una respuesta opuesta al mismo tiempo. En un estudio similar, Burow y colaboradores (2000) encontraron una fuerte regulación negativa o represiva de la actividad LOX después de 48 hs. de infección por *Aspergillus parasiticus* en las semillas de un cultivar susceptible de maní (Florunner). Este patrón de actividad de LOX reportado por estos autores se asemeja a la actividad mostrada por la variedad susceptible de nuestro sistema de modelo (Florman).

Paralelamente se evaluó el contenido de ácidos grasos libres como una estimación de la actividad de la lipasa en las semillas (Figura III.7). Se ha descrito que las fosfolipasas son activadas por estrés biótico y abiótico, y que podrían actuar como factores desencadenantes de la vía de la lipoxigenasa.

La liberación de ácidos grasos insaturados (principalmente linoléico y linolénico) a partir de la membrana plasmática son susceptibles a la acción de la LOX en el citoplasma y los plastidios (Upchurch y Ramirez, 2010). Los resultados muestran que el contenido de ácidos grasos libres varía entre las 10 y las 27 hs. post inoculación en respuesta a la infección y con un patrón invertido entre los cultivares. Después de estos tiempos, los cambios en el contenido de ácidos grasos libres podrían ser atribuibles a la actividad de lipasas fúngicas sobre la semilla. Si bien la actividad de las lipasas no ha sido cuantificada directamente, es posible sugerir que las mismas responden diferencialmente en los cultivares en función del estímulo de infección.

A su vez, la determinación de acidez no diferencia la composición de ácidos grasos presentes, la cual se modifica en situaciones de estrés biótico y/o abiótico. Estos cambios

dependen principalmente de la acción de las fosfolipasas y de las desaturasas (Upchurch y Ramirez, 2010; Shah, 2005). En vista de los resultados hasta aquí obtenidos, sería necesario un estudio más profundo de la composición de ácidos grasos y de las lipasas en ambos cultivares, a los fines de obtener una mayor interpretación de dicha porción de la vía de la LOX.

Además de estudiar la disponibilidad de sustrato de la LOX, se analizó el producto de LOX formado en las semillas de ambos cultivares durante la infección por *Aspergillus parasiticus*. En primer lugar, se midió el contenido total de hidroperóxidos (**Figura III.8**). Al igual que en el análisis de la acidez, se encontraron cambios significativos en la producción de hidroperóxidos de entre 10 y 27 hs. post inoculación en ambos cultivares en respuesta a la infección.

De acuerdo a la regio especificidad de la enzima LOX, se produce mayoritariamente 9 o 13 hidroperóxidos (HPODE). Para analizar dicha especificidad enzimática se analizó la composición de HPODE producidos en las semillas de ambos cultivares. La regio especificidad se estimó mediante la reacción de ácido linoléico con extractos de enzimas de diferentes tiempos de infección (**Figura III.6**). Mediante este estudio se observó en las semillas infectadas del cultivar resistente un cambio importante y significativo a las 10 hs. post infección respecto al control en donde la composición HPODE presentó un aumento en la proporción de 9-HPODE del 83% en respuesta a la infección (**Figura III.6 A**). En ese mismo tiempo también se encontró un aumento en la proporción de 13-HPODE (59%) respecto al control en las semillas infectadas del cultivar susceptible Florman (**Figura III.6 B**). Estos resultados muestran un tipo de actividad predominante del tipo 9-LOX en el cultivar resistente y un tipo de actividad de 13-LOX en el cultivar susceptible. A las 20 hs. post infección se observó un aumento en la proporción de 13-HPODE (53 %) en Pi 337394 el cual se redujo gradualmente después de las 48 hs. (36%). Mientras que el cultivar Florman presentó una reducción de la proporción de 13-HPODE después de las 20 hs. (46%) y se mantuvo en esa proporción hasta las 72 hs post inoculación.

Tanto los ácidos grasos poli insaturados (linoléico y linolénico), así como 9 y 13 HPODE son moléculas de señalización que tienen efectos significativos sobre la defensa de la planta y en el proceso de diferenciación de los hongos (Christensen *et al.*, 2011). Calvo y colaboradores (1999) informaron de que los ácidos grasos de cadenas de 18 átomos de carbono, junto con 9-HPODE promueven la esporulación en *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nidulans*; y también estimulan la formación de aflatoxinas cuando son aplicados a medios de cultivos. Por el contrario, el 13-HPODE inhibió la síntesis de la toxina (Burow *et al.*, 1997). Otro estudio mostró que la enzima 9-LOX de maíz (ZmLOX 3) introducida genéticamente en mutantes de *Aspergillus nidulans* deficientes de DppoAC y por ende deficientes en la esporulación, fueron capaces de restaurar la producción de conidios (Brodhagen *et al.*, 2008). En base a esta evidencia genética, estos autores proponen una inter señalización recíproca de oxilipinas en el sistema *Aspergillus spp.*-semilla.

Sin embargo, un estudio posterior demostró en ensayos de infección *in vitro* y en condiciones de campo que una mutante de maíz con deficiencias en la expresión del gen ZmLOX 3 resultó ser más susceptible a la infección de *Aspergillus spp.* y obtuvo niveles significativamente más altos de contaminación por aflatoxinas que las líneas salvajes (Gao *et al.*, 2009). Los resultados de este último trabajo sustentan nuestros resultados, donde una respuesta a la infección por *Aspergillus parasiticus* del tipo 9-LOX está asociada a la variedad resistente. Todos estos resultados apoyan el supuesto que las oxilipinas de las plantas están implicadas en cierta medida en la interacción planta-hongos. Sin embargo, los efectos observados en *Aspergillus spp.* por la aplicación exógena de oxilipinas a medios de cultivos no son tan directos como los que ocurren en la semilla.

En un intento de dilucidar el control transcripcional de la actividad de LOX, analizamos la expresión de los genes de LOX 2-3, 4 y 5. LOX 2-3 corresponde a dos alelos del gen de LOX casi idénticos (LOX 2 y LOX 3) altamente expresado en semillas maduras (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). Los otros dos genes (LOX 4 y LOX 5) corresponden a dos

unigenes de maní depositados en *GenBank*. Los genes LOX 2 y 3 codifican enzimas tipo 13 LOXs con un regio especificidad que produce una proporción de 84% de 13-HPODE y de 16% de 9-HPODE cuando reacciona sobre el ácido linoléico (Tsitsigiannis *et al.*, 2005).

Por otra parte LOX 4 codifica una enzima tipo 13 que está más próxima en homología estructural a las LOXs de *Glycine max* (GM): GM LOX 4 (BAA03101), GM LOX 5 (AAB67732) y GM LOX 8 (AAC49159) que a las LOXs 2 y 3 de maní (**Figura III.11**). Estas LOXs de soja han demostrado una alta afinidad para reaccionar con los ácidos linoléico y linolénico libres, pero no a sus formas esterificadas y producen una relación de 60:40% de 13 y 9-HPODE cuando reaccionan con el ácido linoléico (Fuller *et al.*, 2001). Las LOXs de *Glycine max* se asocian con el tejido vegetativo y reproductivo (Fischer *et al.*, 1999) pero también se ha demostrado que participan en el desarrollo de nódulos y la defensa de la vaina (Hayashi *et al.*, 2008; Dubbs *et al.*, 2000).

La LOX 5 codifica un tipo de enzima 9-LOX cuya estructura está estrechamente relacionada con la LOX 1 de *Prunus dulcis* (CAB94852) y la LOX 1 de *Arabidopsis thaliana* (AAA32827), dos proteínas descritas como productoras exclusivamente 9-HPODE (Bannenberg *et al.*, 2009; Mita *et al.*, 2001) y ampliamente asociadas a la defensa de plantas.

El análisis de la expresión de genes de LOX de maní presentó un patrón de expresión diferente en respuesta la infección de *Aspergillus parasiticus* cuando se compararon ambos cultivares. Los genes de ambas LOX tipos 13 (LOX 2-3 y LOX 4) mostraron un patrón de respuesta similar en cada cultivar (**Figura III.12**) diferenciándose únicamente en la respuesta del cultivar resistente a las 20 hs. En un estudio anterior, se observó también en la semilla de maní una fuerte represión de la expresión de LOX de 2-3 después de la infección por *Aspergillus flavus* (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). Estos mismos autores informaron en otro trabajo que una mutante de *Aspergillus nidulans*, con una reducida actividad de dioxigenasas, presentó una capacidad mayor que la cepa no mutada de disminuir la expresión de los genes de maní LOX 2-3 durante la infección, lo cual sugiere

una estrecha comunicación entre los hongos y las semillas a través de actividades dioxigenasas (Brodhagen *et al.*, 2008). Sin embargo en otro trabajo se informó que esta mutante demostró una reducida capacidad de colonizar semillas de maní respecto a la cepa salvaje (Tsitsigiannis *et al.*, 2006). Todos estos resultados sugieren que se requiere de la represión de los genes LOX 2 y LOX 3 para disminuir la colonización fúngica de la semilla de maní. Nuestros resultados apoyan esta hipótesis debido a que el cultivar resistente manifestó una drástica represión de LOX 2-3 después de 10 hs. post inoculación, mientras que el susceptible exhibió una represión suave seguido de una regulación en aumento (Figura III.12 A y B).

Por otro lado, otros estudios apoyan la hipótesis de una asociación positiva entre la actividad de LOX de tipo 9 y la colonización fúngica de las semillas. Esta hipótesis está basada en: a) una asociación de la inducción de un gen LOX 1 de maní (que codifica una LOX con una producción mixta de 9 y 13-HPODE y que fue clasificada como probable tipo 9) y la infección de *Aspergillus spp.* (Burow *et al.*, 2000); y b) a los efectos de los productos de la 9-LOX sobre los procesos de diferenciación de *Aspergillus spp.* cuando son suplementados en cultivos líquidos y que contribuirían a promover la colonización de las semillas (Burow *et al.*, 1997; Calvo *et al.*, 1999). Sin embargo, nuestros resultados muestran una respuesta temprana de la expresión del gen LOX 5 (tipo 9-LOX) a la infección de *Aspergillus spp.* en el cultivar resistente Pi337394 y una respuesta más tardía en el susceptible Florman (Figura III.12 E y F), que es de alguna manera contradictoria con la hipótesis anterior. Los resultados presentados en este estudio, indican una acción diferencial en la Vía de Defensa de LOX en las semillas de ambos cultivares cuando son desafiadas contra *Aspergillus parasiticus*. Una adaptación a la resistencia a la infección fúngica parecería estar asociada con una producción coordinada de 9-HPODE y 13-HPODE, mediante la expresión de los genes de las LOX tipo 9 y 13.

A su vez, en el presente trabajo se presentan dos nuevas LOX de maní (LOX 4 y LOX5), cuyos niveles de expresión podrían explicar los cambios en la actividad de las

lipoxigenasas. En esta adaptación a la resistencia a la infección fúngica, se observó una producción temprana de 9-HPODE, mediada por una regulación de la co-expresión de la LOX 5 predominantemente sobre la LOX 2-3 y la LOX 4. En contraposición, una respuesta temprana de 13-LOX, mediada por la co-expresión de LOX 2-3 sobre la LOX 5 y LOX 4, estimularía la infección fúngica.

A la luz de los resultados presentados, se puede considerar que la resistencia a la infección de *Aspergillus spp.* en las semillas de maní está estrechamente relacionado con un rápido inicio de mecanismo de defensa. En un estudio preliminar hemos identificado compuestos anti fúngicos derivados de la vía de lipoxigenasa (oxilipinas) producidos por el cultivar resistente en respuesta a la infección por *Aspergillus parasiticus* (Asis et al., 2005). La caracterización de la producción de estos compuestos anti fúngicos en ambos cultivares, junto con el estudio de las otras ramas metabólicas posteriores a la acción de LOX son necesarias para entender completamente cómo la vía de LOX está relacionada con la resistencia de las semillas de maní a la infección de *Aspergillus spp.* y la contaminación por aflatoxinas .

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

IV- CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las proteasas son enzimas necesarias en la fisiología de herbívoros, hongos y plantas. En los herbívoros y hongos son indispensables ya sea para la digestión de alimentos como en la interacción patógeno-huésped, donde juegan un rol fundamental para romper las primeras barreras físicas de defensa (Hildman, 1992). En las plantas, en cambio su actuación se relaciona a los diferentes estadios de desarrollo; durante la germinación, son ellas las responsables de la degradación para la posterior utilización de las proteínas de reserva, generando el aporte de nitrógeno necesario durante la biosíntesis de nuevos tejidos.

Las semillas de maní al ser frutos hipógeos se encuentran en contacto directo con las poblaciones fúngicas del suelo, de manera que el estudio de las causas que favorecen la colonización y contaminación con micotoxinas es una de las grandes metas para obtener cultivares resistentes. Limitar el acceso del hongo en las semillas depende de la capacidad para restringir la habilidad del mismo para atravesar la barrera externa y explotar los nutrientes provenientes de las semillas.

Se ha planteado que la producción de proteasas por *Aspergillus parasiticus* se encuentra relacionada a la infección y contaminación con aflatoxinas en las semillas de maní, situación que genera daño en los tejidos, afecta la viabilidad de las semillas, altera la germinación y que facilita el acceso del hongo a través del tegumento (Asis *et al.*, 2009). Aparentemente la utilización de enzimas como herramienta para degradar las barreras físicas por varios hongos patogénicos se relaciona directamente con la producción de enzimas proteolíticas (Vernekar, 1999, Chen *et al.*, 2009).

La tipología de las proteasas extracelulares fúngicas ha sido revelada, indicando la presencia de serino y metalo proteasas en semillas de maní durante la infección con *Aspergillus* (Asis *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta el rol de las proteasas en la colonización

e infección, los inhibidores de proteasas serían piezas importantes en la defensa contra *Aspergillus* productores de aflatoxinas.

La detección e identificación de inhibidores de proteasas en semillas y tubérculos ha sido extensamente descrita (Chen *et al.*, 1999; Koiwa *et al.*, 1997; Vernekar, 1999). Se ha postulado una función como proteínas de reserva, dado que durante la maduración se encuentran acumuladas en semillas y tubérculos; se ha determinado que regulan la actividad de proteasas endógenas, al facilitar el almacenamiento de proteínas en la maduración (Ryan, 1973).

Los inhibidores de proteasas han sido clasificados de acuerdo a la tipología de proteasas que son capaces de inhibir, en cuatro tipos: las serino, cisteíno, aspártico y metalo proteasas. En el caso de los inhibidores tipo serino y cisteíno proteasas se acumulan durante la maduración de las semillas, la formación de los tubérculos, atenuando la actividad desmedida de las proteasas durante dicho estadio (Koiwa *et al.*, 1997). Además de las funciones en la maduración de las semillas, los inhibidores actúan en la defensa contra patógenos (Kouzuma *et al.*, 2000).

Los inhibidores de proteasas son elementos importantes en la respuesta de defensa hacia la predación de los insectos en plantas, incluso ante el ataque de nemátodos (Kouzuma *et al.*, 2000). La producción de los inhibidores se encuentra regulada por una vía de señalamiento transduccional que es iniciada por la predación y traducido como una respuesta al daño (Koiwa *et al.*, 1997). Existen inductores locales y sistémicos de tipo extracelulares de esta vía de señalamiento relacionados a la injuria. Varias evidencias sostienen que la producción de los inhibidores ocurre mediante la vía de los octadecadienoicos (Vía de la LOX), la cual cataliza la transformación del ácido linolénico y la formación del ácido jasmónico para inducir la expresión génica de los inhibidores de proteasas (Koiwa *et al.*, 1997), **(Sección 1 del Capítulo III)**.

Otra actividad que se les ha atribuido a algunas clases de inhibidores de proteasas y que los relaciona con la defensa de plantas es la actividad anti fúngica. Un ejemplo de ello son los inhibidores cisteíno-proteasas aislados de semillas de girasol, mijo, tabaco y que

han mostrado ser activos anti fúngicos contra *Fusarium* y *Trichoderma* (Kouzuma *et al.*, 2000; Joshi *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000). Varios estudios en maíz han permitido establecer la actividad anti fúngica *in vitro* de los inhibidores de proteasas (Roberts, 1990), con actividades inhibitorias de tripsina y amilasa que alteran el crecimiento hifal (Chen *et al.*, 1998 y 1999). La resistencia en maíz a la contaminación con aflatoxinas se encuentra asociada directamente a la presencia de inhibidores de proteasas de las semillas (Tubajika y Damman, 2001; Chen *et al.*, 2007).

En semillas de maní, han sido aislados e identificados 5 inhibidores de proteasas tipo *Bowman-Birk* (AI, AII, BI, BII y BIII), capaces de inhibir tripsina y quimotripsina, cuyos pesos moleculares oscilan entre 5,3 y 7,2 kDa (Norioka e Ikenama, 1982). Los estudios de secuencias de aminoácidos demostraron que los 4 inhibidores de proteasas (AI, AII, BI, BIII) de maní presentaban una secuencia idéntica de aminoácidos que difieren solo en los aminoácidos del extremo amino terminal y que se diferencian notoriamente de otros de la familia de leguminosas (Norioka, 1983).

Durante la infección con *Aspergillus parasiticus* se ha observado un incremento de la expresión génica de posibles inhibidores de proteasas en semillas de maní (Luo *et al.*, 2005), lo cual nos indica la participación activa de los inhibidores de proteasas en la defensa ante la infección. Estudios previos realizados en el grupo de trabajo demostraron que el cultivar resistente Pi337394 y el susceptible Florman producían una actividad inhibitoria de tripsina diferenciada frente a la infección de *Aspergillus parasiticus*. Esta actividad en el cultivar resistente estaba asociada principalmente a proteínas entre 5-20 kDa que se asociaban además a una actividad anti fúngica. (Tesis Doctoral Dr. Asis). Teniendo en cuenta estos antecedentes, sumado a la acción de las proteasas fúngicas sobre la germinación, viabilidad y quiebre o disminución de la resistencia a la infección en las semillas de maní (Asis *et al.*, 2009), se propone que las proteínas inhibitorias de proteasas tendrían un rol en la defensa y resistencia de la semilla de maní contra la infección de *Aspergillus spp.* productores de aflatoxinas.

En el presente trabajo se planteó la necesidad de profundizar el estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares de la Vía de Defensa de los Inhibidores de Proteasas (IP) en un modelo con dos cultivares, Pi 337394 y Florman, resistente y susceptible respectivamente a la infección con *Aspergillus spp.* y contaminación con aflatoxinas.

Para observar las diferencias en los cultivares a nivel bioquímico se utilizó electroforesis bidimensional con identificación posterior de las proteínas por *MALDI-Tof*, con los resultados obtenidos se profundizó el estudio de las diferencias a nivel génico. Para ello las proteínas diferenciales expresadas entre ambos cultivares, fueron seleccionadas para analizar su expresión génica.

2. OBJETIVOS

Como primer objetivo de este estudio se planteó identificar y caracterizar las proteínas con actividad inhibitoria de proteasas que se sintetizan como respuesta a la infección de *Aspergillus parasiticus* en la semilla de maní.

Como segundo objetivo se postuló estudiar su composición en un cultivar resistente y en uno susceptible.

Finalmente como último objetivo de la vía fue definido analizar la expresión de los genes de inhibidores de proteasas que participan en la defensa en el cultivar resistente y en el susceptible.

3. RESULTADOS

Para identificar y caracterizar las proteínas con actividad inhibitoria de proteasas que se producen en las semillas del cultivar resistente y susceptible durante la infección con *Aspergillus spp.*, se extrajeron los inhibidores de proteasas (IP) de harinas de semillas infectadas con *Aspergillus parasiticus* durante 48 hs. Posteriormente los IP fueron aislados

por precipitación con acetona y purificados por cromatografía de intercambio iónico continuando con una cromatografía de filtración molecular.

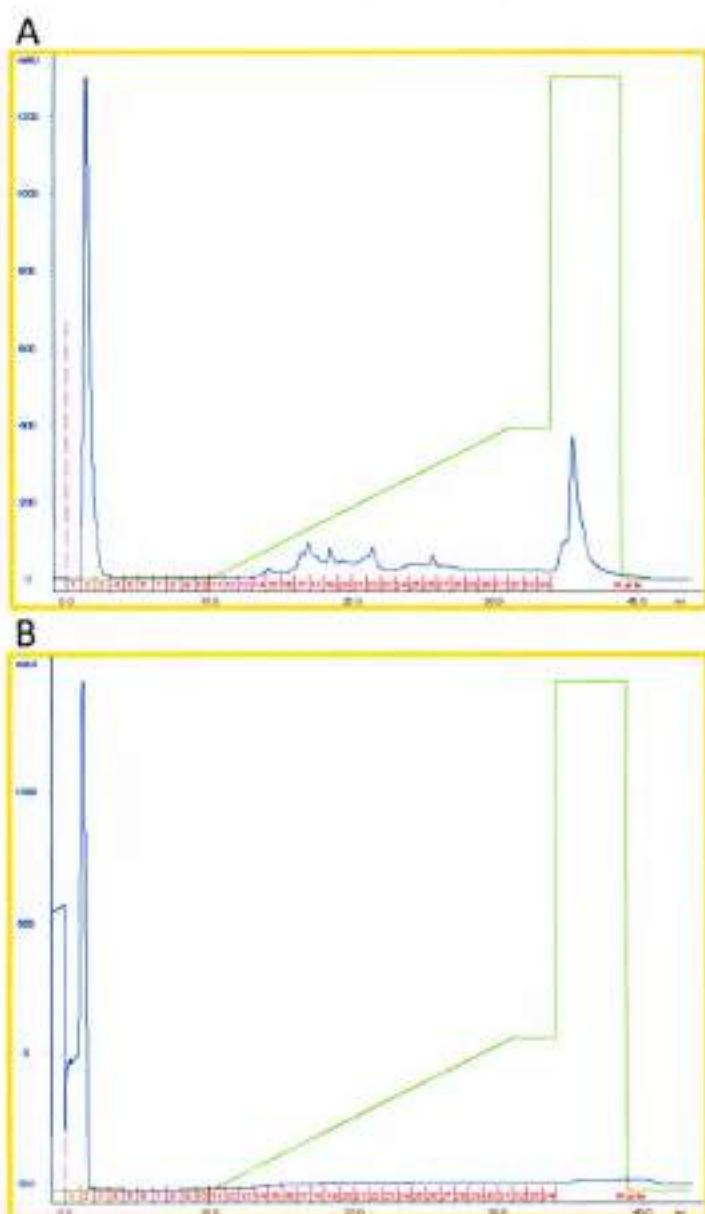
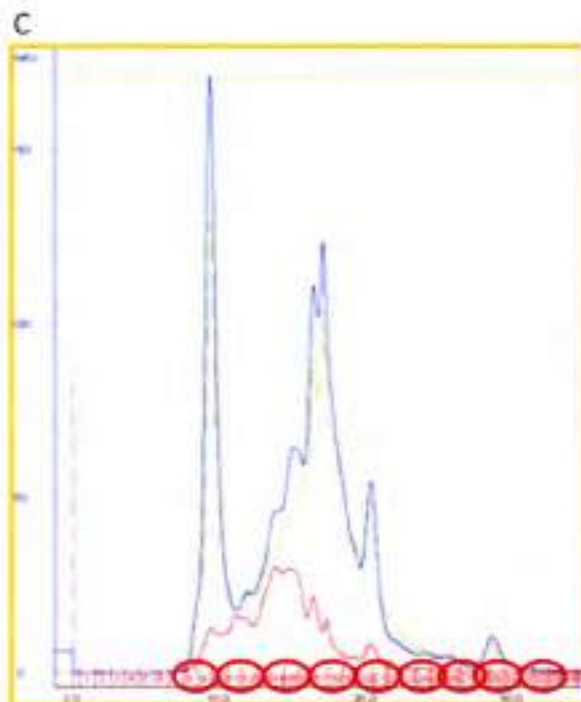


Figura IV.1: Cromatogramas de extractos de semillas inoculadas con *Aspergillus parasiticus*. A y B: Cromatograma de Intercambio Iónico del cultivar Pi 337394 y Florman respectivamente; C: Cromatograma de Filtración Molecular del cultivar Pi 337394 en rojo y del cultivar Florman en azul.



Referencias: los círculos rojos indican, las fracciones recolectadas de 3 tubos para ser analizadas como *pools*, los mismos fueron denominados fracción de intercambio o de filtración molecular con la numeración proporcionada por los cromatogramas correspondientes, lo cual fue coincidente con la aparición de los picos en los mismos.

En la **Figura IV.1** se observan los cromatogramas obtenidos de la separación por cromatografía de intercambio aniónico de los dos cultivares ensayados, en **A** se presenta el cultivar resistente Pi 337394 y en **B** el cultivar susceptible Florman.

El perfil cromatográfico muestra diferencias entre ambos cultivares y un pico correspondiente a proteínas que no se adhieren a la resina de intercambio aniónico, el cual fue recolectado y analizado por cromatografía de filtración molecular. Los resultados de este último análisis se presentan en la figura **C** para ambos cultivares, Pi 337394 en rojo y del cultivar Florman en azul. La totalidad de las fracciones de ambas cromatografías fueron colectadas para identificar la presencia de inhibidores de proteasas a través del análisis de la actividad inhibitoria de tripsina.

Debido a la elevada cantidad de tubos recolectados, fueron analizados *pools* de 3 tubos tomando 0,5 ml de cada uno. Estos *pools* fueron denominados fracción de intercambio o de filtración molecular con la numeración proporcionada por los cromatogramas correspondientes, lo cual fue coincidente con la aparición de los picos en los mismos.

En la **Figura IV.2** se presentan los resultados de la actividad inhibitoria de tripsina expresada como unidades inhibitorias de tripsina específica (TIU/mg proteína). Diferencias significativas de actividad inhibitoria entre ambos cultivares ensayados, fueron encontradas en las fracciones de Intercambio Aniónico (IA) 17,18,19 y de Filtración Molecular (FM) 14,15,16; 20,21,22 y 26,27,28. Cabe destacar que en todas las fracciones analizadas, el cultivar resistente exhibió mayor actividad inhibitoria específica con respecto al susceptible.

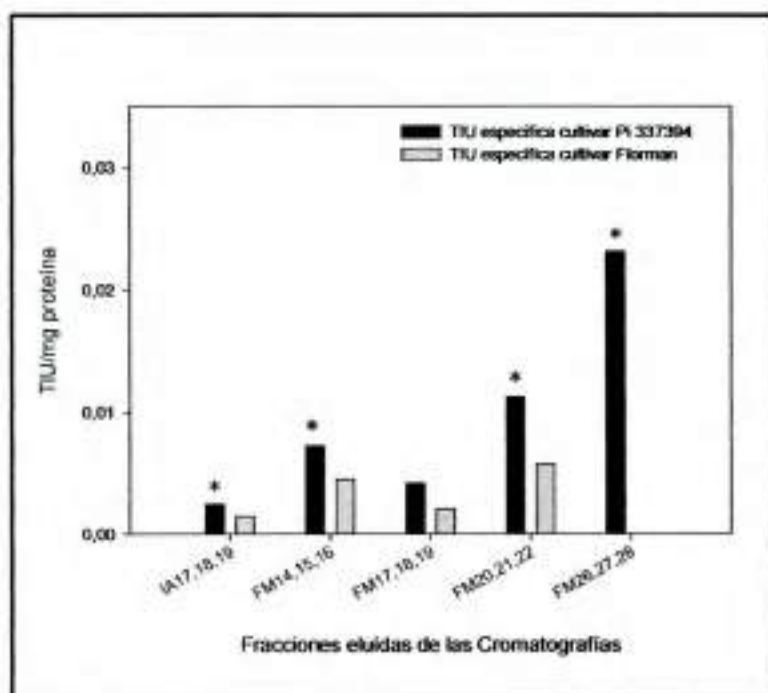


Figura IV.2: Actividad inhibitoria de tripsina expresada como unidades de inhibición de tripsina por mg de proteína, de las fracciones eluidas de las Cromatografías del cultivar Pi 337394 en color negro y del cultivar Florman en color gris.

La actividad inhibitoria de tripsina fue corroborada por zimografía reversa, así las fracciones de elución utilizadas para la medición anteriormente descrita, fueron separadas electroforéticamente e incubadas con la tripsina.

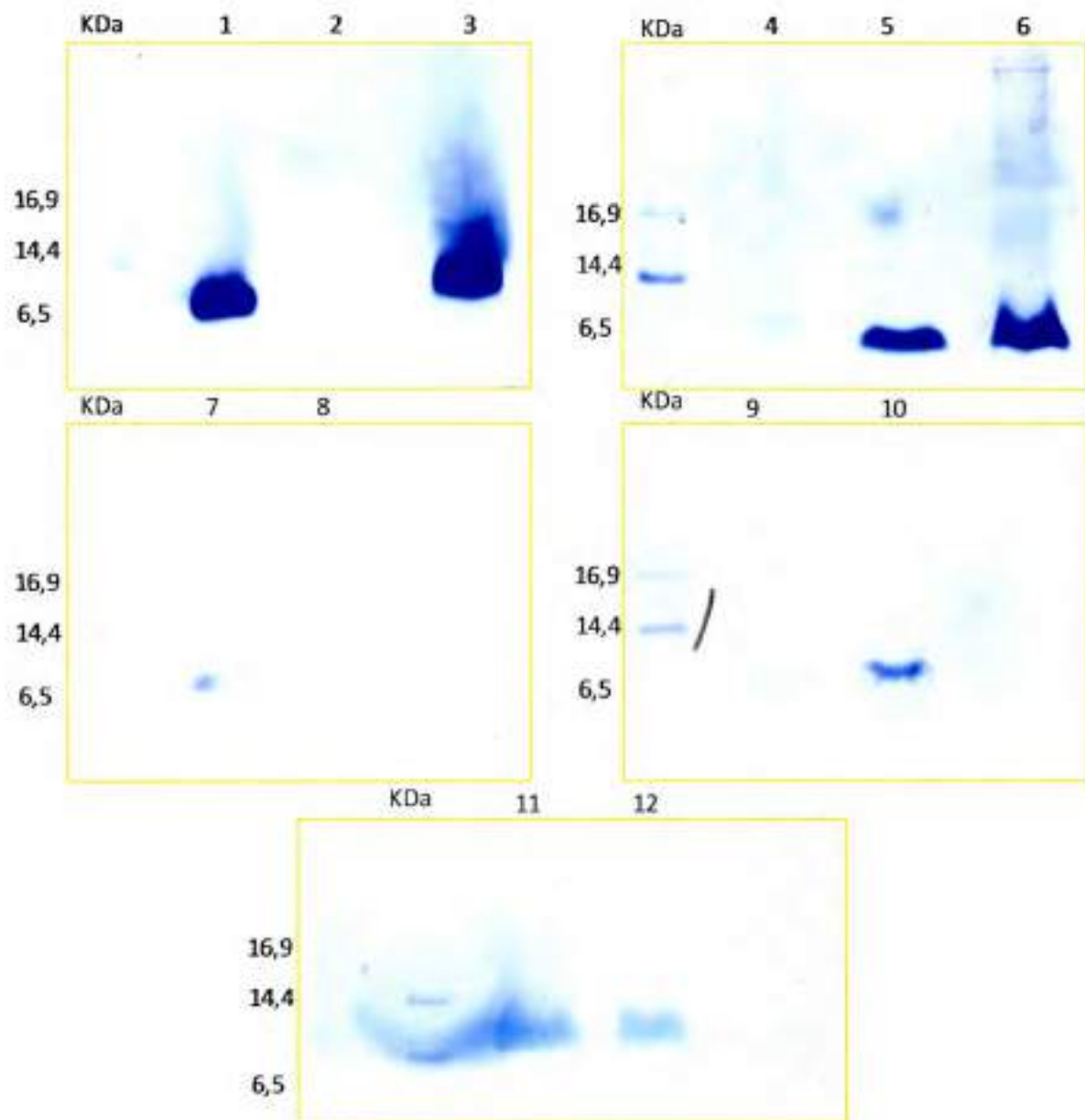


Figura IV.3: Zimografía reversa de las fracciones eluidas de las cromatografías de los cultivares Pi 337394 y Florman.

Referencias: Línea 1:Fracción de Intercambio Aniónico de Pi 337394 (Pi IA17,18,19); línea 2: Fracción de Intercambio Aniónico de Florman (FI IA 17,18,19); línea 3 Fracción de Intercambio Aniónico de Pi 337394 (Pi IA 20,21,22); línea 4 Fracción de Intercambio Aniónico de Florman (FI IA 20,21,22); línea 5:Fracción de Filtración Molecular de Pi 337394 (Pi FM 17,18,19); línea 6:Fracción de Filtración Molecular de Florman (FI FM 17,18,19); línea 7:Fracción de Filtración Molecular de Pi 337394 (Pi FM 20,21,22); línea 8:Fracción de Filtración Molecular de Florman (FI FM 26,27,28); línea 9:Fracción de Filtración Molecular de Pi 337394 (Pi FM 26,27,28); línea 10:Fracción de Filtración Molecular de Florman (FI FM 20,21,22); línea 11: Fracción de Filtración Molecular de Pi 337394 (Pi FM 14,15,16); línea 12:Fracción de Filtración Molecular de Florman (FI FM 14,15,16).

La interpretación de los geles resultantes (**Figura IV.3**) nos permite determinar el tamaño de las proteínas con actividad inhibitoria y establecer diferencias de actividades inhibición de tripsina de los eluatos de ambos cultivares. La actividad encontrada en las zimografías corresponde a proteínas con tamaños que oscilan entre 6,5 a 16,9 kDa.

La comparación entre las líneas 1 y 2, correspondientes a las fracciones de Intercambio Aniónico 17,18,19 del cultivar Pi 337394 y Florman respectivamente, donde se observa la migración de IP del cultivar resistente con un peso molecular (PM) de aproximadamente 14 kDa. Sin embargo, a diferencia del ensayo de inhibición de proteasas, en este ensayo no se detectó actividad de inhibidores de tripsina en el cultivar Florman.

En las líneas 3 y 4 se muestran los IP de las fracciones de Intercambio Aniónico 20,21,22 donde se puede observar en el cultivar resistente un IP con un PM de aproximadamente 15 kDa, sin detectarse actividad de inhibición de la tripsina en el cultivar susceptible.

En las líneas 5 y 6 fueron sembradas las fracciones de Filtración Molecular 17,18,19; donde se observan en ambos cultivares la migración de IP con un PM de aproximadamente 6 kDa con una actividad inhibitoria similar, lo cual es reflejado también en el gráfico de la **Figura IV.2**.

Las líneas 7 y 10 correspondiente a las fracciones de Filtración Molecular 20,21,22; presentan inhibidores de tripsina con un PM aproximado de 6 kDa y con una actividad mayor en el cultivar resistente.

Las líneas 8 y 9 correspondientes a las fracciones de Filtración Molecular 26,27,28; presentan IP con PM inferior a 6 kDa y que permiten verificar las diferencias significativas presentadas en la **Figura IV.2**, en donde el cultivar susceptible (línea 8) no presenta actividad inhibitoria.

Las líneas 11 y 12 de las fracciones de Filtración Molecular 14,15,16; presentaron inhibidores de tripsina con un PM de aproximadamente 6 KDa, que mostraron diferencias de actividad inhibitoria entre los cultivares con aumento de actividad en el resistente, observadas también en la **Figura IV.2**.

Con los resultados obtenidos hasta el momento, se seleccionaron las fracciones con mayor diferencias de actividad inhibitoria de tripsina entre los cultivares con el objeto de caracterizar e identificar las proteínas de estas fracciones.

De esta manera se seleccionaron de la cromatografía de intercambio iónico, las fracciones 17,18,19, la cual presentó diferencias significativas de actividad, corroborada por la zimografía entre ambos cultivares. Mientras que de la cromatografía de filtración molecular, se seleccionó la fracción 14,15,16; la cual también mostró diferencias significativas de actividad inhibitoria de tripsina, corroborada por el revelado de la zimografía.

Para caracterizar e identificar las proteínas de estas fracciones se empleó la electroforesis bidimensional y la identificación posterior de las proteínas diferenciales entre ambos cultivares por *MALDI-Tof*.

Para identificar las proteínas, se compararon las secuencias obtenidas contra la base de datos de *NCBI nr (Non redundat protein sequences)* y contra la base de *EST* de maní de *NCBI*. En la **Figura IV.4** se presentan los perfiles proteicos de la electroforesis bidimensional de la fracción de intercambio iónico seleccionada del cultivar Pi 337394 en **A** y del cultivar Florman en **B**.

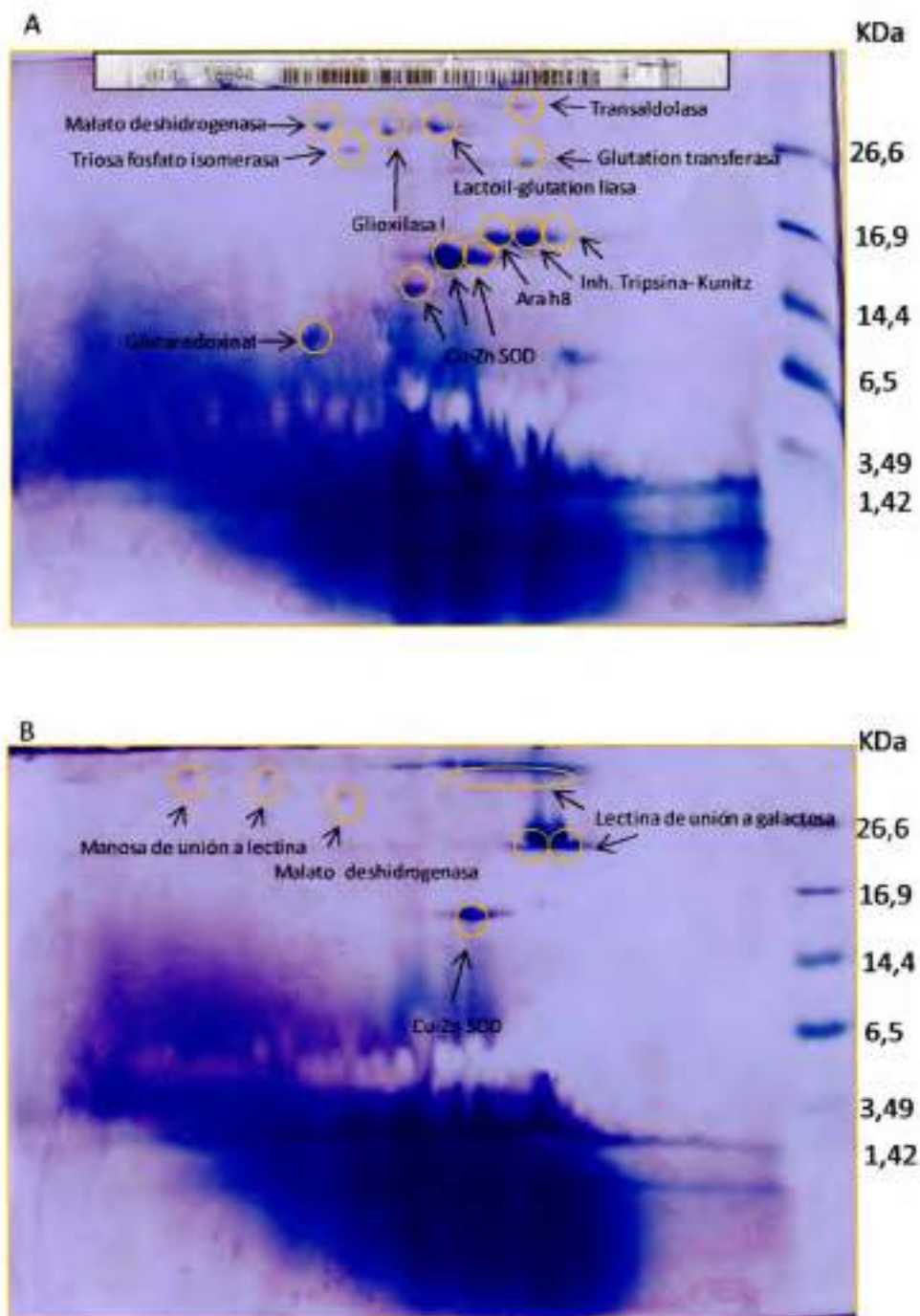


Figura IV.4: Perfil proteico de la electroforesis bidimensional de la fracción seleccionada de la cromatografía de intercambio aniónico 17,18,19 de A: cultivar Pi 337394; B: cultivar Florman.

La electroforesis bidimensional denota la existencia de un perfil proteico diferencial entre ambos cultivares, donde el resistente presenta mayor cantidad de proteínas (*spots*). Entre las proteínas identificadas en dicho cultivar se encuentran la malato deshidrogenasa, la triosa fosfato isómerasa, la transaldosa, la glutatión transferasa, la lactoil glutatión liasa, la glioxilasa, la glutaredoxina, la Cu-Zn super óxido dismutasa, el alérgeno Ara h8 y la presencia de inhibidores de tripsina clásicos tipo *Kunitz*. Mientras que en el cultivar susceptible, fueron identificadas la lectina de unión a manosa, la malato deshidrogenasa, la lectina de unión a galactosa y la Cu-Zn super óxido dismutasa y la ausencia de inhibidores de proteasas.

Si bien en las fracciones de la cromatografía de intercambio aniónico de ambos cultivares se encontró actividad inhibitoria de tripsina; en el análisis realizado por zimografía reversa, el cual es menos sensible que el de actividad inhibitoria de tripsina, sólo el cultivar resistente presentó actividad.

El estudio de electroforesis bidimensional indica que dicha actividad estaría fundamentada en la presencia del inhibidor de tripsina tipo *Kunitz*.

En la **Figura IV.5** se muestran las secuencias de aminoácidos coincidentes de los péptidos identificados de la electroforesis bidimensional de la purificación de intercambio aniónico asignados como inhibidores de *Kunitz* en color rojo.

El producto de esta secuencia de *EST* codifica una proteína con una estructura de inhibidor de *Kunitz*, que no ha sido descripta previamente.

El estudio de electroforesis bidimensional indica que dicha actividad estaría fundamentada en la presencia del inhibidor de tripsina tipo *Kunitz*.

La identificación de este compuesto fue asignada por su homología al producto que codifica una secuencia de *EST* de maní (**Tabla IV.1**).

Con la finalidad de caracterizar al inhibidor de *Kunitz* encontrado en la semilla de maní, se realizó un análisis filogenético con otros inhibidores de *Kunitz* de plantas (**Figura IV.6**).

A

1 NI_KKMKATT TTNVFAIFIL FAFISIHLP S LATAELVDTD GNLIK**NGGLY**
 51 **FILPVFR**GNG GGIGRISTGN ETCPLTVVQQ RSEVDNGSPI IISSPLRIPP
 101 LREGFPLDLS FSAVPECTPT PSKWTLVKGL LEGEGATVK**L TGFYENEIQG**
 151 **WFEIR**KTLD A FKLTF CASSN NNCMDIGVKR DDEGNRL LVA T

B

1 LAEPAXPRLV SPISXXTRGC RNSARGNI_K KMKATTTTNV FAIFILFAFI
 51 SIHLPSLATA ELVDTDGNLI **KNGGLYFILP VFR**GNGGGGIG RISTGNETCP
 101 LTVVQQRSEV DNGSPIISS PLRIPFLREG FPLDLSFSAV PFCTPTPSKW
 151 TLVKGLLEGE GATVK**L TGFY ENEIQGWFEI R**KTLD A EKLT FCASSNNNCM
 201 DIGVKRDDEG NRLLVATEDN PFVGYV_ESY VVLFCLKIHE _

Figura IV.5: Secuencia de aminoácidos coincidente de los péptidos identificados de la electroforesis bidimensional de la purificación de intercambio aniónico asignados como inhibidores de *Kunitz* en color rojo. En **A:** *spot* de la izquierda y en **B** *spot* de la derecha del gel de la **Figura IV.4 A**.

	A	B
Secuencia Identificada	EM_EST:ES761053	EM_EST:CD038242
Base de Datos	Plants_EST	Plants_EST
Score	164	61
Esperado	6,00E-09	26013
Masa Nominal (<i>Mr</i>)	20710	6,92
Calculado (<i>pI</i>)	6,78	1
Taxonomía	<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Arachis hypogaea</i>
Cobertura de la secuencia proteica	14%	11%

Tabla IV.1: Datos de la identificación de los *spots* de la electroforesis bidimensional de la purificación de intercambio aniónico asignados como inhibidores de *Kunitz*. En **A:** *spot* de la izquierda y en **B** *spot* de la derecha del gel de la **Figura IV.4 A**.

Para el análisis filogenético se utilizó el programa *PHYLP* (*Phylogeny Inference Package*, version 3.63), en el cual las secuencias aminoacídicas publicadas de diferentes especies del reino vegetal fueron introducidas junto con la estudiada en el presente trabajo. Las secuencias y nomenclatura fueron obtenidas de la base de datos *Merops* para la familia 13 de inhibidores de Kunitz de plantas (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=13>).

A continuación se presenta el listado de proteínas con nomenclatura de *Merops* utilizadas para la realización del árbol filogenético de inhibidores de Kunitz de plantas:

Arachis hypogaea: Kunitz *Arachis hypogaea* inhibitor; *Glycine max*: soybean Kunitz trypsin inhibitor (MER017895); *Solanum tuberosum*: cathepsin D inhibitor (MER017897); *Hordeum vulgare*: alpha-amylase/subtilisin inhibitor (MER017904); *Psophocarpus tetragonolobus*: winged-bean chymotrypsin inhibitor (MER017908); *Prosopis juliflora*: papain inhibitor (Prosopis-type) (MER017910); *Erythrina variegata*: chymotrypsin inhibitor ECI (MER017915); *Alocasia macrorrhizos*: alocasin (MER017919); *Bauhinia bauhinioides*: Bauhinia trypsin/plasma kallikrein inhibitor (MER017920); *Acacia confusa*: trypsin inhibitor (MER017924); *Ipomoea batatas*: sporamin (MER017936); *Solanum tuberosum*: potato Kunitz -type trypsin inhibitor (MER017939); *Bauhinia bauhinioides*: cruzipain inhibitor (MER019373); *Bauhinia variegata*: type trypsin inhibitor (MER019374); *Solanum tuberosum*: Kunitz cysteine peptidase inhibitor 1 (plant) (MER019605); *Erythrina variegata*: type trypsin/tissue plasminogen activator inhibitor (MER019771); *Arabidopsis thaliana*: AtDr4 g.p. (MER019772); *Leucaena leucocephala*: type trypsin inhibitor (Fabaceae) (MER019785); *Canavalia lineate*: Kunitz subtilisin inhibitor (Fabaceae-type) (MER019787); *Arabidopsis thaliana*: AtK11 (MER019793); *Papaya carica*: latex serine peptidase inhibitor (MER019871); *Populus tremuloides*: trypsin inhibitor PtTI (MER020172); *Enterolobium contortisiliquum*: trypsin inhibitor (MER027530); *Brassica oleracea*: crucifer cysteine peptidase inhibitor (MER029330); *Delonix regia*: Kunitz serine peptidase inhibitor (MER029598); *Bauhinia unguolata*: factor Xa inhibitor BuXI (MER038515); *Schizolobium parahyba*: chymotrypsin inhibitor (MER043825); *Medicago truncatulata*: inhibitor MtTi2

(MER054582); *Archidendron ellipticum*: inhibidor AeTI (MER071204); *Inga laurina*: ILTI trypsin inhibitor (MER163353); *Tamarindus indica*: tamarind Kunitz trypsin inhibitor (MER320461).

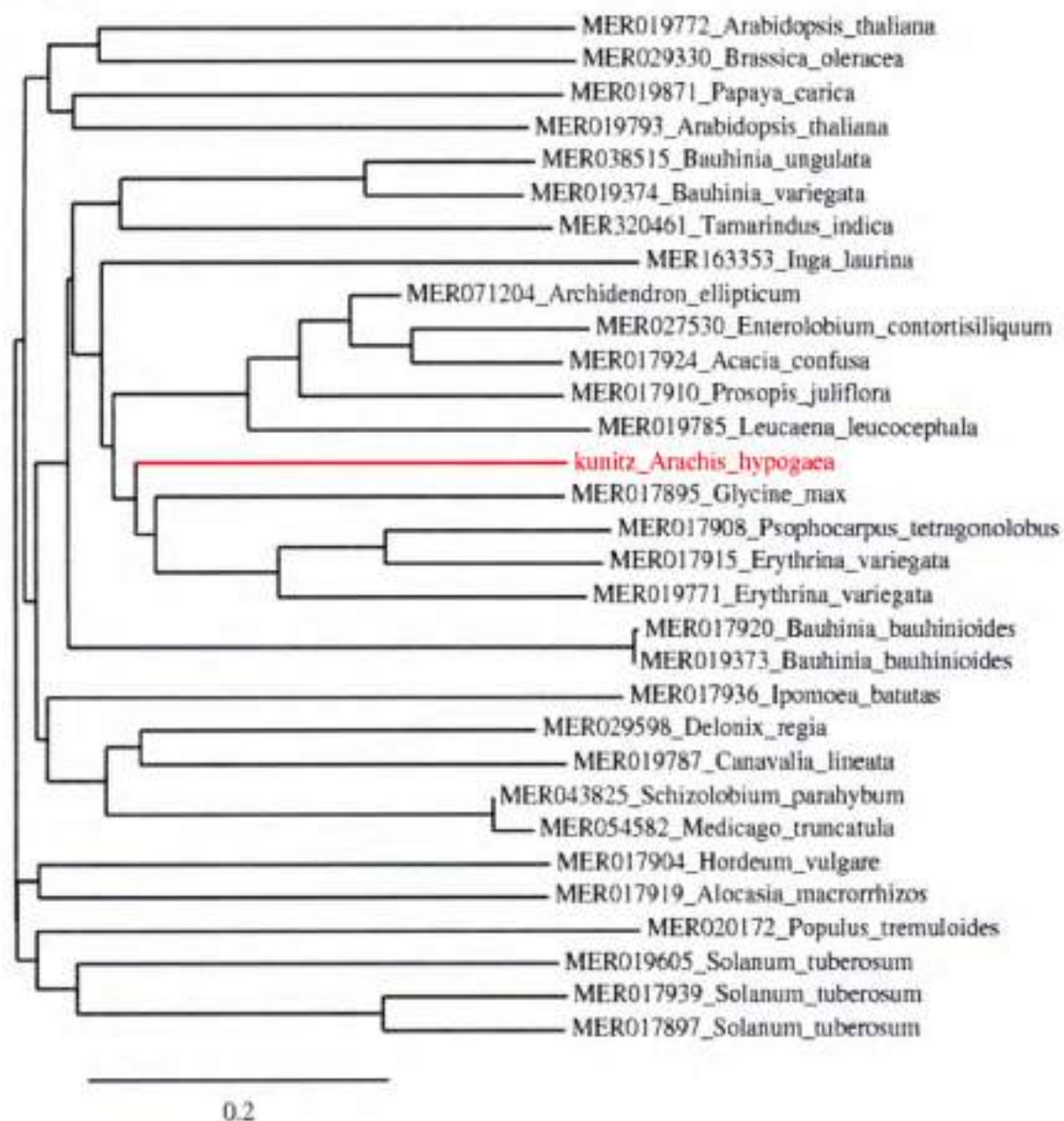


Figura IV.6: Árbol filogenético de inhibidores de Kunitz de leguminosas. Las secuencias y nomenclatura empleadas pertenecen a la base de datos Merops para la familia I3 de inhibidores de Kunitz de plantas.

Posteriormente la secuencia aminoacídica (AHYPKTI) del inhibidor de *Kunitz* encontrado en la semilla de maní fue sometida a un alineamiento con los inhibidores de proteasas de mayor homología (Figura IV.7). De esta manera se obtuvo que los rectángulos representan aminoácidos conservados característicos de inhibidores de *Kunitz*, a su vez los rectángulos rojos corresponden a residuos cisteína, el rectángulo amarillo corresponde al sitio reactivo y el rectángulo azul corresponde al aminoácido importante en la estabilización del *loop* de la región reactiva del inhibidor (Oliva *et al.*, 2010).

```

kunitz_Ara      mkattttntvfaifilfafisihlpslataeLVDtdGMLLNGGlyfilvfrgnGGIgr
MER017895      -----dfvldnEGMplfNGGTYVILsdItAfGGIra
MER019771      -----vLldgnGeVVNGGTYVILPqVWAqGGGvQl
MER017908      -----dddLVDaEGLLVNGGTYVILPhIWAHGGGIEt
MER017915      -----qpLVDLEGLLVNGGTYVILPhIWAIGGGIEa

kunitz_Ara      isTGNEFCPLTVVQqrSEVdNGePIiISSPIkapslrEGfsldL---sEavEfcptPa
MER017895      ApTGNEFCPLTVVQsrNEldkGigtIISPIrirlaEGhplslkfdasEAvimlvqift
MER019771      AKTGEEFCPLTVVQSPNEISNGkPIrleSrlrSefIPDdkVri---GFAYaPfcspSW
MER017908      AKTGNEFCPLTVVrSPNEVskGePIrISSqlEflFPrGslValE---GFANpPcAASpW
MER017915      ARTGkEEFCPLTVVQSPfEVSNGePIrIasqlEflFPrGspyaI---GFANpPcAASpW

kunitz_Ara      KWTlVkglllegEGatVKltgfyenEmggwFeirk----tldafKltfcassnn---Gnd
MER017895      EWsVVEdl--pEGpAVKiqEnKda-mDgwFr1ErVSDDefNnYKlvfcqqqaEdlGd
MER019771      -NTVLEde--cEGlsVKLsEdEstqfDypFKFEqVSD-klHsYKLLcGgkhE--GAs
MER017908      -NTVVds---pGpAVKLSqKlpEkdilvFKFEKVSshNiHvYKLLcQhDeEdvEdDq
MER017915      -NTVVEt---EGlAVKLIhKtpEedtkFKFEqKVSspnRrYvnlscQrEdkdlEdDq

kunitz_Ara      -IGvkrD-dvGnRlLVaTEDNPFvVMfkKatSsysA--
MER017895      -IGIsidhddGtRRLVVsknkPLVvqfcldkEsl---
MER019771      -IGInRD-qkGyRRLVVTEDNPLtVVLkKdeSs----
MER017908      YIGIhRD-rnGnRRLVVTEnPLlElVLLkakSEtaSsh
MER017915      YIGI rRD-akGyRRLVVTnDNPLeIvLVnAnSpSq--

```

Figura IV.7: Alineamiento de la secuencia AHYPKTI con los inhibidores de proteasas de mayor homología. Rectángulos representan aminoácidos conservados característicos de inhibidores de *Kunitz*. Rectángulo rojo: residuos cisteína. Rectángulo amarillo: sitio reactivo. Rectángulo azul: aminoácido importante en la estabilización del *loop* de la región reactiva del inhibidor.

El agrupamiento filogenético relacionó al inhibidor de maní con el inhibidor de Kunitz de soja (MER017895), con dos inhibidores de *Erythrina variegata* (MER017915 y MER019771) y con un inhibidor de *Psophocarpus tetragonolobus* (MER017908). Estos inhibidores pertenecen a especies de la familia de las fabáceas, que a su vez se agrupan con otro grupo de inhibidores también de la familia de fabáceas compuestos por los inhibidores de *Acacia confusa* (MER017924), *Archidendron ellipticum* (MER071204), *Enterolobium contortisiliquum* (MER027530), *Prosopis juliflora* (MER017910) y *Leucaena leucocephala* (MER019785).

El alineamiento de sus secuencias permitió evidenciar las regiones de identidad que existe entre cada una de ellas (Figura IV.7), donde es posible observar los residuos cisteína característicos de los inhibidores de Kunitz y el sitio activo del inhibidor conformado por un residuo lisina, leucina o arginina.

Con el propósito de determinar si los inhibidores de maní poseían la capacidad de inhibir el desarrollo fúngico, se evaluó la actividad anti fúngica sobre *Aspergillus parasiticus* de la fracción seleccionada de la cromatografía de intercambio aniónico. La visualización de la inhibición del crecimiento fúngico fue determinada en la fracción del cultivar resistente y del susceptible evaluando el desarrollo del micelio en un medio de cultivo líquido *Mueller Hinton* (habitualmente utilizado para el estudio de sustancias antimicrobianas) a 595 nm de absorvancia. Los resultados de este estudio evidenciaron una inhibición de las proteínas de la fracción del cultivar resistente superior a la del cultivar susceptible.

Debido a que esta fracción seleccionada de la cromatografía de intercambio aniónico está compuesta por varias proteínas que fueron identificadas en el análisis de electroforesis bidimensional, es difícil atribuir el comportamiento anti fúngico al inhibidor de Kunitz. Sin embargo, diversos estudios han propuesto a los inhibidores de Kunitz como compuestos que participan en la defensa de plantas (Alves *et al.*, 2009; Rufino *et al.*, 2013). Principalmente se los ha asociado a una actividad insecticida o anti alimentaria,

inhibiendo la acción de las proteínas digestivas (Gao *et al.*, 1998; Giri *et al.*, 2003; Telang *et al.*, 2009).

Otros trabajos han demostrado que estos compuestos también presentan la capacidad de inhibir el desarrollo de hongos patógenos de plantas. Un ejemplo es el inhibidor de Kunitz de soja que ha demostrado la capacidad de inhibir *Fusarium oxysporum* (Wang, 2006).

El inhibidor de Kunitz de *Acacia plumosa* con alta homología al inhibidor de Kunitz de *Acacia confusa* que presentó actividad anti fúngica contra *Aspergillus niger*, *Colletotrichum spp.* y *Fusarium moniliforme* (Lopes *et al.*, 2009) o bien el inhibidor de la fabácea *Psoralea corylifolia* que demostró una actividad anti fúngica contra *Alternari brassicae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia cereales* (Yang *et al.*, 2006).

En paralelo se realizó el análisis de la electroforesis bidimensional de la fracción seleccionada de la cromatografía de filtración molecular. Los geles obtenidos de la fracción de cada cultivar se presentan en la **Figura IV.8**.

En este caso, al comparar los perfiles proteicos encontrados, proteínas como la Cu-Zn super óxido dismutasa y la proteína relacionada a la patogénesis clase IV (PR4), se encontraron en ambos cultivares.

Sin embargo, en el cultivar Pi 337394, se identificaron además los inhibidores de tripsina clásicos tipo *Bowman-Birk* AI, AII, BI y BIII (**Tabla IV.2**), junto con el alérgeno Ara h8, ubiquitina y glutaredoxina. Mientras que en el cultivar Florman los inhibidores estuvieron presentes como los inhibidores de tripsina clásicos tipo *Bowman-Birk* BIII y AI.

A través del análisis de expresión génica, varias de estas proteínas han sido descritas, como producidas durante la infección por *Aspergillus parasiticus*, destacándose la super oxido dismutasa, la manosa de unión a lectina, proteínas relacionadas a patogénesis y el inhibidor de serino proteasas del tipo de *Bowman-Birk* (Luo *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2008).

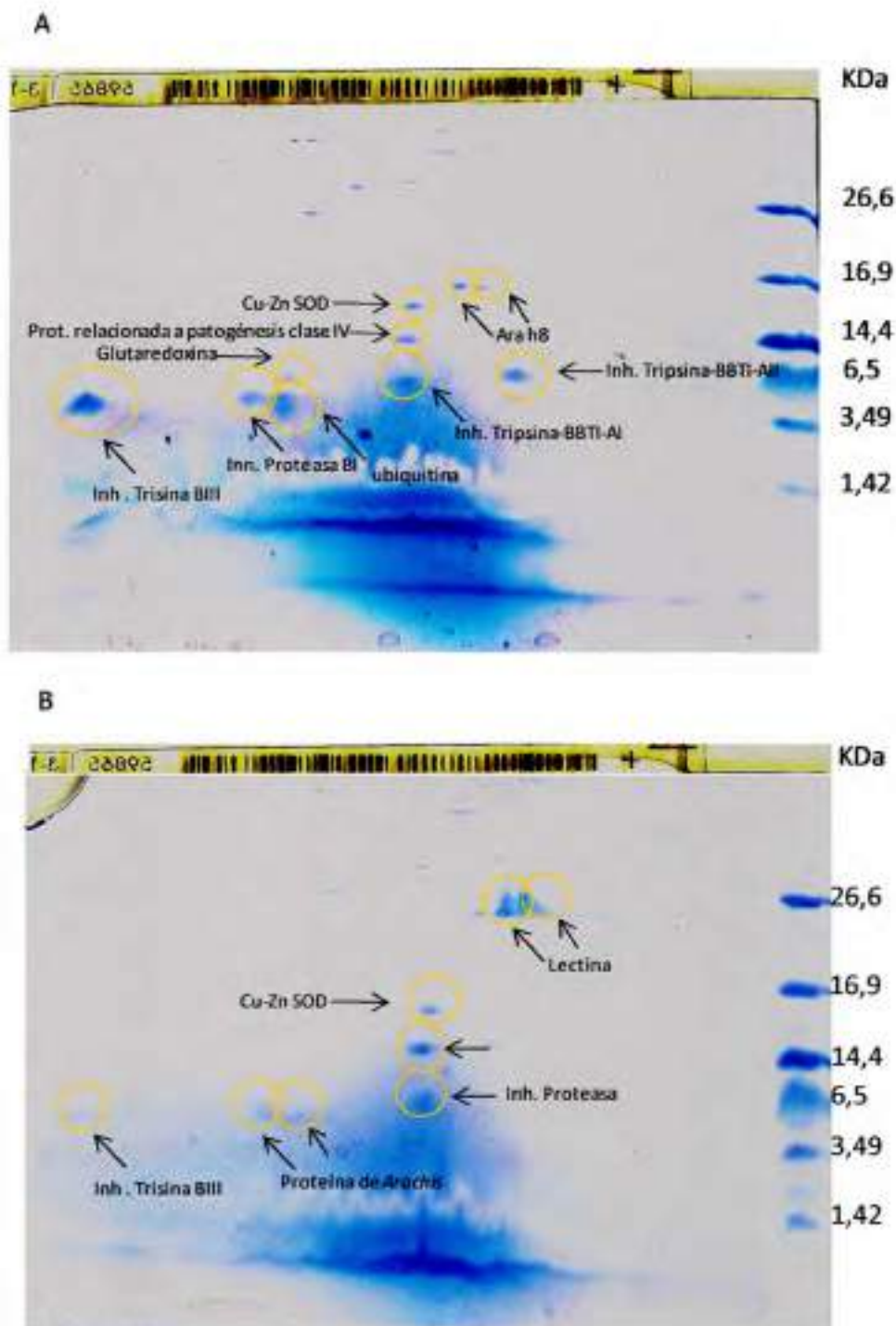


Figura IV.8: Perfil proteico de la electroforesis bidimensional de la fracción de la cromatografía por filtración molecular 14,15,16. A: cultivar Pi 337394; B: cultivar Florman.

A	
Secuencia Identificada	gi 351441 inhibitor A1,protease
Base de Datos	NCBI nr
Score	109
Esperado	1,80E-04
Masa Nominal (Mr)	7341
Calculado (pI)	5,56
Taxonomía	<i>Arachis hypogaea</i>
Cobertura de la secuencia proteica	100%
B	
Secuencia Identificada	gi 124020 Bowman-Birk type proteinase inhibitor A-II
Base de Datos	NCBI nr
Score	121
Esperado	1,10E-05
Masa Nominal (Mr)	7628
Calculado (pI)	5,08
Taxonomía	<i>Arachis hypogaea</i>
Cobertura de la secuencia proteica	100%
C	
Secuencia Identificada	gi 351443 inhibitor B1,protease
Base de Datos	NCBI nr
Score	106
Esperado	3,50E-04
Masa Nominal (Mr)	6965
Calculado (pI)	6,67
Taxonomía	<i>Arachis hypogaea</i>
Cobertura de la secuencia proteica	74%

Tabla IV.2: Datos de la identificación de los spots de la electroforesis bidimensional de la purificación de filtración molecular asignados como inhibidores de *Bowman-Birk*. En **A:** spot llamado *Inhibidor de tripsina BBTI A1*; en **B:** spot llamado *Inhibidor de tripsina BBTI AII* y en **C:** spot llamado *Inhibidor de proteasa B1*, todos del cultivar Pi 337394 del gel **A** de la **Figura IV.8**.

A

1 SSSDDNVCCN GCLCDRRAPP YFECVVDTF DHPASCNSC VCTRSNPPQC

51 RCTDKTQGRG PVTECRS

B

1 EASSSSDDNV CCNGCLCDRR APPYFECVCV DTFDHPASC NSCVCTRSNP

51 PQCRCCTDKTQ GRCPVTECRS

C

1 DNVCCNGCLC DRRAPPYFEC VCVDTFDHCP ASCNSCVCTR SNPPQCRCTD

51 KTQGRCPVTE CRS

Figura IV.9: Secuencia de aminoácidos coincidente de los péptidos identificados de la electroforesis bidimensional de la purificación de filtración molecular asignados como inhibidores de *Bowman-Birk* en color rojo. En **A**: spot llamado *Inhibidor de tripsina BBTI A1*; en **B**: spot llamado *Inhibidor de tripsina BBTI A11* y en **C**: spot llamado *Inhibidor de proteasa B1*, todos del cultivar Pi 337394 del gel **A** de la **Figura IV.8**.

De este análisis es posible destacar que el cultivar resistente presentó mayor concentración y cantidad de isoformas que el susceptible, las cuales serían responsables de la actividad inhibitoria de tripsina mayoritaria encontrada en dicha fracción, al compararlas con el cultivar susceptible.

Para caracterizar a estos inhibidores, se realizó un árbol filogenético comparando su secuencia con la de otros inhibidores de *Bowman-Birk* de plantas de la base de datos de *Merops* (<http://merops.sanger.ac.uk/>)(**Figura IV.10**). Este análisis muestra que el inhibidor de *Bowman-Birk* identificado en el presente estudio se encuentra relacionado con dos inhibidores de *Bowman* y *Birk* (MER018102 y MER018107 de *Arachis hypogaea*)

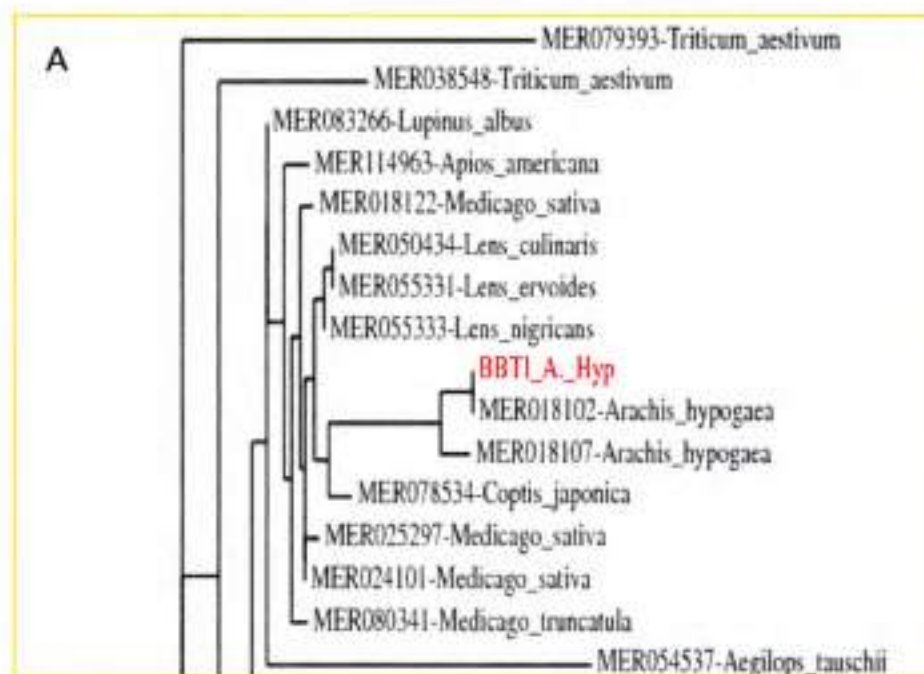
previamente reportados en la semilla de maní (Norioka 1982). A su vez, están relacionados también a inhibidores de Bowman y Birk del género *Medicago* (MER025297 y MER024101 de *Medicago sativa*, MER080341 de *Medicago truncatula*) y del género *Lens* (MER050434 de *Lens culinaris*, MER055331 de *Lens ervoides*, MER055333 de *Lens nigricans*) y al inhibidor de *Coptis japonica* (MER078534).

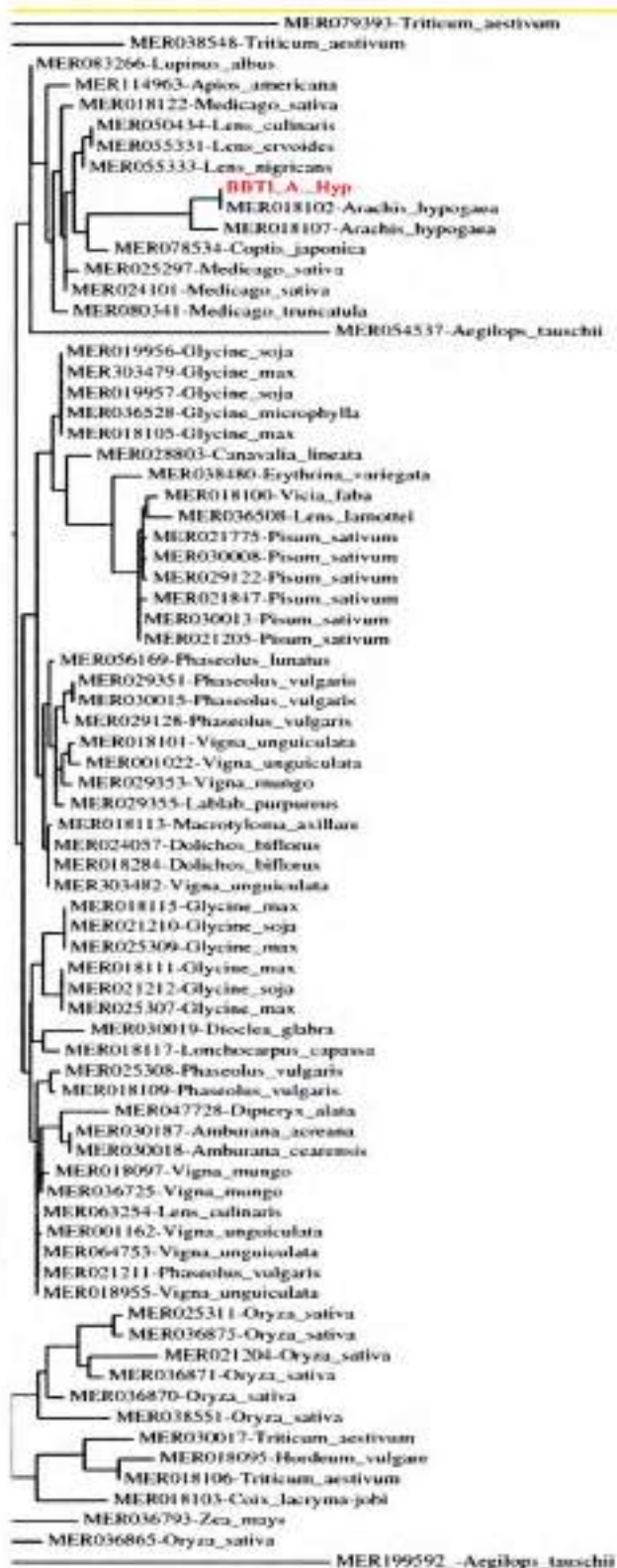
A continuación se presenta el listado de proteínas con nomenclatura de Merops utilizadas para la realización del árbol filogenético de inhibidores de Bowman-Birk de plantas:

Arachis hypogaea Bowman-Birk *Arachis hypogaea* inhibitor; *Aegilops tauschii* (MER199592); *Aegilops tauschii* (MER054537); *Amburana acreana* (MER030187); *Amburana cearensis* (MER030018); *Apios americana* (MER114963); *Arachis hypogaea* (MER018102); *Canavalia lineata* (MER028803); *Coix lacryma-jobi* (MER018103); *Coptis japonica* (MER078534); *Dioclea glabra* (MER030019); *Dipteryx alata* (MER047728); *Erythrina variegata* (MER038480); *Glycine max* (MER018105); *Glycine max* (MER018115); *Glycine max* (MER303479); *Glycine max* (MER018111); *Glycine max* (MER025307); *Glycine max* (MER025309); *Glycine microphylla* (MER036528); *Glycine soja* (MER021210); *Glycine soja* (MER021212); *Glycine soja* (MER019956); *Glycine soja* (MER019957); *Hordeum vulgare* (MER018095); *Lablab purpureus* (MER029355); *Lens culinaris* (MER063254); *Lens culinaris* (MER050434); *Lens ervoides* (MER055331); *Lens lamottei* (MER036508); *Lens nigricans* (MER055333); *Lonchocarpus capassa* (MER018117); *Lupinus albus* (MER083266); *Macrotyloma axillare* (MER018113); *Medicago sativa* (MER025297); *Medicago sativa* (MER018122); *Medicago sativa* (MER024101); *Medicago truncatula* (MER080341); *Oryza sativa* (MER025311); *Oryza sativa* (MER036865); *Oryza sativa* (MER021204); *Oryza sativa* (MER038551); *Oryza sativa* (MER036875); *Oryza sativa* (MER036871); *Oryza sativa* (MER036870); *Phaseolus lunatus* (MER056169); *Phaseolus vulgaris* (MER029351); *Phaseolus vulgaris* (MER021211); *Phaseolus vulgaris* (MER029128); *Phaseolus vulgaris* (MER030015); *Phaseolus vulgaris* (MER018109); *Phaseolus vulgaris* (MER025308); *Pisum*

sativum (MER021847); *Pisum sativum* (MER029122); *Pisum sativum* (MER030013); *Pisum sativum* (MER021205); *Pisum sativum* (MER021775); *Pisum sativum* (MER030008); *Triticum aestivum* (MER018106); *Triticum aestivum* (MER079393); *Triticum aestivum* (MER030017); *Triticum aestivum* (MER038548); *Vicia faba* (MER018100); *Vigna mungo* (MER018097); *Vigna mungo* (MER036725); *Vigna mungo* (MER029353); *Vigna unguiculata* (MER064753); *Vigna unguiculata* (MER018101); *Vigna unguiculata* (MER001162); *Vigna unguiculata* (MER303482); *Vigna unguiculata* (MER018955); *Vigna unguiculata* (MER001022); *Zea mays* (MER036793).

Figura IV.10: Árbol filogenético de inhibidores de *Bowman-Birk* del reino vegetal. Las secuencias y nomenclatura se obtuvieron de la base de datos *Merops*. En A, fragmento ampliado del árbol donde se observa el inhibidor de tripsina Bowman-Birk identificado en el presente estudio. En B, árbol completo.





El análisis comparativo de secuencias de estos inhibidores se muestra en la **Figura IV.11**, donde el inhibidor de *Bowman y Birk* de este estudio (BBTI A HYP) es idéntico al inhibidor de *Arachis hypogaea* (MER018102) y que fue descrito por Norioka como el inhibidor BIII que deriva en la isoformas BI y AI. Los inhibidores presentan dos sitios reactivos conformados por un residuo arginina o leucina con capacidad de unirse al sitio activo de serino proteasas (Norioka, 1982).

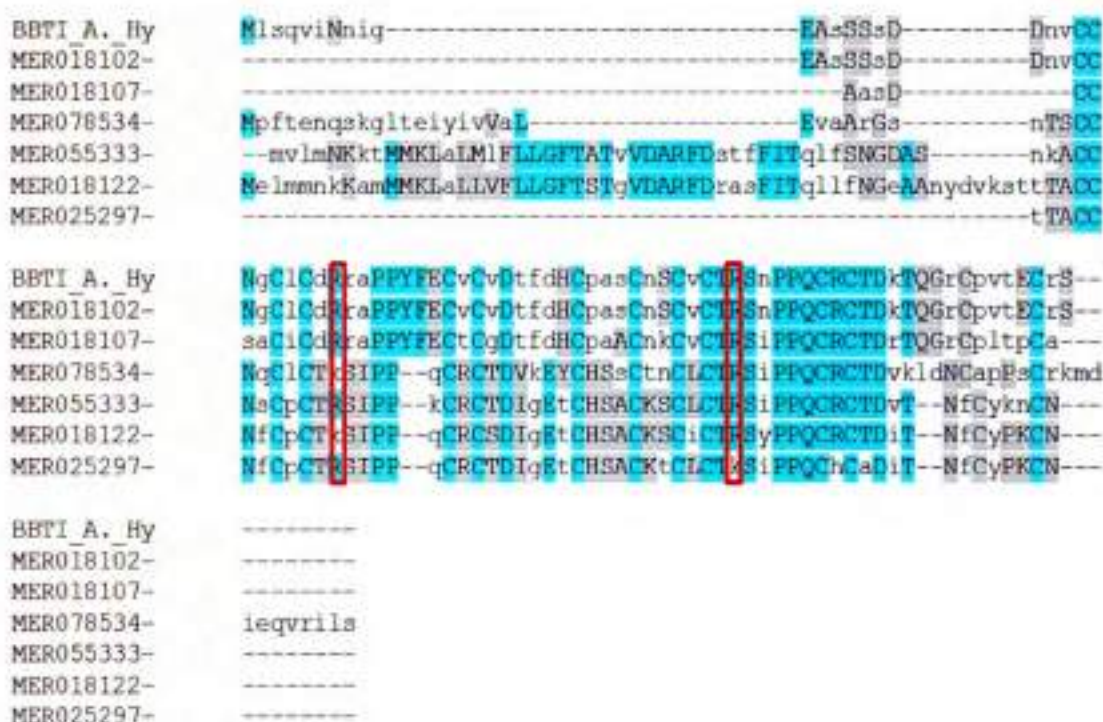


Figura IV.11: Alineamiento de la secuencia aminoacídica del inhibidor de *Bowman y Birk* (BBTI A HYP) con los inhibidores de proteasas de mayor homología. Rectángulos representan aminoácidos conservados.

Se ha descrito que los inhibidores de *Bowman y Birk* de plantas se producen en respuesta a diferentes clases de estrés bióticos y abióticos (Rakwal *et al.*, 2001; Dramé *et al.*, 2013). Su posible rol en la defensa está relacionado con su capacidad insecticida (Prasad *et al.*, 2010) o su actividad anti fúngica (Lanubile *et al.*, 2012).

Con el objetivo de determinar el poder anti fúngico de los inhibidores aislados en la fracción de filtración molecular, se realizó un ensayo donde se evaluaron concentraciones de proteínas crecientes de esta fracción en cultivos de *Aspergillus parasiticus* en medio líquido de *Mueller Hinton* y el desarrollo fúngico fue determinado mediante la absorbancia a 595 nm. En la **Figura IV.12** se muestran los resultados de este estudio, en el cual el cultivar susceptible presentó un aumento del crecimiento fúngico proporcional al incremento de la concentración de proteínas, lo cual refleja un efecto estimulante del crecimiento fúngico. Por otro lado el cultivar resistente, no presentó un efecto anti fúngico pero tampoco reflejo un efecto estimulante (Sharma *et al.*, 2012 Barbana y Boyle, 2013; Kuhar *et al.*, 2013).

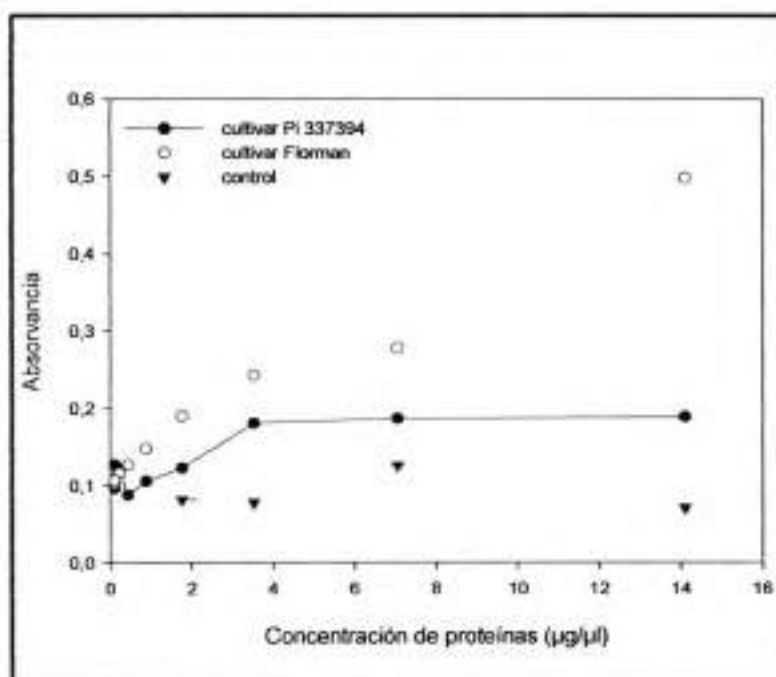


Figura IV.12: Análisis anti fúngico de la fracción 14,15,16 de la cromatografía de filtración molecular del cultivar Pi 337394 y del cultivar Florman.

Con la integración de todos los resultados obtenidos hasta el momento, las proteínas seleccionadas para ser objeto de estudio del nivel de expresión génica, fueron el

inhibidor de tripsina tipo *Kunitz*, expresado diferencialmente en el cultivar resistente y el inhibidor de tripsina tipo *Bowman-Birk*, expresado en ambos cultivares en sus diferentes isoformas. A continuación se presentan las secuencias de los genes seleccionadas de la base de datos de *GenBank*, cabe destacar que aquellas regiones subrayadas fueron empleadas para el diseño de los cebadores en los estudios de expresión génica:

Inhibidor de tripsina tipo *Kunitz* de *Arachis hypogaea*

>gi|149650070|gb|ES761053.1|ES761053 ISBL_4_E02_E003.g1 USDA-Tifton Peanut Library ISBL *Arachis hypogaea* cDNA clone ISBL004_E02_007 5', mRNA sequence

AAATATATAAAAAAAAAATGAAGGCTACAACCACCACCAATGTCTTCGCCATTTTCATCTCTTTGCTTTC
 ATTTCCATCCACCTACCTTCTTTAGCCACGGCTGAGTTGGTCGACACAGACGGCAACCTTATCAAAAACG
 GCGGCTTATACTTCATCCTCCAGTTTTTCGAGGCAACGGCGGCGGAATAGGCCGAATATCAACCGGAAA
 CGAAACGTGTCCACTAACCGTTGTCCAACAACGCTCCGAAGTGGACAACGGATCACCAATTATAATTTCA
 TCTCCATTGAGAATCCCTTTTCTCCGTGAAGGATTTCTTTGGACCTGTCCTTTTCAGCTGTTCTTTCT
 GTACTCCTACTCCTTCCAAGTGGACCTCGTTAAGGGTCTACTGGAAGGAGAAGGAGCCACGGTGAACT
 CACCGTTTTTACGAGAACGAGATACAGGGTTGGTTTGAGATAAGGAAAACCTTGATGCCTTTAACTT
 ACCTTCTGTGCTTCTTCAAATAATAATTGCATGGATATTGGGGTTAAACGTGATGATGAGGGAAATAGGC
 TTTTGGTTGCAACGGA

Inhibidor de tripsina tipo *Bowman-Birk* de *Arachis hypogaea*

>gi|33090234|gb|AY330200.1| *Arachis hypogaea* *Bowman-Birk* trypsin inhibitor mRNA, complete cds

GGCCGCGCAAGGTAGCACTGTTGCTTTTCTTGTGGGACTTTCAGCCACCGTTGAAGCTGTCCGCCTTG
 ACCCAAGCTTGATGCTCTCACAGGTGATAAACAATATTGGCGAAGCATCATCATCTTCAGACGACAATGT

TTGCTGCAATGGCTGTCTATGCGACCGTAGGGCCCCACCATATTTGAGTGTGTTTGTGTTGACACGTTCC
GATCATTGCCCTGCGTCTTGCAACTCCTGCGTTTGACAAGGTCTAATCCTCCACAGTGCCGTTGCACCG
 ACAAACCTCAAGGCCGTTGCCCTGTAACAGAATGTCGTTCTTGAAGCAATTAAGTTCCTTAATAAATAA
 TAAATTGCATATGCAGTGTAACCTGCATATTGCAATGTATGTGATGATGAGGCCAAAGTCACCTTAGACTT
 TGTTTTCATG

Las muestras utilizadas para ser analizadas en el nivel de expresión génica fueron las descritas en la **Sección 1.1 del Capítulo II**, las cuales correspondieron al ensayo de cinética de infección (los tiempos seleccionados para ser analizados fueron 5, 10, 20, 27 y 48 hs. post inoculación fúngica).

En paralelo al análisis de expresión génica, fue realizada la determinación de la actividad inhibitoria de tripsina.

En la **Figura IV.13** es presentada la actividad inhibitoria de tripsina durante la cinética de infección. En general se puede evidenciar un incremento de la actividad de inhibidores de proteasas hacia el final de la cinética, tanto en semillas infectadas y controles de ambos cultivares.

Sin embargo, diferencias significativas entre las muestras control e inoculadas se encontraron a las 10 hs. post inoculación en el cultivar resistente donde se pudo evidenciar un incremento de la actividad de inhibidores de proteasas en las semillas infectadas. Un segundo incremento que se diferencia no significativamente de los controles, se puede observar a las 48 hs. post infección en las semillas infectadas.

En el cultivar susceptible se observó en las semillas infectadas un aumento significativo a las 5 hs. post inoculación respecto a las semillas controles. Posterior a ese tiempo de infección, la actividad de inhibidores de tripsina no se diferencia de las semillas

control hasta las 72 hs. post infección, donde se observa un incremento importante de la actividad en las semillas control con respecto a las infectadas.

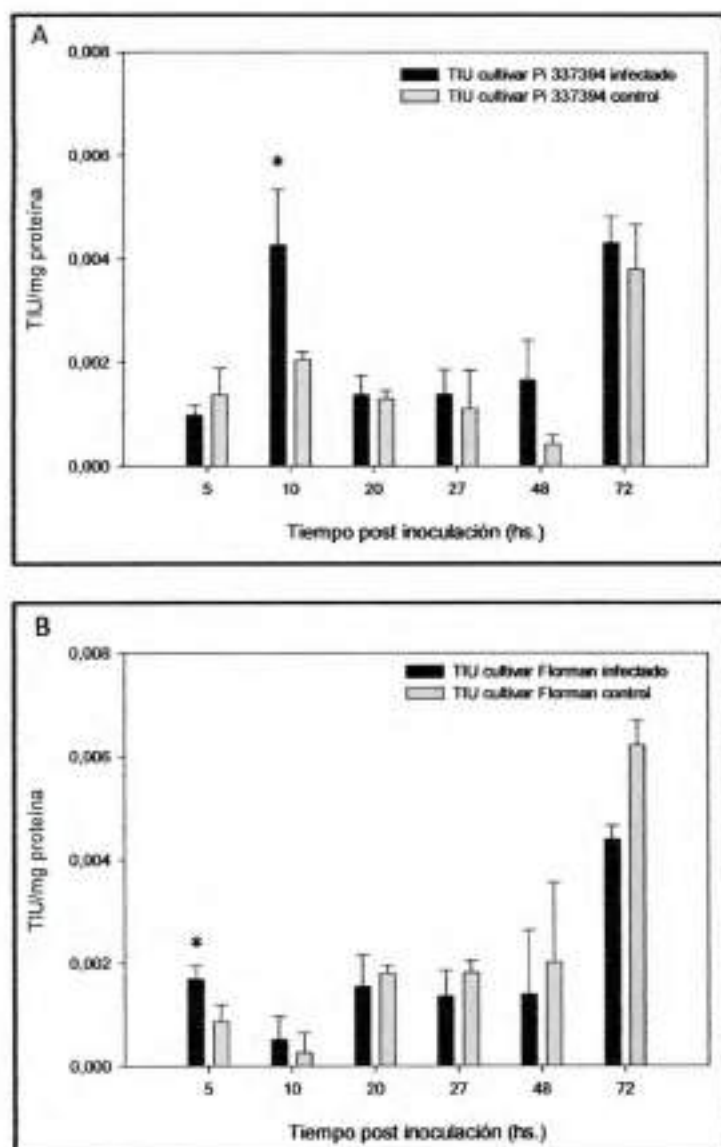


Figura IV.13: Actividad inhibitoria de tripsina en la cinética de infección, expresada como unidades de inhibición de tripsina por mg de proteína, A: Cultivar Pi 337394 infectado y control; B: Cultivar Florman infectado y control.

La expresión génica de los genes candidatos seleccionados de la Vía de Defensa de IP es mostrada en la **Figura IV.14**.

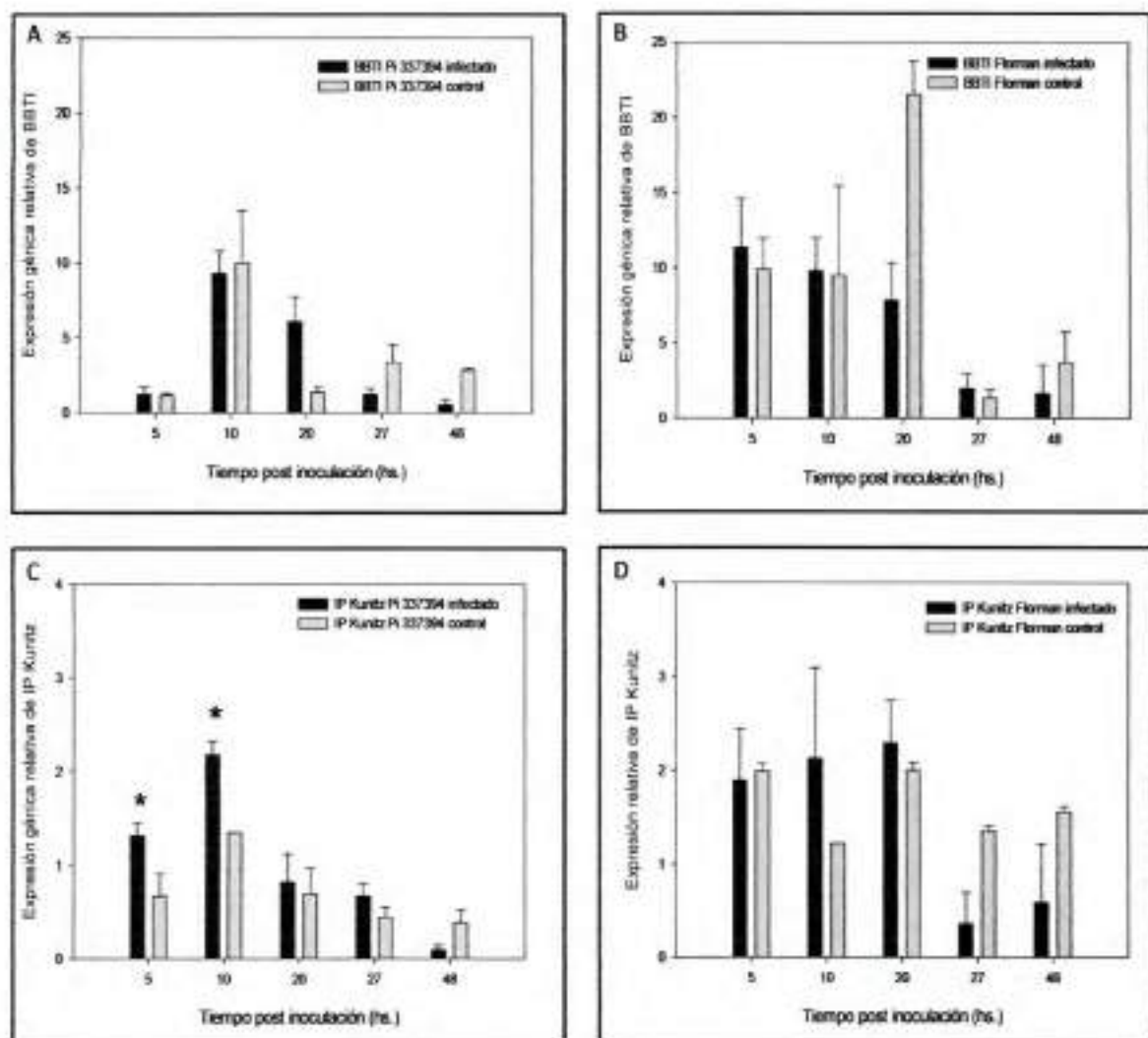


Figura IV.14: Análisis de expresión génica relativa al gen de referencia *H3* (histona 3). A y B: gen *BBT1* cultivar Pi 337394 y cultivar Florman respectivamente. C y D: gen *IP Kunitz* cultivar Pi 337394 y cultivar Florman respectivamente.

Al analizar la respuesta del gen de *Bowman y Birk (BBTI)* en las semillas infectadas y controles de ambos cultivares, se puede observar un patrón de expresión diferente. En el cultivar resistente, se observa un incremento en las semillas infectadas respecto a los controles, seguido de una represión de la expresión a las 27 y 48 hs. en las semillas infectadas.

En el cultivar susceptible se destaca una disminución de la expresión de *BBTI* en las semillas infectadas respecto a los controles a las 20 hs. post infección (**Figura IV.14 A y B**).

La expresión del gen del inhibidor de *Kunitz* en ambos cultivares se presenta en la **Figura IV.14 C y D**. El cultivar resistente presenta una expresión de *IP Kunitz* mayor que en las semillas controles entre las 5 y 10 hs., lo que indica una respuesta temprana de la expresión de estos genes a la infección. Posterior a estos tiempos, la expresión de este gen disminuye en ambos tratamientos, con una represión a las 48 hs. post infección.

La respuesta de la expresión génica del inhibidor de *Kunitz* en el cultivar susceptible fue similar al resistente, donde se observa un incremento de la expresión en las semillas infectadas a las 10 hs. post infección respecto a las semillas controles, seguido de una represión marcada de la expresión a las 27 y 48 hs. post infección.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los inhibidores de proteasas de plantas son proteínas de bajo peso molecular que se producen en diversos procesos fisiológicos y en respuesta a diferentes tipos de estrés. En el presente trabajo hemos aislado e identificado dos inhibidores de proteasas del tipo *Kunitz (IP Kunitz)* y *Bowman-birk (BBTI)* que se produjeron diferencialmente entre un cultivar resistente y uno susceptible en respuesta a la infección con *Aspergillus parasiticus*. El *IP Kunitz* fue detectado únicamente en el cultivar resistente, mientras que el *BBTI* fue producido en ambos cultivares pero con una mayor producción y variantes de isoformas

en el cultivar resistente (Figura IV.4 A; y Figura IV.5 A y B respectivamente). Estos resultados coinciden con estudios previos que evaluaron la expresión génica de las semillas de maní de dos cultivares resistentes (*GT-C20* y *A13*) y uno susceptible (*Tifrunner*) durante la infección de *Aspergillus parasiticus*, y donde se identificaron genes que se expresaban diferencialmente entre los cultivares en respuesta a la infección fúngica (Guo *et al.*, 2008). Dentro de ese grupo de genes diferenciales se reportaron que los *BBT1*, un inhibidor de cisteino proteasas y un IP *Kunitz* (diferente al identificado en nuestro estudio) se sobre expresaban en el cultivar resistente. Sin embargo, en un estudio reciente empleando herramientas de proteómica se analizó la composición de proteínas de semillas del cultivar susceptible *Luhua 14* frente a la infección de una cepa toxigénica y no toxigénica de *Aspergillus flavus*, donde no se evidenció la participación de los inhibidores de proteasas durante la infección, (Wang *et al.*, 2012) lo cual sugiere una regulación de la respuesta de estos inhibidores dependiente del cultivar y/o la especie de hongo infectante.

La función de los inhibidores de proteasas en los procesos fisiológicos de la semilla no están claros, se conoce que participan en el proceso de germinación y dormancia de la semilla (Palma *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2014) participando en el control de la endoproteasas activas en estos procesos y en la regulación de las proteínas de reserva. La función durante la respuesta a estrés es menos conocida aun, algunos autores han propuesto que contribuyen al control de la proteasas que se activan junto a otras enzimas catabólicas en el proceso de estrés hídrico y que su control promueven una mayor tolerancia al estrés (Reddy *et al.*, 2008). En la respuesta a patógenos se ha propuesto que a través de su actividad de inhibición de proteasas restringe al patógeno al acceso a nutrientes, donde en los insectos afecta las enzimas digestivas y su desarrollo (Gruden *et al.*, 2013) y en microorganismos causa una actividad antimicrobiana (Ramalho de Oliveira *et al.*, 2013).

En un estudio previo, se evaluó en el grupo la participación de las proteasas de *Aspergillus parasiticus* durante la colonización de la semilla de maní y se determinó que

estas enzimas afectaban la viabilidad de la semilla, produciendo necrosis tisular y promoviendo la colonización del hongo y la producción de aflatoxinas (Asis *et al.*, 2009). Con base en dicha información se propuso evaluar si los inhibidores de proteasas inducidos durante la infección poseían la capacidad de inhibir las proteasas extracelulares del hongo. Allí se encontró un marcado efecto de inhibición, incluso superior al obtenido al utilizar una mezcla de inhibidores comerciales. Estos resultados indujeron a suponer que los inhibidores de proteasas de maní actuarían en la defensa anulando la acción de las proteasas fúngicas (Asis *et al.*, 2009).

El estudio de la actividad y la expresión génica del IP *Kunitz* y *BBTI* a diferentes tiempos de infección presentaron un comportamiento diferencial entre los cultivares. En el cultivar resistente se observó un incremento de la actividad inhibitoria de tripsina a las 10 hs. post inoculación y una menor actividad a las 48 hs., mientras que en el cultivar susceptible un aumento en la actividad inhibitoria, de menor magnitud que el resistente, fue observada a las 5 hs. post inoculación. Los análisis de expresión génica muestran que la actividad de inhibidores de proteasas se incrementa en las primeras horas de infección y estaría mediada principalmente por los inhibidores de *Kunitz* en ambos cultivares. Notoriamente, en el estudio de purificación e identificación, este inhibidor no fue detectado en el cultivar susceptible (Figura IV.4 B), probablemente por una baja concentración o por diferencias estructurales que puedan haber modificado el comportamiento cromatográfico de esta proteína.

La expresión de los *BBTI*, presentaron una respuesta de incremento posterior que el IP *Kunitz* en el cultivar resistente y una represión de la expresión en el cultivar susceptible (Figura IV.14). Las isoformas de los *BBTI* de maní han sido descritas previamente, y debido a su identidad las isoformas BIII, BI y AII estarían codificadas a partir de un mismo gen que sintetiza una proteína que por clivado postransduccional derivarían en dichas isoformas, y por el contrario la isoforma BII derivaría de un gen diferente (Norioka, 1982). El gen que codifica las isoformas BIII, BI, AII y AI ha sido identificado (Norioka, 1983) y se

desconoce el gen que codifica para la isoforma BII. En el análisis cromatográfico de estos inhibidores, se observaron diferencias de contenido e isoformas entre los cultivares. Teniendo en cuenta lo anterior, es probable que la regulación de estos inhibidores tenga mayor relevancia a nivel postransduccional que transcripcional, y que su regulación produzca el incremento de la actividad de inhibición de tripsina a las 48hs. post inoculación en el cultivar resistente.

Con los resultados obtenidos en el estudio de la Vía de Defensa de IP con el modelo utilizado de dos cultivares (resistente Pi 337394 y susceptible Florman), es posible concluir que ambos cultivares muestran una actividad basal de inhibidores de proteasas producto del proceso de inhibición y activación de la germinación durante el ensayo. Sin embargo se pudo determinar una respuesta temprana de incremento de la actividad de inhibidores en respuesta a la infección, la cual fue significativamente superior en el cultivar resistente.

Se identificaron dos tipos de IP que se producen durante la infección, los cuales mostraron un mayor contenido e isoformas en el cultivar resistente. Así en este cultivar, fueron reconocidos un inhibidor de tripsina tipo *Kunitz* que no ha sido descrito previamente y las isoformas del inhibidor de *Bowman-Birk* AI, AII, BI y BIII, mientras que en cultivar susceptible solo se encontró el inhibidor de tripsina tipo *Bowman-Birk* BIII y AI. La expresión del gen que codifica al inhibidor de *Kunitz* se indujo en las primeras horas de la infección y en mayor medida en el cultivar resistente, sugiriendo el mayor aporte al incremento de la actividad de inhibidores de proteasas observado en las semillas en las primeras horas de infección.

Por el contrario el gen que codifica para las isoformas de *BBTI* se expresó en forma más tardía que el anterior en el cultivar resistente y fue reprimida en el cultivar susceptible. Probablemente la combinación de la regulación transcripcional y postransduccional de estos inhibidores podrían reflejar el aumento de la actividad de IP a las 48 hs. de infección y la composición de isoformas presentes en los cultivares. La participación de estos compuestos en la defensa de la semilla a la infección fúngica estaría

originada por su acción de inhibir las enzimas extracelulares que libera el hongo durante la infección y a un efecto anti fúngico del inhibidor de *Kunitz* producto de esta inhibición o bien por acción de otro mecanismo sin dilucidar hasta el momento.

CAPÍTULO V

ENSAYOS A CAMPO

V-ENSAYOS A CAMPO

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios sintetizados por el género *Aspergillus*, especies *flavus* y *parasiticus* casi exclusivamente, aunque algunos autores han señalado algunas cepas de *A. nomius* y *A. tamarii*, también como productores de aflatoxinas (Kurtzman, 1987). La contaminación de aflatoxinas en el campo se ve influenciada significativamente por las condiciones ambientales, en donde el hongo crece sobre varios alimentos cuando las condiciones de sustrato y del entorno le son favorables. Dentro de los cultivos afectados se encuentran el maíz, el maní, los cereales, pudiendo ocasionar pérdidas importantes en las cosechas.

La contaminación puede producirse tanto durante el periodo pre cosecha como post cosecha. En este último caso se desarrollaron estudios que permitieron identificar las variables que afectan la post cosecha (Pedelini, 2012). Sin embargo, en la pre cosecha los resultados no han sido tan efectivos como en la post cosecha. En la pre cosecha la contaminación puede producirse a diferentes estadios madurativos y en distintos órganos. Por ejemplo en flores, éstas se contaminan cuando la temperatura ambiental diurna se mantiene entre 27-30°C, mientras que la infección de los frutos en maní se produce cuando ocurre la penetración en el suelo (Diener *et al.*, 1982; Sanders *et al.*, 1984). La temperatura y el nivel de precipitaciones son los limitantes climáticos en términos de crecimiento, producción y extensión del cultivo en el mundo. El estrés hídrico es la variable más estudiada y que promueve la mayor contaminación de los cultivos en las regiones semi áridas y áridas (Holbrock *et al.*, 2000). Algunos autores señalan que la contaminación pre cosecha requiere situaciones de estrés hídrico por un periodo de 30-50 días, en combinación con una temperatura de suelo entre 29-31°C (Cole *et al.*, 1885; Dorner *et al.*, 1989). A su vez, las altas temperaturas diurnas (38 vs 28°C) reducen la producción de materia seca en un 20 a 35% (Craufurd *et al.*, 2002). Si bien el maní es considerado como un cultivo resistente a la sequía, requiere adecuada humedad durante

todo el ciclo para lograr máximos rendimientos, destacándose como etapa crítica la falta de agua del período de desarrollo reproductivo. Se requieren aproximadamente entre 400 y 520 gramos de agua para producir un gramo de materia seca total (Giayetto y Fernandez, 2006). Estudios a campo, confirman que la infección con *Aspergillus spp.* y la contaminación con aflatoxinas se encuentra relacionada al estrés hídrico que pudieron sufrir las plantas y a la humedad del suelo durante el proceso fisiológico de llenado de las vainas de mani (Craufurd *et al.*, 2005). Para evitar el estrés hídrico, las semillas requieren un nivel adecuado de humedad durante todo el ciclo, sin embargo algunos períodos de crecimiento son más críticos que otros. En resumen el ciclo puede ser dividido en 4 estadios: la germinación, el desarrollo vegetativo, el desarrollo reproductivo y la madurez a cosecha (Giambastiani, 2005).

El desarrollo vegetativo es considerado cuando el 50% de las plántulas tienen los cotiledones próximos a la superficie del suelo y es visible alguna parte de la plántula.

El desarrollo reproductivo cuenta con 9 etapas denominadas R1-R9. El estado R1 es el comienzo de floración. Cuando el 50% de las plantas tienen o han tenido una flor abierta. El número de días a R1 está determinado principalmente por la temperatura y es casi insensible al foto período. En Córdoba, Argentina, este estado se alcanza entre 30 y 40 días después de la emergencia.

El estado R2 es caracterizado con el comienzo de enclavado. Cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un clavo elongado haya o no penetrado al suelo. Generalmente, en condiciones sin estrés, el período desde la fecundación hasta que la base del ovario fertilizado comienza a elongarse, lleva 5 a 7 días. El proceso de elongación propiamente dicho lleva 1 a 2 días.

El estado R3 es la formación de las cajas. Cuando el 50% de las plantas tienen un clavo elongado con el extremo hinchado por lo menos el doble del diámetro del clavo. Este estado marca el comienzo de la formación activa de clavos y frutos.

El estado R4 de caja completa. Para la definición de este estado se utiliza la característica del máximo tamaño de frutos que es dependiente del cultivar. Se alcanza este estado cuando el 50% de las plantas tiene la primera caja completamente expandida, es decir ha llegado a su máximo tamaño.

El estado R5 se caracteriza por el comienzo de llenado de semillas. Cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un fruto, que al ser seccionado por la mitad, se puede observar sin dificultad los cotiledones.

El estado R6 está representado por la semilla completa. Cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un fruto con las semillas que ocupan el volumen total de las cavidades de la caja. El endocarpo fresco y esponjoso que ocupa el volumen que deja la semilla se encuentra comprimido a una capa algodonosa. A pesar que las semillas, que en ese estado tienen un alto contenido de humedad, alcanzaron el máximo volumen, todavía no llegaron a su máximo peso seco.

El estado R7 es el comienzo de madurez. Ocurre cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un fruto con la parte interna del pericarpo manchada. El cultivo en este estado está realmente a la mitad de la fase activa de llenado de semillas.

El estado R8 de madurez de cosecha. Se alcanza cuando un determinado porcentaje de frutos llega a su madurez. Este porcentaje varía según el genotipo y el ambiente.

Finalmente el estado R9 corresponde a la caja sobre madura. Se llega a este estado cuando las plantas comienzan a tener frutos sanos con el pericarpo con coloración anaranjado oscura y/o un deterioro natural de los clavos. Las semillas contenidas en estos frutos sobre maduros presentan el tegumento con una coloración amarronada.

La germinación requiere un buen nivel de humedad, lo cual colabora en la implantación del cultivo y ayuda a la efectividad de los herbicidas (Bradford, 1995). El periodo de desarrollo vegetativo tolera la carencia de humedad sin mayores complicaciones; ya en el estadio reproductivo, en el cual comienza la floración, el clavado (penetración del clavo en el suelo para dar lugar a la formación de vainas) y la formación de vainas es el momento donde la humedad es una limitante. El estado de madurez hasta

la cosecha no resulta demasiado afectado a la falta de agua como es el caso del estado anterior, sin embargo una sequía con elevada temperatura, favorece la contaminación con aflatoxinas (Pedelini, 2008).

Por lo anteriormente expuesto se han definido estrategias de control y/o de tolerancia a la contaminación aflatoxigénica a campo. La búsqueda anual de tierras aptas para el cultivo y de cultivares tolerantes se ha convertido en el fundamento para el movimiento de las fronteras productivas en las sucesivas campañas agrícolas. Sin embargo, la provincia de Córdoba mantiene históricamente la mayor participación de área sembrada de maní en el país.

Una de las estrategias planteadas para el control a campo se basa en la utilización de cultivares tolerantes a la infección con *Aspergillus spp.* Para ello se evaluaron cultivares a campo y en ensayos *in vitro* (Will *et al.*, 1994; Mehan *et al.*, 1981; Asis *et al.*, 2005). En el presente Capítulo se realizaron ensayos a campos con la finalidad de observar diferencias en la tolerancia a la infección fúngica y la contaminación con aflatoxinas en diferentes cultivares, seleccionados del banco de germoplasma de la Estación Experimental INTA Manfredi, Córdoba, Argentina. La totalidad de ensayos fueron concretados en la mencionada Institución; diseñados y supervisados por el Dr. Jorge Gieco. La siembra de maní en la provincia de Córdoba se realizó en el mes de octubre y la cosecha fue efectuada en los meses de abril y mayo del año siguiente. Tanto la metodología para el diseño experimental como los tiempos y la selección de los cultivares a ensayar dependieron del calendario de siembra, de los Proyectos de investigación a campo de INTA y de la experiencia en el área de los responsables.

2. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron: evaluar a campo la susceptibilidad a *Aspergillus spp.* y contaminación con aflatoxinas de los cultivares caracterizados como

susceptibles y resistentes en los estudios *in vitro*; y a su vez evaluar en estos cultivares la expresión de los genes de las Vías de Defensa de Lipoxigenasas y de Inhibidores de Proteasas durante la infección a campo.

3. Campaña 2007-2008 y 2008-2009 Tolerancia a *Aspergillus spp.*

El ensayo a campo correspondiente a las Campaña 2007-2008 y 2008-2009 de Tolerancia a *Aspergillus spp.* fue realizado sobre un total de 25 cultivares comerciales caracterizados con diferente capacidad de resistencia a la infección con *Aspergillus* y contaminación con aflatoxinas. Dentro de los cultivares ensayados, fueron incluidos el resistente Pi 337394 y el susceptible Florman, objetos de estudio del presente trabajo a los fines de observar la respuesta a campo.

El diseño experimental fue realizado en la Estación Experimental INTA Manfredi, con distribución en bloques completamente aleatorizados, se realizaron cuatro repeticiones en bloques divididos en parcelas, sometidos a diferentes tratamientos. La fundamentación en la utilización de la distribución de réplicas en bloques, está basada en la eliminación de la variabilidad proporcionada por factores ambientales tales como el nivel del terreno, la foto exposición, corrientes de aire, temperaturas medias, entre otras (Asis *et al.*, 2005).

Fueron incluidas replicas control (sin inoculación fúngica) y replicas inoculadas. En cada parcela de las 4 repeticiones fueron sembradas 7 plantas del mismo cultivar y solo las 3 centrales fueron utilizadas.

La distancia entre las plantas del mismo cultivar fue de 25 cm y entre las hileras de los diferentes cultivares fue de 70 cm. Cada parcela dentro de una réplica (bloque) representó un tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Control sin inducción de estrés hídrico.
2. Inducción del estrés hídrico en el estadio fenológico del 50 % de floración.
3. Inducción del estrés hídrico en el estadio fenológico de fase inicial de

formación de cajas (20 días después del inicio de la inducción del primer estrés).

4. Inducción del estrés hídrico en el estadio fenológico de llenado de grano (madurez fisiológica de 40 días después de la fecha de inducción del primer estrés).

En todos los casos el estrés fue realizado eliminando el tratamiento de riego y la duración del periodo de estrés fue de 20 días. Para prevenir la aparición de hierbas antes de la siembra fue colocado Imazetapir (100 ml/Ha) y para la post emergencia como herbicida se usó Cledotin (175 ml/Ha). La mancha foliar a su vez fue evitada utilizando Mancozeb (1kg/ha).

El inoculo fue colocado luego de finalizado el período de inducción de estrés hídrico en cada tratamiento de las parcelas y realizado mediante el enterramiento de granos de trigo estéril contaminado con *Aspergillus parasiticus*. Los granos de trigo colonizados fueron aplicados en un surco abierto en la base de las plantas de cada hilera y posteriormente cubiertos con tierra.

La cosecha fue realizada manualmente cuando las plantas obtuvieron su grado de madurez (entre 95-100 días), las mismas fueron arrancadas y el decapotado (separación de las cajas de la planta) también fue de acción manual. El secado de las semillas fue a una temperatura entre 30-35°C, hasta un contenido de humedad de aproximadamente 11% p/p.

En la Campaña 2007-2008 se analizó la infección interna y la germinación. No se cuantificó el contenido de aflatoxinas, dado que al analizar los resultados obtenidos no fueron coincidentes con las caracterizaciones a campo realizadas previamente (Asis *et al.*, 2005). En la Campaña 2008-2009 se analizó la infección interna y la germinación, como así también el contenido de aflatoxinas. La metodología utilizada para la cuantificación de aflatoxinas ha sido descripta en la **Sección 1.7 del Capítulo II**.

Los cultivares ensayados fueron: J11(Junagah 11, un cultivar comercial originario de India); Manfredi 68 (resultado de la cruce entre Maní Negro originario de Corrientes, Argentina y Fla 249-40-B3 de Estados Unidos); Granoleico (cultivar con elevado contenido de ácido oléico); Colorado Irradiado (cultivar mutado generado a partir de la irradiación con rayos x del cultivar Colorado INTA); R10; Negrito; Manigran; Pi 337409 y Pi 337394

(cultivares descubiertos en el noroeste de Argentina y centro de Paraguay e introducidos en la colección del Banco de Germoplasma de Estados Unidos); Guanaco; 2588, 2120, 2136, 2574, 2576, 2049, 2033, 2589, 2136, 2841, 2122, 2587 y 2121 (introducciones de INTA); Asem 505; Florman (cultivar obtenido mediante una selección durante 9 años de Florunner).

3.1. Infección Interna

El objetivo principal del ensayo de infección interna se basa en la observación por inspección visual de la infección natural como consecuencia de la inoculación fúngica a campo. Todos los diseños experimentales presentaron semillas control e infectadas, en donde las primeras son el fiel reflejo de la contaminación natural medio ambiental de las semillas, no solo de hongos del género *Aspergillus*, sino también de otros patógenos fúngicos, bacterias, parásitos, etc.

El ensayo de infección fue realizado a partir de semillas desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% v/v por 3 minutos y enjuagadas con agua destilada estéril.

Posteriormente fueron hidratadas en agua estéril por medio de adsorción con papeles humedecidos previamente durante 3 periodos de contacto de 3 minutos cada uno, para evitar el shock osmótico de las semillas y la rotura posterior de las mismas. Las semillas fueron colocadas en placas de *Petri* estériles y llevadas a una cámara húmeda a 30°C para permitir la germinación y el desarrollo fúngico.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2.1. Campaña 2007-2008 Tolerancia a *Aspergillus spp.*

De los 25 cultivares sembrados, fueron seleccionados para determinar infección interna y germinación 6 cultivares, dado que el remanente de ellos son introducciones con fines de estudios agronómicos.

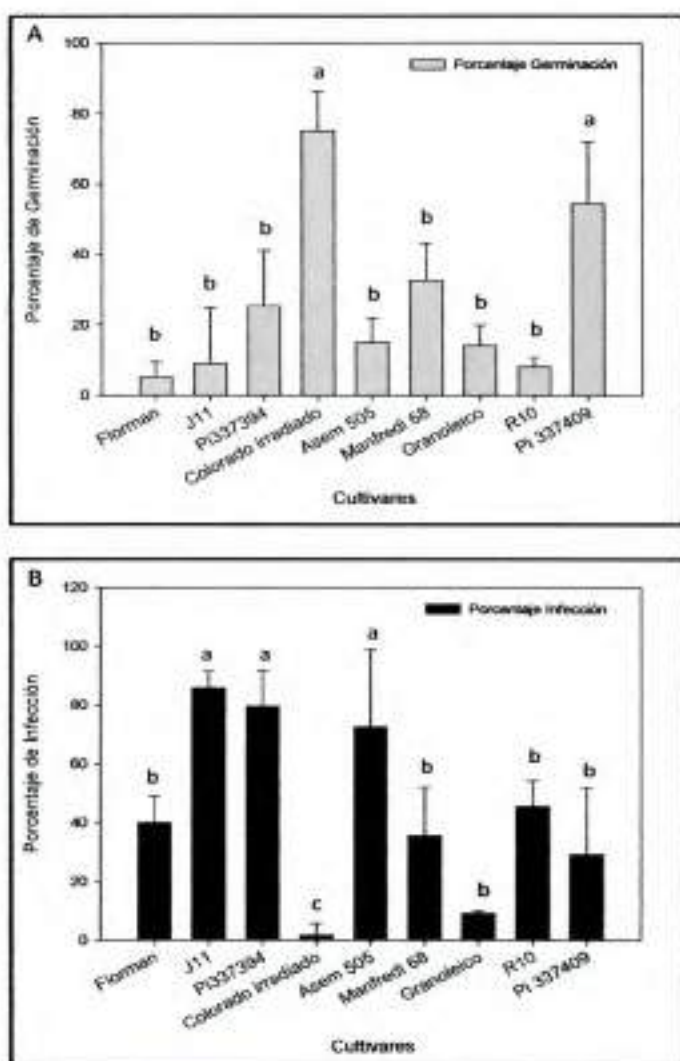


Figura V.1 Porcentajes de germinación e infección de los cultivares ensayados de la Campaña 2007-2008; A: Germinación, B: Infección. Letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

En la **Figura V.1** se observan los porcentajes de germinación e infección de dichos cultivares. Han sido encontradas diferencias en el porcentaje de germinación entre los cultivares analizados y entre los cultivares del modelo utilizado de resistente Pi 337394 y susceptible Florman. A su vez, se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de

infección, en donde los cultivares caracterizados como resistentes a la infección con *Aspergillus spp.* (Pi 337394, J11, Asem 505) (Asis *et al.*, 2005) se mostraron poco tolerantes a la infección. Sin embargo, se pudo evidenciar que la flora microbiana desarrollada sobre las semillas corresponden a hongos diferentes a *Aspergillus parasiticus*, lo cual nos estaría indicando que *Aspergillus* no infectó las semillas en el campo.

3.2.2. Campaña 2008-2009 Tolerancia a *Aspergillus spp.*

En esta campaña los análisis de infección interna y germinación no mostraron diferencias significativas entre las semillas control e inoculadas (datos no presentados). A diferencia de la campaña anterior, en los análisis de infección interna no se encontró colonización fúngica, lo que indicaría que la infección no fue alcanzada. Aunque no se observó la presencia de micelio, el dosaje de aflatoxinas fue realizado, dado que existe una independencia entre la infección fúngica y la biosíntesis de aflatoxinas, basada en la interferencia de factores ambientales. El análisis de aflatoxinas no detectó contenido de estas micotoxinas en la semillas infectadas, lo cual corroboró que *Aspergillus parasiticus* no alcanzó a colonizar las semillas en el campo.

3.3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante las dos campañas de ensayos de infección de semillas de maní a campo con *Aspergillus parasiticus* nos indican que el procedimiento de infección no ha sido adecuado para alcanzar la infección de las semillas. Analizando las variables que deberían ajustarse, la principal variable que parecería ser crítica es el estrés hídrico (Craufurd *et al.*, 2005). Trabajos previos de infección de maní con *Aspergillus parasiticus* o *flavus* en el campo, además de eliminar el riego emplearon protectores de cultivo contra la lluvia (Shelter), y principalmente fueron realizados en regiones semiáridas o áridas, donde las precipitaciones son escasas y las temperaturas elevadas (Holbrock *et al.*, 2000). Nuestros ensayos, a diferencia de los mencionados, fueron realizados en una

región cálida y húmeda. En estas campañas el régimen de lluvias fue menor que años anteriores, donde se registró para los meses de diciembre a marzo un promedio de 63,6 \pm 8,9 mm y 71,5 \pm 13,02 mm para la Campaña 2007-2008 y 2008-2009 respectivamente (Datos reportados por la estación meteorológica: 84100 (LEBA) Latitud: 37.85 | Longitud: -4.83 | Altitud: 90). Sin embargo no se obtuvo registro del contenido de humedad en el suelo donde se considera podría haber sido elevado para alcanzar un nivel de estrés hídrico adecuado para la infección (Widstrom *et al.*, 2003). A la situación mencionada se le suma el hecho que la temperatura media durante el periodo de tiempo del ensayo fue, para la Campaña 2007-2008, de 11,6 \pm 2,09°C con una temperatura máxima de 18,73 \pm 2,5°C; y para la Campaña 2008-2009 de 10,35 \pm 2,76 con una temperatura máxima de 16,73 \pm 3,67°C. Estos datos fueron muy inferiores a los descritos en otros ensayos (Cole *et al.*, 1885; Dorner *et al.*, 1989; Craufurd *et al.*, 2002) y por debajo de las condiciones de alcanzar temperaturas de suelo apropiadas para incrementar la competencia de *Aspergillus spp.* La temperatura es un factor clave para que el hongo adquiera competencia con otros hongos de suelo, donde se ha observado que temperaturas superiores a los 30°C aumentan la población de *Aspergillus spp.* en suelos (Cole *et al.*, 1885; Dorner *et al.*, 1989).

Estos resultados ponen en evidencia que la infección natural está fuertemente influenciada por las condiciones ambientales, las cuales no fueron logradas en nuestros ensayos. Razón por la cual se decidió realizar en la Campaña siguiente una inoculación *in situ* a través de la caja en condiciones normales de irrigación del cultivo.

4. Campaña 2011-2012 Tolerancia a *Aspergillus spp.*

Con los resultados obtenidos en las Campaña 2007-2008 y 2008-2009, el ensayo a campo correspondiente a la Campaña 2011-2012 de Tolerancia a *Aspergillus spp.* fue diseñado nuevamente, acotando el tamaño de la población de cultivares y modificando el proceso de inoculación con el objetivo de asegurar la infección de las semillas.

El ensayo a campo fue realizado sobre un total de 9 cultivares comerciales caracterizados con diferente capacidad de resistencia a la infección con *Aspergillus* y contaminación con aflatoxinas en ensayos *in vitro* (Asis *et al.*, 2005).

Si bien el objetivo principal del análisis de cultivares inoculados a campo fue corroborar los resultados en términos de resistencia encontrados en el modelo de dos cultivares (uno resistente, Pi 337394 y uno susceptible, Florman) propuesto en el presente trabajo *in vitro*, fueron agregados otros cultivares caracterizados con niveles de resistencia y susceptibilidad diferenciales a los fines de observar las respuestas a campo de los mismos y las interacciones de otros factores ambientales.

El diseño experimental fue realizado en la Estación Experimental INTA Manfredi, y se respetó el procedimiento realizado en las campañas anteriores. El inóculo fue colocado *in situ* realizado mediante la perforación de la caja de las semillas de maní con una pipeta tipo *Hamilton*, inoculando 15 μ l de una suspensión de una población de *Aspergillus flavus* y *parasiticus* de 1×10^4 esporas/ml de solución (preparada como fue descrito en la Sección 1.1 del Capítulo II del presente trabajo). La colocación *in situ* del inóculo en la caja fue para asegurar la infección. El momento de la inoculación fue el denominado estado reproductivo R6: Semilla completa (cuando el 50% de las plantas tienen por lo menos un fruto con las semillas que ocupan el volumen total de las cavidades de la caja). En este ensayo no se aplicó estrés hídrico, sino que fue sometido a régimen de lluvias natural y riego. Las semillas fueron cosechadas 15 días después de la inoculación.

No fue analizada la infección interna ni tampoco la germinación de las semillas ensayadas a campo, dado que la cantidad de semillas obtenidas resultó ser limitante. Por tal motivo se procedió a la cuantificación de aflatoxinas como parámetro de evaluación del comportamiento de resistencia y el análisis de expresión de genes de la vía de lipoxigenasas e inhibidores de proteasas para comparar su comportamiento con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*.

La metodología utilizada para la cuantificación de aflatoxinas y análisis de expresión de genes (extracción de ARN y síntesis de ADNc, el diseño de cebadores y la Reacción en

Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real) ha sido descrita en la **Sección 1.7** y en la **Sección 1.8 del Capítulo II**, respectivamente.

Los cultivares ensayados a campo fueron: Asem 484, J11, Manfredi 68, Flavorunner, Granoleico, Colorado Irradiado, R10, Florman y Pi 337394.

La cuantificación de aflatoxinas fue realizada en todos los cultivares pertenecientes al ensayo a campo en estudio, mientras que el análisis de expresión génica fue llevado a cabo en los cultivares Pi 337394 y Florman solamente. Los genes analizados fueron: LOX 2-3, LOX 4, LOX 5, *BBTI*, *IP Kunitz*.

4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como análisis inicial, se procedió a abrir las cajas y extraer las semillas para el análisis de aflatoxinas y expresión génica. Durante este procedimiento se observó una colonización de *Aspergillus parasiticus* en el espacio interno de las cajas y sobre las semillas, junto a regiones de necrosis en la zona de inoculación de la vaina (**Figura V.2**).

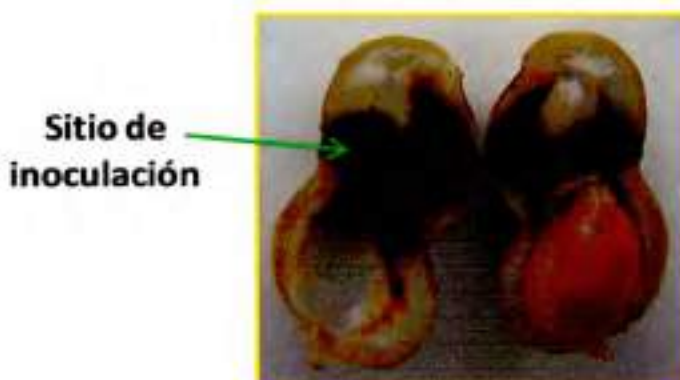


Figura V.2: Imagen fotográfica de la caja inoculada, donde se observa el sitio de inoculación y la región necrosis consecuente.

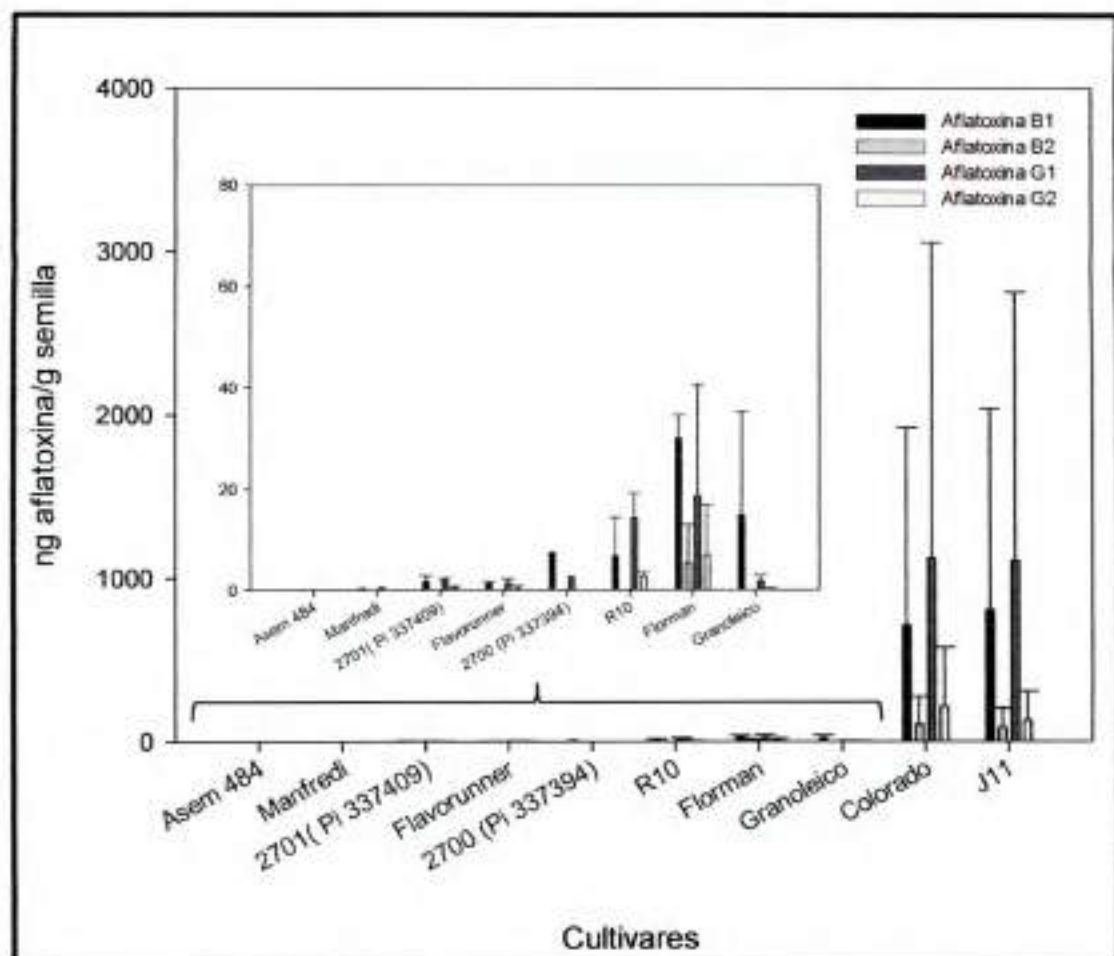


Figura V.3: Aflatoxinas, expresadas como ng de aflatoxinas por gramo de semillas de los cultivares ensayados en la Campaña 2011-2012.

Los resultados del contenido de aflatoxinas en las semillas de los cultivares en estudio se presentan en la **Figura V.3**. Los datos corresponden a la media de 3 bloques de replicas, donde se observa una gran dispersión de los valores de aflatoxinas producto de la variabilidad biológica y de las condiciones ambientales en el ensayo. De la comparación de los resultados, los genotipos J11 y Colorado Irradiado presentaron mayor concentración de aflatoxinas, lo que puede relacionarse con el alto grado necrosis de las semillas en el

momento de la cosecha (Figura V.4). De forma opuesta, los cultivares: Asem 484, Manfredi 68, 2701 (Pi 337409), Pi337394 y Flavorunner presentaron los menores contenidos de aflatoxinas, mientras que R10, Granoleico y Florman presentaron niveles de contaminación intermedio. De esta manera se pudo caracterizar a los mencionados grupos como susceptible, medianamente susceptibles y tolerantes a la contaminación con aflatoxinas.



Figura V.4: Imagen fotográfica del cultivar J11 control e infectado (arriba) y cultivar Colorado irradiado control e infectado (abajo).

Los cultivares Florman y Pi337394 presentaron un comportamiento frente a la colonización y contaminación con aflatoxinas similar al observado en los ensayos *in vitro*. Las cajas infectadas del cultivar Florman presentaron un desarrollo diseminado del hongo sin presentar un efecto en el llenado de las semillas (Figura V.5).

Por el contrario en el cultivar resistente Pi337394 se observó un desarrollo del hongo localizado sobre la región de inoculación y fuerte efecto en el llenado de las semillas (Figura V.5). Estos resultados sugieren que el cultivar resistente se encuentra activando una respuesta de defensa en el tejido de la caja que limita el desarrollo de la infección.

En general todos los cultivares presentaron un grado importante de colonización fúngica en las cajas, lo cual indicaría un tamaño de inóculo elevado que debería ser optimizado para ensayos futuros.

PI 337394 control



Florman control



PI 337394 infectado



Florman infectado



Figura V.5: Imagen fotográfica del cultivar Pi 337394 control e infectado (izquierda) y del cultivar Florman control e infectado (derecha).

Posterior a los análisis de aflatoxinas y evaluación de la infección, se procedió a evaluar la expresión de los genes de las vías de lipoxigenasas e inhibidores de proteasas en los cultivares Pi337394 y Florman.

Los resultados de este análisis se muestran en la **Figura V.6**.

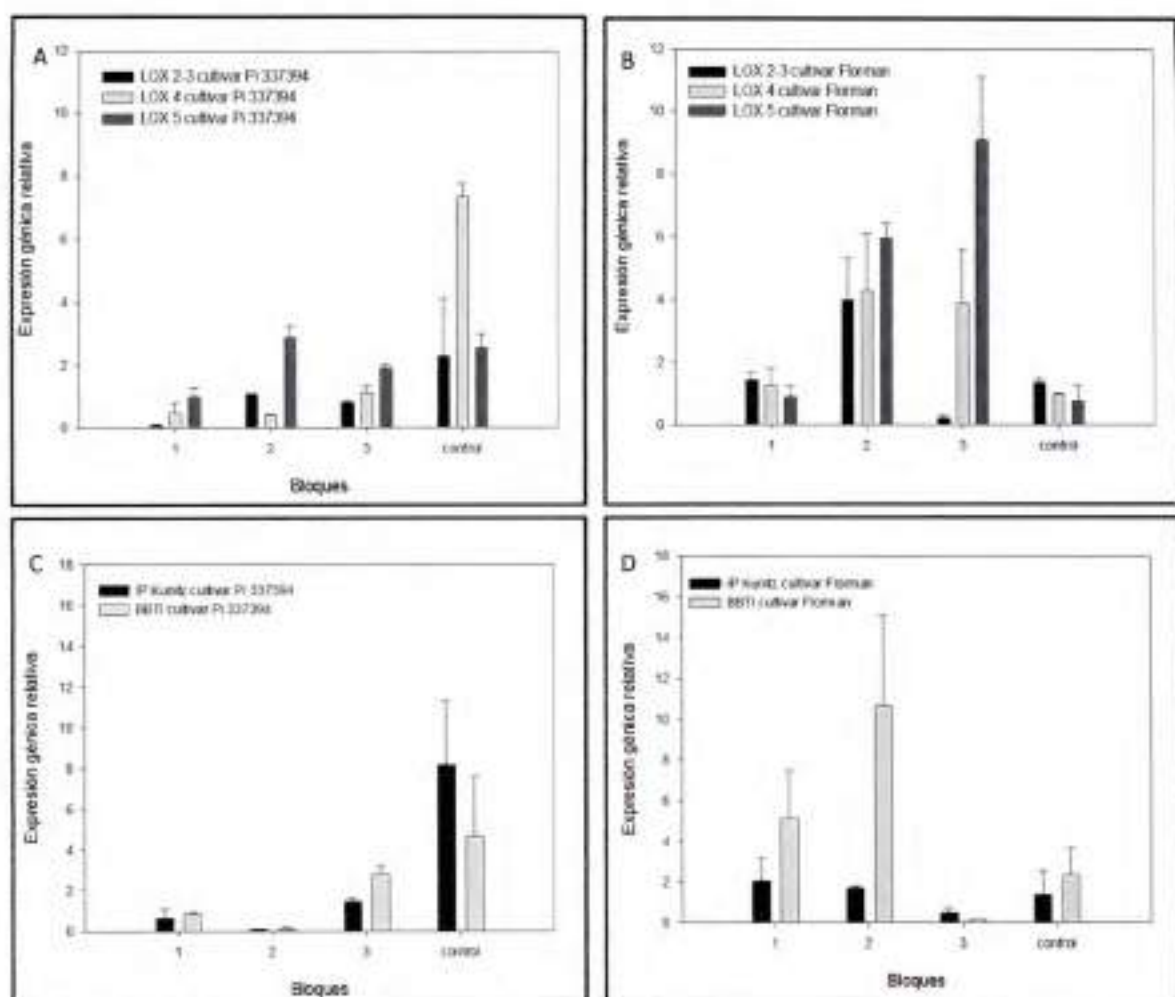


Figura V.3 Análisis de expresión génica. A y B: gen LOX 2-3, gen LOX 4, gen LOX 5 cultivar Pi 337394 y cultivar Florman respectivamente. C y D: gen IP Kunitz, gen BBTI cultivar Pi 337394 y cultivar Florman respectivamente.

Para la vía de LOX se evaluaron los genes LOX 2-3, LOX 4 y LOX 5 donde se observó al igual que los datos de aflatoxinas una gran variabilidad entre los bloques. En el cultivar resistente la media de expresión de LOX 2-3 y LOX 4 se encontró disminuida en las semillas infectadas respecto a los controles no infectados, mientras que LOX 5 no presentó variaciones.

En el cultivar Florman, las medias de expresión de LOX 2-3, LOX 4 y LOX 5 presentaron un incremento en las semillas infectadas respecto a los controles (**Figura V.6 A y B**).

Para la vía de los IP se analizaron los genes que codifican IP *Kunitz* y IP *Bowman-Birk (BBTI)* (**Figura V.6 C y D**). La media de la expresión de ambos genes en las semillas infectadas del cultivar resistente Pi337394 fue inferior a los controles. En el cultivar Florman los cambios de expresión de ambos inhibidores con respecto a sus controles no fueron significativos, sin embargo la expresión de *BBTI* estuvo aumentada respecto a los controles mientras que la expresión del IP de *Kunitz* no presentó variaciones (**Figura V.6 D**).

Los resultados obtenidos muestran que los genes de LOX4 y LOX 2-3 presentaron una respuesta diferenciada entre los cultivares al proceso de infección. Este mismo fenómeno se pudo observar en la respuesta de la expresión de inhibidores de proteasas. A su vez se puede observar una asociación entre la expresión de LOX 4 y LOX 2-3 y la expresión de los genes de IP en ambos cultivares. Este mismo comportamiento pudo observarse en los ensayos *in vitro*. Estos genes codifican una enzima del tipo 13-LOX que participan en la síntesis de ácido jasmónico, un regulador directo de la expresión de genes de inhibidores de proteasas (De Carvalho *et al.*, 1999).

En los ensayos *in vitro* se observó un comportamiento similar donde LOX 4 y LOX 2-3 presentan una expresión temprana que estuvo asociada a una expresión temprana de los inhibidores de proteasas. También pudo observarse en los ensayos *in vitro* que la expresión de lipoxigenasas e inhibidores de proteasas en el cultivar resistente presentó una respuesta temprana de expresión seguida de una represión de la expresión, mientras que en el cultivar susceptible el comportamiento de la respuesta fue similar en la

expresión de LOX 4 y el inhibidor de *Kunitz*, pero LOX 2-3 y *BBTI* presentaron una disminución paulatina durante la infección y LOX 5 fue incrementando.

En el ensayo a campo pudo evidenciarse un comportamiento similar a lo que se observó en un estadio avanzado de infección en el ensayo *in vitro*, lo que sugiere que el tiempo de exposición a la infección fue muy prolongado para detectar una respuesta temprana similar a la observada *in vitro*.

4.2. CONCLUSIONES

A partir de estos estudios se pudo concluir que la infección a campo con *Aspergillus spp.* en semillas de maní resultó ser compleja y altamente dependiente de variables climáticas como el régimen de lluvias y temperaturas que no pudieron ser totalmente controladas para alcanzar las condiciones óptimas para la infección. Para reproducir una situación de infección natural en el campo será necesario trasladar el ensayo a regiones con climas semiáridos o áridos. Para ello se ha propuesto reproducir el ensayo en la estación experimental de INTA Cerrillo provincia de Salta. Aunque también sería conveniente realizar el ensayo en invernadero con condiciones controladas previamente.

A pesar de no haber logrado una reproducción de la infección natural, se logró infectar artificialmente las semillas inoculándolas a través de la caja. Este ensayo nos permitió caracterizar el comportamiento de las semillas de los cultivares resistente Pi337394 y susceptible Florman a la contaminación con aflatoxinas, donde pudo comprobarse un comportamiento similar al determinado en los ensayos *in vitro*.

El desarrollo de la infección también presentó diferencias entre estos cultivares, donde pudo observarse en el cultivar susceptible un desarrollo del hongo que se diseminó en el espacio interno de la caja con poco efecto en el llenado de las semillas, mientras que en el cultivar resistente el desarrollo del hongo se limitó a la región de inoculación y produjo un efecto en el llenado de las semillas aledañas a esta región. A su vez se pudo determinar que existen cultivares como Asem 484 y Mafredi 68 con una resistencia

superior a Pi337394 y cultivares como Colorado Irradiado y J11 con una mayor susceptibilidad que Florman, los cuales serán de interés para incorporarlos al estudio de las vías de defensa y compararlos con los del presente estudio.

Los resultados de la expresión génica de los genes de las vías de lipoxigenasas e inhibidores de proteasas mostraron un comportamiento similar al observado en los ensayos *in vitro* en la etapa avanzada de la infección y por lo cual es necesario, para poder hacer un análisis comparativo, realizar un estudio de la cinética de infección en el ensayo a campo a partir de tiempos más tempranos de infección.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES FINALES

VI-CONCLUSIONES FINALES

En estudios previos realizados en el grupo de trabajo se aislaron e identificaron compuestos anti fúngicos que se producían en la semilla de maní como respuesta a la infección fúngica. En dichos estudios se identificaron compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides; compuestos lipídicos derivados de ácidos grasos (ácidos grasos trihidroxilados); y proteínas que inhibían proteasas, representando así diferentes vías defensivas que se activan en la semilla de maní (Asis *et al.*, 2005). Continuando con esta línea de investigación, la presente tesis doctoral plantea como hipótesis de trabajo que las diferencias en la resistencia a la infección de *Aspergillus spp.* y contaminación con aflatoxinas entre cultivares de maní podrían estar originadas por una distinta regulación de las vías de defensa en las semillas.

Para demostrar la hipótesis propuesta, se realizó un estudio de la capacidad defensiva de maní utilizando un modelo de infección *in vitro* con un cultivar resistente y un cultivar susceptible a la infección de *Aspergillus spp.* previamente caracterizados (Asis *et al.*, 2005). En este estudio se evaluó a nivel bioquímico y molecular la respuesta de dos Vías de Defensa: Vía de Lipoxigenasas (LOX) y Vía de Inhibidores de Proteasas (IP) sobre las cuales existe poca información en maní.

A partir de estos resultados es posible inferir mecanismos regulatorios diferentes entre los cultivares:

- En el cultivar resistente se produjo una respuesta temprana de la vía de LOX donde se observó un aumento de la expresión de la LOX 5 que codifica una enzima de tipo 9-LOX, no caracterizada anteriormente en maní y que sería la responsable del incremento de la producción del 9-hidroperóxido del ácido octadecadienoico (9-HPODE).

En forma opuesta el cultivar susceptible presentó una respuesta temprana de la vía de LOX asociada con una marcada expresión de la LOX 2-3 que codifica una enzima de tipo 13-LOX y que sería responsable del incremento del 13-hidroperóxido del ácido octadecadienoico (13-HPODE) observado en este cultivar. Trabajos previos han propuesto

que la activación de este tipo de LOXs podría influir sobre el desarrollo del hongo cuando invade la semilla, ya que los productos de estas enzimas han demostrado poseer un efecto sobre el tipo de reproducción del hongo (Burow *et al.*, 1997, Calvo *et al.*, 1999). También se ha observado que durante la infección, el hongo podría suprimir o inducir alguna de estas enzimas (LOXs) para favorecer su colonización (Brodhagen *et al.*, 2008).

Algunos autores realizaron en maní estudios previos, en los cuales se utilizó un único cultivar caracterizado como susceptible, donde se propuso que la activación de LOX tipo 13 favorecería la resistencia de la semilla de maní a la infección y una respuesta de tipo 9-LOX favorecería a la colonización (Tsitsigiannis *et al.*, 2005, Burow *et al.*, 2000), situación contrapuesta a lo concluido en el presente trabajo; donde utilizando un modelo comparativo de un cultivar resistente y uno susceptible se propone que una respuesta de tipo 9-LOX estaría asociada a la resistencia de la semilla a la infección y a una producción de compuestos anti fúngicos derivados de esta vía. A su vez, una respuesta de tipo 13-LOX estaría asociada a un incremento en la susceptibilidad a la infección coincidiendo con lo propuesto por Christensen y colaboradores (2011), que asocia un incremento en la conidiación inducido por la producción de 13-HPODE que imitarían a hormonas de crecimiento propias del hongo (Christensen *et al.*, 2011).

La regulación de la expresión de LOX y la actividad bioquímica de estas enzimas son determinantes para diferenciar la vía hacia una determinada respuesta. Sin embargo es necesario profundizar la investigación, de manera tal para lograr dilucidar el comportamiento de la vía metabólica en las etapas posteriores a la acción de las lipoxigenasas, donde participan otras enzimas y reacciones químicas que involucran numerosos compuestos involucrados en la defensa de plantas denominados oxilipinas (Koiwa *et al.*, 1997; Howe y Schillmiller, 2002; Andreu *et al.*, 2009).

La vía de las lipoxigenasas estaría íntimamente relacionada con la vía de los inhibidores de proteasas a través de la producción del ácido jasmónico, una hormona que se origina a partir de los productos de la LOX tipo 13 (Koiwa *et al.*, 1997; Shah, 2005). Esta hormona regula directamente la expresión de genes IP (Koiwa *et al.*, 1997).

Los genes LOX 2-3 y LOX 4 (gen no descrito previamente en maní y caracterizado en el presente trabajo) tendrían la capacidad de activar la producción de ácido jasmónico en la semilla e inducir la expresión de los inhibidores tipo *Kunitz* y *BBTI*. En los resultados obtenidos se puede observar una expresión coordinada entre estos genes, donde LOX 4 parece tener una asociación mayor con la expresión de los inhibidores en ambos cultivares (Figura III.12 del Capítulo III y Figura IV.14 del Capítulo IV).

Si bien los resultados evidencian una conexión entre estas vías, es necesario realizar estudios posteriores donde se evalúe la producción de ácido jasmónico durante la infección de la semilla. Ensayos donde se estimule la semilla con el agregado externo de ácido jasmónico evaluando su efecto sobre la expresión y producción de los inhibidores de proteasas permitirían a su vez comprobar dicha regulación; además de complementar con estudios funcionales de los genes caracterizados en el presente trabajo ya sea en plantas de maní o en plantas modelo.

La producción IP durante la infección fue analizada por la actividad inhibitoria de tripsina, donde se identificó en ambos cultivares un incremento significativo de esta actividad en las primeras 10 hs. de infección (Figura IV.13 del Capítulo IV). Este aumento podría estar relacionado a la síntesis del inhibidor tipo *Kunitz* (no descrito previamente y caracterizado en este trabajo) que incrementa su expresión génica en las primeras horas de infección. La actividad inhibitoria y la inducción de la expresión génica fue superior en el cultivar resistente, lo cual explicaría su detección exclusiva en el ensayo de purificación y posterior electroforesis bidimensional de las semillas infectadas durante 24 hs. en este cultivar (Figura IV.4 del Capítulo IV). La expresión de los genes que codifican para el inhibidor *BBTI* ocurrió en forma posterior a los de *Kunitz* y cuya regulación estaría ocurriendo a nivel post transduccional, generando diferentes isoformas que provocarían un segundo aumento en la actividad inhibitoria de tripsina a tiempos más tardíos (Figura IV.13 del Capítulo IV) y que se evidencian en los resultados comparativos de la electroforesis bidimensional (Figura IV.8 del Capítulo IV). La función de los IP como

elementos de defensa no se encuentran dilucidados aún. En el presente trabajo se evaluó la capacidad anti fúngica de los compuestos con actividad inhibitoria de tripsina, encontrando que la fracción que contenía al inhibidor de Kunitz presentó una marcada actividad anti fúngica, la cual podría ser consecuencia de la acción y/o presencia de este inhibidor, tal como lo han descrito otros autores en otras especies (Gao *et al.*, 1998; Giri *et al.*, 2003; Telang *et al.*, 2009). Sin embargo para confirmar esta hipótesis sería necesario ensayar la actividad anti fúngica de la proteína pura.

En contra posición a lo anteriormente expuesto, la fracción que contenía el inhibidor de *BBTI* no presentó actividad anti fúngica en el cultivar resistente mientras que en el cultivar susceptible presentó una actividad estimulante del crecimiento (**Figura IV.12 del Capítulo IV**). Aunque la actividad anti fúngica podría ser una función de estos compuestos en la defensa de la semilla, cabe especular que el mayor aporte en la defensa es realizado mediante el bloqueo de la actividad de las proteasas extracelulares que el hongo libera en la superficie de la semilla. En un estudio previo, fue demostrado que las proteasas extracelulares de *Aspergillus parasiticus* favorecen la colonización fúngica de la semilla, donde se observó que producían un daño tisular y afectaban la viabilidad de la semilla (Asis *et al.*, 2009). En dicho estudio pudo determinarse un efecto inhibitorio total sobre la proteasas extracelulares de *Aspergillus parasiticus* por parte de los inhibidores de proteasas del cultivar resistente, que fue incluso mayor al de una mezcla de inhibidores comerciales, sustentando nuestra propuesta. En un trabajo reciente se ha descrito que la semilla de garbanzo produce un exudado en respuesta a la infección fúngica con un contenido de proteínas de defensa e inhibidores de proteasas (Anusuya y Sathiyabama, 2013). Probablemente la semilla de maní utilice un mecanismo similar para defenderse contra la infección de *Aspergillus spp.*, el cual sería importante estudiar para comprender mejor el rol de los inhibidores de proteasas en la defensa contra patógenos.

Además de los inhibidores de proteasas encontrados en maní, en los ensayos de electroforesis bidimensional, se identificaron otras proteínas que se producían diferencialmente entre los cultivares. Varias de ellas se encuentran relacionadas con la

defensa de plantas, tales como proteínas relacionadas a patogénesis (PR) tipo IV, tipo I y tipo X, superóxido dismutasa, lectinas, glutaredoxinas, quitinasas. Todas estas proteínas permiten señalar que la semilla no sólo responde con las vías LOX e IP sino también con otros elementos de defensa que forman parte de la resistencia a la infección en estos cultivares y que serán de interés para estudios futuros.

- A partir de los estudios de infección *in vitro* sobre la semilla, los mecanismos regulatorios de las vías de defensa en maní han sido interpretados. Sin embargo, no se conoce su comportamiento en las semillas infectadas cuando se encuentran en proceso de maduración en la planta. Por tal motivo fue realizada la infección de las semillas en las plantas producidas a campo, de manera tal de reproducir la infección natural. En estos ensayos no fue posible alcanzar las condiciones ambientales apropiadas para la infección de las semillas, por lo cual se optó por realizar un procedimiento de inoculación directa a través de la caja del fruto. En este ensayo se consiguió la colonización de las semillas, lo cual permitió evaluar las susceptibilidades a la infección y contaminación con aflatoxinas. De esta manera se identificaron cultivares altamente tolerantes a la contaminación con aflatoxinas y cultivares muy susceptibles. La respuesta bioquímica y molecular de las vías de defensa en los mismos cultivares empleados en los ensayos *in vitro* fue evaluada. En estudios posteriores sería conveniente ajustar el tiempo y tamaño de inóculo para la infección, de manera de poder evaluar y comparar la respuesta bioquímica y de expresión de los genes de las vías de LOX e IP.

Finalmente, es posible concluir que los conocimientos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis cuyo objetivo fue identificar y comprender los mecanismos de resistencia de la semilla de maní frente a la infección con *Aspergillus spp.*, que permitan evitar la contaminación con aflatoxinas a campo, aportan herramientas que permitirán la búsqueda de cultivares resistentes.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Ahmad, R.; Zuily-Fodil, Y.; Passaquet, C.; Bethenodb, O.; Roche, R.; Repellina, A.** 2014. Identification and characterization of MOR-CP, a cysteine protease induced by ozone and developmental senescence in maize (*Zea mays L.*) leaves. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.047>.
- Alves, D.T.; Vasconcelos, I.M.; Oliveira, J.T.A.; Farias, L.R.; Dias, S.C.; Chiarello, M.D.; Neto, S.M.; Franco, O.L.** 2009. Identification of four novel members of Kunitz-like α -amylase inhibitors family from *Delonix regia* with activity toward *Coleopteran* insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 95, 166–172.
- Amé, M. V.; Baroni, M. V.; Galanti, L. N.; Bocco, J. L.; Wunderlin, D. A.** 2009. Effects of microcystin-LR on the expression of P-glycoprotein in *Jenynsia multidentata*. *Chemosphere*, 74, 1179-1186.
- Andreu, A.; Brodhun, F.; Feussner, I.** 2009. Biosynthesis of oxilipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* doi 10.1016/j.plipres.2009.1002.1002.
- Anusuya, S.; Sathiyabama, M.** 2013. Identification of defence proteins from the seed exudates of *cicer arietinum L.* and its effect on the growth of *fusarium oxysporum f.sp. ciceri*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*.
- AOAC- Association of Official Analytical Chemist (A.O.A.C.),** 1999. Natural toxins in *Official Methoctoralods of Analysis of AOAC international*, 49, 1-25 (16 th edition).
- Asis, R.** 2004. Biosíntesis de aflatoxinas por *Aspergillus* y su relación con genotipos de maní susceptibles y resistentes. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.
- Asis, R.; Barrionuevo, D. L.; Giorda, L. M.; Nores, M. L.; and Aldao, M. A.** 2005. Aflatoxin Production in six peanut (*Arachis hypogaea L.*) genotypes infected with